

Respuesta humoral IgM e IgG frente a antígenos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* en murinos infectados y su relación con las citoquinas Il-10 y TNF- α .

Humoral IgM and IgG against excretory-secretory antigens of infected murine with *Schistosoma mansoni* and its relationship with the cytokines Il-10 and TNF- α .

Ochoa U., Genesis¹, Mujica S., Andrea ¹, Barrios Emilia E.^{1, 2}, Cosenza C., Miguel¹, Capellán M., Radhames¹, Ayala Jennifer¹, Ojeda G., Olga¹.

¹Laboratorio de Helminología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP). ²Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Autor de correspondencia: Emilia Barrios: barrios.emilia@gmail.com

Resumen

El diagnóstico de fase en la esquistosomiasis es complejo. Se evaluó la respuesta IgM e IgG murina contra productos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* machos (PESGM), hembras (PESGH) y huevos (PESH), su relación con la histopatología y expresión de IL-10 y TNF- α , mediante ELISA, en suero de ratones Balb/c con 8 y 20 semanas de infección (RI8 y RI20) y Ratones sanos (RS). En RI8, se observaron granulomas constituidos por plasmocitos, macrófagos y neutrófilos, depósitos de colágeno alrededor de los granulomas y en la zona interna del huevo. En RI20, se observaron fibroblastos alrededor del huevo y acúmulos de macrófagos y plasmocito, aumento de los depósitos de colágeno en áreas del granuloma. IgM sérica RI8, presentó un mayor porcentaje de positividad frente a PESGH (35%), mientras que IgG el mayor porcentaje de positividad fue PESGH (60%) y PESH (30%). En RI20, IgM fue 20% positiva frente a PESH e IgG 10% frente a PESGM, y 25% positiva con PESGH. No se observaron diferencias en IL-10 entre los RS y RI8. TNF- α en RS vs RI8 y RS vs RI20 fue diferente y estadísticamente significativo. Los PESGH podrían detectar fase aguda y PESH fase crónica. El empleo de varios antígenos sería de utilidad en el diagnóstico de fase.

Palabras clave: *Schistosoma mansoni*; respuesta inmune; citoquinas pro-inflamatorias; respuesta granulomatosa.

Abstract

The diagnosis of schistosomiasis phase is complex. The murine IgM and IgG response against excretory-secretory products of *Schistosoma mansoni* males (PESGM), females (PESGH) and eggs (PESH), its relation to histopathology and expression of IL-10 and TNF- α was assessed by ELISA in serum of Balb / c mice with 8 and 20 weeks of infection (RI8 and RI20) and healthy mice, RS. In RI8, were observed granulomas consisting of plasma cells, macrophages and neutrophils, deposits of collagen around the granulomas and internal area of the egg. In R20SI, fibroblasts around the egg and accumulation of macrophages and plasmocito, increased collagen deposits in areas of granuloma were observed. RI8 serum IgM had a higher percentage of positivity PESGH (35%), while the highest percentage of IgG positivity was PESGH (60%) and PESH (30%). In R20SI, was 20% IgM positive and IgG against PESH PESGM 10% against and 25% positive with PESGH. No differences in IL-10 between the RS and RI8 were observed. TNF- α in RS vs RI8 and RS vs RI20 was different and statistically significant. The PESGH could detect phase acute while PESH chronic phase. The use of several antigens would be useful in the diagnosis phase.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; immune response; pro-inflammatory cytokines; granulomatous response.

Introducción

La esquistosomiasis es una de las enfermedades tropicales más desatendidas del mundo (1), afectando a más de 1 billón de la población mundial, lo que la ubica como la segunda parasitosis más frecuente en el hombre después del paludismo(2,3). La infección con *Schistosoma mansoni* puede causar esquistosomiasis intestinal y hepática en más de 100 millones personas que viven principalmente en África, la Áreas del Caribe y Sudamérica, siendo ésta la especie más extendida(4). Venezuela es considerada un país hipoendémico donde predominan las bajas cargas parasitarias en las personas infectadas, el área endémica es la región centro-norte relacionada a la presencia de su hospedador intermediario, el molusco de agua dulce del género *Biomphalaria*. En estas zonas los individuos cursan infecciones leves (eliminación de <100 huevos / g de heces) (5).

En consecuencia, los individuos infectados son asintomáticos o tienen escasas manifestaciones clínicas (5). En la minoría que presentan síntomas en la fase aguda, la penetración cutánea de las cercarias de *S. mansoni*, pueden ocasionar una urticaria temporal, seguida de una reacción de hipersensibilidad frente a la migración de los esquistosómulos, mientras que los síntomas abdominales se asocian al desarrollo de los

gusanos adultos (6). Las principales lesiones en la infección crónica se deben a la reacción granulomatosa desarrollada por el hospedador frente a los huevos que quedan atrapados en los tejidos(5), que posteriormente puede conducir a la esquistosomiasis hepatoesplénica grave, caracterizada por fibrosis periportal, hipertensión portal, sangrado gastrointestinal y la muerte(6).

En ratones, el perfil de IgM y IgG contra los antígenos solubles del huevo (ASH) y gusano (ASG), están presente en las fases aguda y crónica. Mientras que en humanos infectados que presentan daño hepatoesplénico o que se encuentran en el inicio de la respuesta cirrótica, se observa una menor respuesta de la IgM contra antígenos de gusano (8). Estudios señalan que las concentraciones de IgM e IgG frente a los antígenos de huevo y gusano en pacientes de fase aguda no se diferencian de las concentraciones de los pacientes en fase crónica, observándose en los de fase aguda un perfil mixto de citoquinas TH₁ y TH₂ y en la crónica un perfil TH₂ que favorece la producción de IL -10 (9). En la esquistosomiasis la respuesta TH₂ se asocia a la resistencia a la infección, mientras que la inducción de una respuesta TH₁, se traduce en susceptibilidad a la infección y evolución crónica (10). En regiones endémicas el INF- γ y TNF- α se asocian a cuadros fibróticos graves (3).

El diagnóstico de la esquistosomiasis es un problema sin resolver en Venezuela, debido

a la hipoendemicidad, la cual determina baja sensibilidad de los métodos coproparasitológicos, y debido a que los métodos serológicos no permiten precisar la fase clínica, por lo que esta se determina fundamentalmente en base a las evidencias clínicas.

La complejidad de los mecanismos inmunitarios de defensa del hospedador, contra la gran cantidad de antígenos y los mecanismos de inmunoevasión del parásito, así como, la contribución de ciertas citoquinas en la progresión de la fibrosis hepática (3) producto del daño hepático o intestinal que la infección ocasiona (7), resalta la necesidad de evaluar parámetros que contribuyan a realizar un diagnóstico de fase clínica en forma precoz, que limite las complicaciones graves de la esquistosomiasis.

Por tanto, es importante proporcionar ideas sobre los mecanismos que subyacen a la progresión de la enfermedad, lo que podría ser potencialmente útil para el diagnóstico diferencial en la evolución de la esquistosomiasis, debido a que la infección es altamente inmunogénica y se han desarrollado ensayos que permiten demostrar la presencia de anticuerpos anti-esquistosomas (8).

En este estudio se evaluó la respuesta humoral IgM e IgG murina contra antígenos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* y su relación con la histopatología y expresión de IL-10 y TNF- α , en ratones Balb/c a las 8 y 20 semanas de la infección.

Materiales y Métodos

Estadios de *Schistosoma mansoni*.

Los gusanos se obtuvieron por perfusión a la vena porta hepática de hamsters dorados machos infectados con 1000 cercarias, después de 7 semanas de infección. Los hígados e intestinos de los hamsters infectados fueron digeridos enzimáticamente en una mezcla de colagenasa 0,05 % y tripsina 0,25% p/v en tampón fosfato salino (PBS 0,15 M pH 7,2). El homogenato, producto de esta digestión enzimática se tamizó en mallas metálicas de poros decrecientes (420-44 μ m); para obtener los huevos. Los huevos y los gusanos obtenidos por perfusión de la vena porta se lavaron con PBS a 2500 rpm a 4 °C por 10 min (11).

Obtención de los productos de excreción-secreción de huevos y gusanos.

Los huevos fueron lavados tres veces con medio RPMI1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con antibióticos (estreptomicina 100 μ g y penicilina 100 UI por ml) en tubos cónicos de propileno estériles (SPL lifesciences) a 2500 rpm a 4 °C por 5 min. Luego se incubaron en placas de cultivo (BD Falconplacas TM HTS FluoroBlokTM) 1x10⁶ huevos con 2 mL de medio RPMI1640 con antibiótico, a 37 °C, en atmosfera de 10% de O₂ y 5 % de CO₂.

El procedimiento con los gusanos se inició con la separación de los gusanos por sexo, en medio RPMI1640 a 4 °C, luego 1- 2x10³ gusanos machos o hembras, fueron lavados dos veces con RPMI1640 suplementado con antibióticos en tubos cónicos mediante sedimentación espontánea a 4 °C y se transfirieron a placas de cultivo por 4 horas a 37 °C, en atmosfera de 10% de O₂ y 5 % de CO₂.

Los sobrenadantes obtenidos del cultivo de huevos y gusanos (PESH y PESG) se centrifugaron (micro centrifuga HERMLE z 233 M-2) en tubos de microcentrifuga a 14000 rpm por 30 min a 4 °C, a estos sobrenadantes se les determinó la concentración de proteínas totales por método Spector, se concentraron y desalinizaron en membranas de diálisis (Ultrafuge 30.000 NMWC POLYSULFONE 3ml) y al producto obtenido luego de esto, se les determinó la concentración de proteínas totales (12).

Infección de ratones. Las cercarias obtenidas de caracoles *B. glabrata* con cinco semanas de infección, con aproximadamente 10 miracidios de *S. mansoni* se usaron en la infección de ratones Balb/c machos, vía percutánea por inmersión de la cola 1 h a temperatura ambiente individualmente. Los ratones se dividieron en 3 grupos, un grupo control sano (RS) (n=20), uno de ratones infectados con 8 semanas (R8SI) (n=20) y otro con ratones infectados con 20 semanas (R20SI) (n=20), en los cuales se desarrollaron los ensayos inmunológicos e histopatológicos. Todos los procedimientos se hicieron siguiendo los lineamientos del Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT (11).

Detección de inmunoglobulinas IgM e IgG. La detección de inmunoglobulinas en el suero de los ratones, se efectuó mediante ELISA indirecto. La sensibilización se hizo con 1 μ g/ μ l de productos excreción-secreción de huevos (PESH) y gusanos machos (PESGM) y hembras (PESGH) diluidos en buffer carbonato- bicarbonato pH 9,5.

Estos se incubaron 12 horas a 4°C en una placa de microtitulación de 96 pozos (immunolon 2HB), transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados sucesivos con 200 μ L de PBS (0,15 M pH 7,5) + tween 20 al 0,05% (v/v). Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con albúmina bovina sérica al 1% (p/v) en PBS-Tween (BSA en PBS-T), por una 1 hora a 37 °C. Los sueros de los ratones Balb/c infectados y controles no infectados, en una dilución 1:200 en BSA al 1% en PBS-T, fueron incubados por 1 hora a 37°C. Luego se agregó el anticuerpo secundario una IgM o IgG de ratón conjugada a peroxidasa (Pierce). El revelado se hizo adicionando una solución de 40 μ g de orto-fenilendiamina (ALDRICH), diluidos en 20 μ l de peróxido de hidrógeno y 100 ml buffer fosfato-citrato, pH 5. La lectura se hizo a 450 nm en un lector MultiscanThermoLabsystem(11).

Detección de IL-10 e TNF- α . La detección de citocinas se efectuó mediante método ELISA indirecto. La sensibilización se hizo con sueros de ratones Balb/c con 8 y 20 semanas de infección diluidos 1:50 en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,5. Estos se incubaron 12 horas a 4°C en una placa de microtitulación de 96 pozos (immunolon 2HB), transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados sucesivos con 200 μ L de PBS (0,15 M pH 7,5) + Tween 20 al 0,05% (v/v). Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con albúmina bovina sérica al 1% en PBS-Tween (BSA en PBS-T), por una 1 hora a 37 °C. Se emplearon como anticuerpos primarios IgG Anti-IL-10 y anti-TNF- α de ratón producida en conejo, en una dilución 1:500 en BSA al 1% en PBS-Tween, fueron incubados por 1 hora a 37°C. Luego se agregaron como anticuerpo secundario una anti-IgG de conejo conjugada a peroxidasa en una dilución 1:500 con BSA al 1%. El revelado se hizo adicionando una solución de 40 μ g de orto-fenilendiamina (ALDRICH), diluidos en 20 μ l de peróxido de hidrógeno en 100 ml buffer fosfato-citrato pH 5. La lectura se hizo a 450 nm en un lector MultiscanThermoLabsystem(11).

Histopatología hepática. Los hígados de controles sanos, RI8 y RI20 fueron fijados por perfusión con formalina neutra al 10% en PBS e incluidos en parafina. Las secciones hepáticas de 4 μ m de espesor se colocaron en láminas portaobjeto previamente tratadas con poli-L-lisina (0,2 % p/v en agua). Posteriormente, estas se desparafinaron por incubación del corte a 60 °C por 30 min y lavado con xilol. El tejido se

hidrató con etanol grado decreciente (100, 90, 70, 50 y 30 % v/v), seguido de dos lavados con agua destilada. Luego se coloreó con hematoxilina de Mayer (SIGMA-ALDRICH), se diferenció con alcohol ácido y se tiñó el citoplasma con eosina al 1% (p/v) diluida en etanol (11).

En estas secciones se determinó la composición celular observándose 10 campos por lamina de cada ratón RS (n=20), RI8 (n=20) y RI20 (n=20). El área de la respuesta granulomatosa se delimitó estimando el área imaginaria de un círculo con la ayuda de un micrómetro ocular en un microscopio BAUSCH & LOMB, observada con el objetivo de 10, a la cual se restó el espacio de la respuesta celular en el granuloma, el espacio ocupado por los huevos del parásito y expresada en μ m². La observación de la celularidad y el registro fotográfico se hizo en un microscopio NIKON modelo E-600, con cámara Coolpix 995 acoplada (11).

Además, fue estimado el peso corporal de los ratones (RS, RI8 y RI20) vivos y luego de la disección, el del hígado y el bazo empleando una balanza digital (ACCULAB VI-600).

Coloración Tricrómica rápida de Gomori modificada. Para esta técnica se tomaron cortes hepáticos de ratones RS, RI8 y RI20 los cuales fueron coloreados siguiendo la técnica Tricrómica de Gomori para la cual se preparó la solución de Gomori (Chomotrope 2R 0,6 %, verde luz 0,3%, Acido fosforungstico 0,6%, ácido acético glacial 16,58 M y agua), la solución final fue llevada a un pH 3,4 con hidróxido de sodio 1M; luego se siguió un protocolo similar al aplicado en la coloración hematoxilina-eosina, sustituyendo la eosina por la solución de Gomori por 6-8 min, seguido de un lavado rápido con ácido acético glacial al 2% y secado. Los depósitos de colágeno en el tejido se observaron de color verde (13).

Análisis de los datos. El análisis de resultados para IgM e IgG se realizó determinando el punto de corte como el promedio $\pm$ 2 desviación estándar de las densidades ópticas obtenidas, con los PESH, PESGM y PESGH, en los sueros de los ratones sanos (11). A partir del punto de corte se estableció las frecuencias absolutas y relativas de positivos y negativos en los ratones con 8 y 20 semanas de infección, con cada inmunoglobulina y antígeno.

Los resultados de la determinación del peso corporal de los ratones, hígado y bazo, área

del granuloma, IL-10 y TNF- α se expresaron como la media $\pm$ la desviación estándar de las densidades ópticas obtenidas RS (n=20), RI8 (n=20) y RI20 (n=20), se analizaron usando la prueba T de Student donde los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La correlación entre las diferentes variables se hizo usando el coeficiente de correlación de Spearman. Todo el procesamiento estadístico se realizó con el paquete estadístico STATISTIC versión 9.

Resultados

Histopatología

En secciones de hígados sanos, se observaron acinos hepáticos correspondientes a un área romboidal de hepatocitos que se encontraban formando sinusoides hepáticos dispuestos en hileras, en cuyas paredes se

evidenció presencia de macrófagos adosados (células de Kupffer) con morfología normal y sin ninguna alteración aparente, y en el centro de los acinos la arteria hepática y vena porta bien preservada.

En los RI8 la distribución de células en el granuloma se observó en tres patrones: 1) Granulomas de gran tamaño con un cúmulo de macrófagos y plasmocitos en la zona interna en contacto con el huevo, y a continuación de estos, neutrófilos dispersos, con predominio de plasmocitos (Figura 1A-C). 2) Granulomas de gran tamaño constituidos predominantemente por macrófagos ubicados en la zona interna del granuloma, presencia de plasmocitos dispersos en la zona media y pequeños focos de neutrófilos en la zona externa (Figura 1D-F). 3) Granulomas de menor tamaño, con un infiltrado de macrófagos dispuestos en una hilera alrededor del huevo, y escasos plasmocitos y neutrófilos en la periferia (Figura 1G-I).

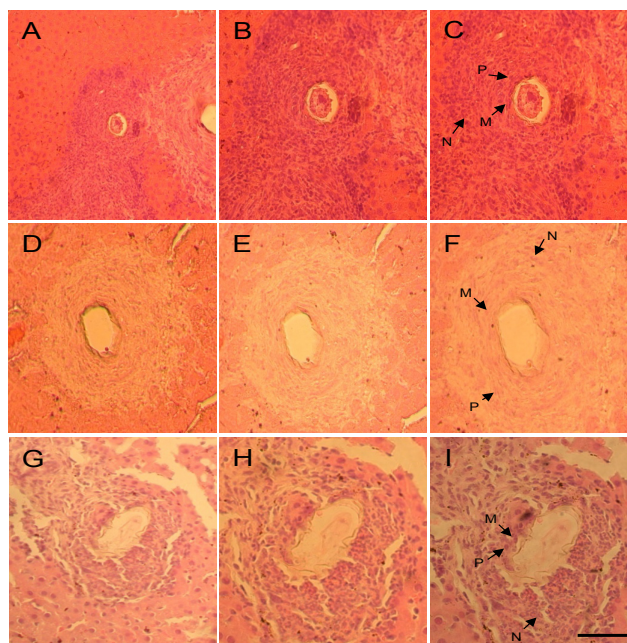


Figura 1. Secciones hepáticas de ratones Balb/c con 8 semanas de infectados con *S. mansoni*: Granulomas de gran tamaño con acúmulo de macrófagos (M) y plasmocitos (P) en la zona interna del granuloma en contacto con el huevo, y neutrófilos (N) dispersos (A-C). Granulomas de gran tamaño constituidos por macrófagos (M) en la zona interna del granuloma, presencia de plasmocitos dispersos en la zona media, pequeños focos de neutrófilos (N) en la zona externa (D-F). Granulomas de menor tamaño, conformados por un infiltrado de macrófagos (M) dispuestos en una delgada hilera alrededor del huevo que se continúa con escasos plasmocitos (P) y neutrófilos (N) en la periferia (G-I). Bar = 25 μ m.

En hígados RI20, se evidenció una distribución celular similar a lo observado en granulomas hepático en RI8. 1) Granulomas cuya zona interna contiene fibroblastos alrededor de la cubierta calcárea del huevo, y en la periferia de esta zona acúmulos de macrófagos dispersos en toda el área del granuloma y escasos plasmocitos (Figura 2A-C) 2) En el segundo modelo, la zona interna, está constituida por

acúmulos de fibroblastos que empiezan a sustituir la superficie externa del huevo, y sobre estos, algunos macrófagos en hilera (Figura 2D-F). 3) corresponde a granulomas, en los cuales la cubierta del huevo ha sido sustituida completamente por fibroblastos, en la periferia de esta zona se pueden observar aun algunos macrófagos dispersos (Figura 2G-I).

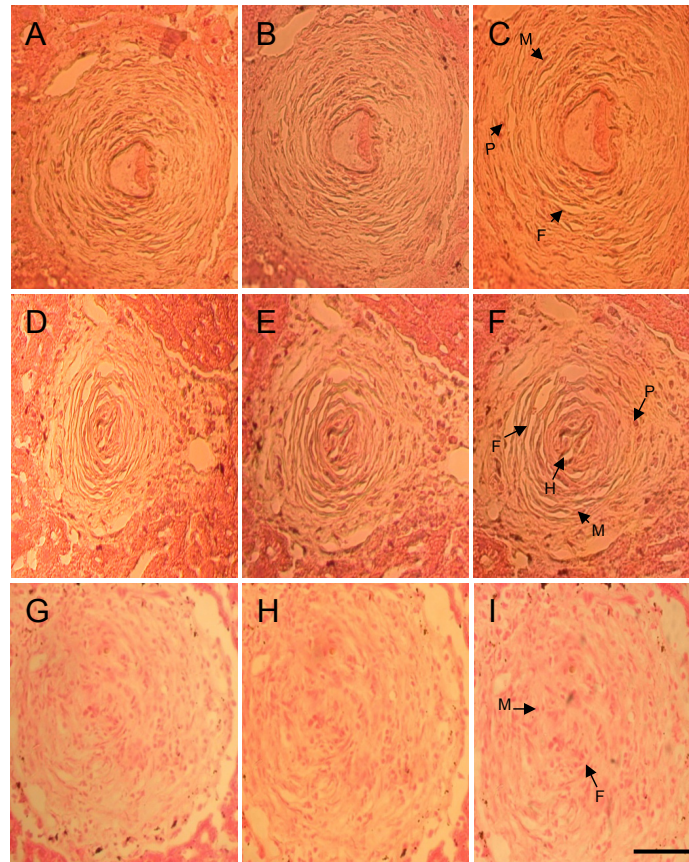


Figura 2. Secciones hepáticas de ratones Balb/c infectados con 20 semanas de infección con *S. manson*: Granulomas cuya zona interna contiene fibroblastos (F) alrededor de la cubierta calcárea del huevo, en la periferia se encuentran cúmulos de macrófagos (M) dispersos en el granuloma y en menor medida plasmocitos (P) (A-C). Zona interna del granuloma constituida por cúmulos de fibroblastos (F) que empiezan a sustituir la cubierta calcárea del huevo (H), en la zona externa se observan algunos macrófagos (M) en hilera y ausencia de plasmocitos (P) (D-F). Granulomas en los cuales la cubierta calcárea del huevo ha sido sustituida completamente por fibroblastos (F), en la periferia de esta zona se pueden observar aun algunos macrófagos (M) dispersos (G-I). Bar = 25µm.

En los cortes hepáticos de los RS teñidos con la técnica de Gomori modificado, se observaron depósitos de colágeno dispersos en el tejido (Figura 3A-B). En los hígados de ratones infectados con RI8 los depósitos de colágeno se encuentran disminuidos y ubicados alrededor

de los granulomas y en la zona interna del huevo (Figura 3C-D), mientras que en los RI20 existe un aumento de los depósitos de colágeno en el área de la respuesta granulomatosa (Figura 3E-F)

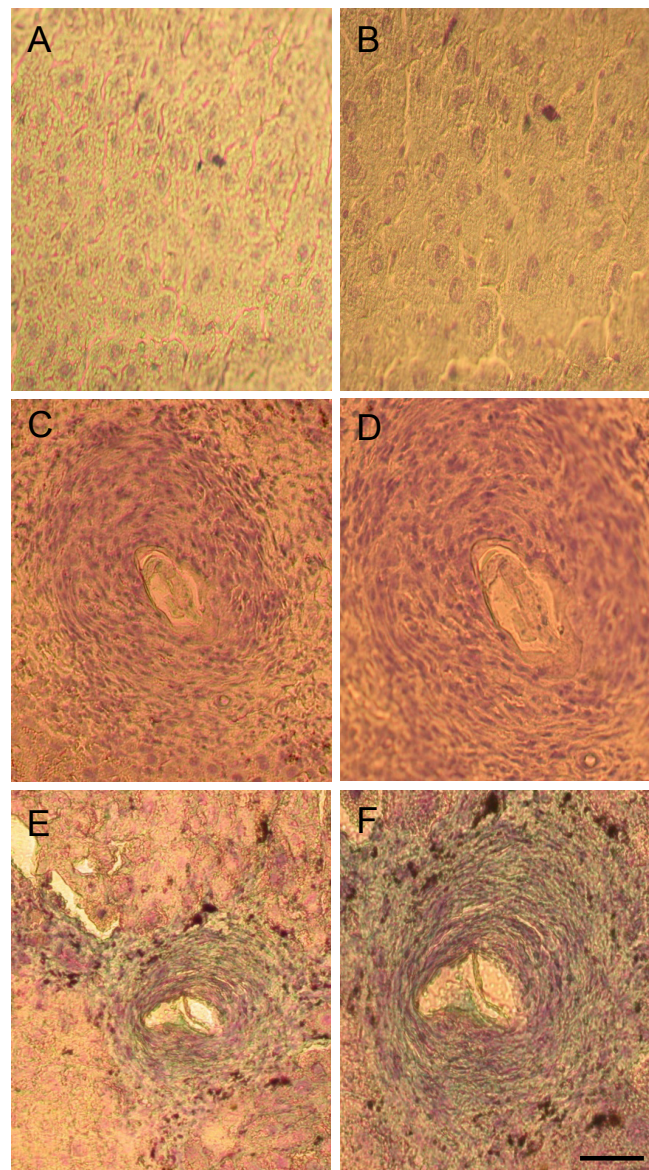


Figura 3. Secciones hepáticas de ratones Balb/c infectados con *S. mansoni*: Controles sanos: presencia de colágeno en todo el tejido (A y B). Hígados con 8 semanas de infección: el colágeno se ubica alrededor del granuloma y en la zona del huevo (C y D). Hígados con 20 semanas de infección: aumento de la concentración del colágeno alrededor del granuloma (E y F). Bar = 25µm.

El peso promedio de hígados y bazo en RS se ubicó entre $1,09 \pm 0,19$ gr y $0,1 \pm 1,46 \times 10^{-17}$ respectivamente, al relacionar estos valores con los obtenidos en los RI8y RI20 se observa un aumento de aproximadamente del doble, tanto en el peso del hígado como del bazo, sin embargo al relacionar el peso

hígados y bazo obtenidos de RI8 y RI20 no se observa un aumento significativo de ambos. Al relacionar los pesos corporales de RS, RI8 y RI20 se observa un aumento gradual en el peso corporal a medida que avanza la infección (Tabla 1).

Tabla 1. Peso corporal, hígado y bazo en RS, RI8 y RI20 con *S. mansoni*

	TIEMPO	PESO PROMEDIO (gr)	DESV. ESTANDAR
PESO CORPORAL	RS	19,26	2,25
	RI8	24,13	3,68
	RI20	28,13	4,10
BAZO	RS	0,10	1,46x10 ⁻¹⁷
	RI8	0,28	0,050
	RI20	0,30	0,094
HÍGADO	RS	1,09	0,19
	RI8	1,83	0,37
	RI20	2,00	0,26

La respuesta granulomatosa en RI8, se presentó organizada en granulomas de gran tamaño 142.860,2 μm^2 , tamaño intermedio 22.428,8 μm^2 y de menor tamaño 3.135,4 μm^2 , en contraste con lo observado en la respuesta granulomatosa de los hígados de RI20 donde el área promedio fue de 40.617,5 μm^2 , el área

de menor tamaño 16.345,6 μm^2 y el de mayor 99.041,1 μm^2 , observándose que al comparar las áreas promedios de la respuesta inflamatoria observada en RI20 es mayor que RI8y que tal diferencia es estadísticamente significativa (Tabla 2).

Tabla 2. Área de la respuesta inflamatoria hepática en RI8 y RI20 con *S. mansoni*

		AREA. PROMEDIO	DESV. ESTANDAR	AREA MIN	AREA MAX
GRANULOMA (μm^2)	RI8	22.428,80	17.776,56	3.135,48	142.860,23
	RI20	40.617,50	16.918,69	16.345,65	99.041,13
RI (μm^2)*	RI8	12.345,30	11.867,50	1.547,52	94.848,22
	RI20	24.488,79	12.399,83	6.190,07	75.828,36

*Respuesta inflamatoria

**p=2,338-28 al comparar las respuestas inflamatorias promedios de los RI8 con RI20

Determinación de IgG e IgM

El punto de corte determinado en PESGM de RS para IgM fue de 0,090, mientras que para el caso de IgG fue 0,071. Tomándose como criterio de exclusión los puntos de corte establecidos anteriormente, se encontró en RI8 que en IgM hubo 100% de negatividad mientras que en los RI20 se obtuvo un 95% de negatividad en la detección de la infección con PESGM asociado a IgM; en el caso de la respuesta IgG en grupos de RI8 y RI20 se obtuvo 10,0% de positividad y 90,0% de negatividad en ambos grupos (Tabla 3).

Se estableció el punto de corte para IgM e IgG con PESGH en RSo, 141 y 0,040

respectivamente; donde los resultados obtenidos en RI8 para IgM fueron de 35,0% de positividad y 65,0% de negatividad, en el caso de RI20 no se pudo evidenciar la presencia de IgM empleando este producto de excreción; mientras que en la respuesta IgG en RI8 hubo una detección del 60,0% y para RI20 la detección de la infección con PESGH fue de un 25,0% (Tabla 3).

Para los PESH en el grupo de RI8 no hubo detección IgM, sin embargo en el grupo de RI20 la detección fue de un 20,0% empleando como punto de corte 0,187; para IgG se obtuvo 30,0% de los ratones positivos a las 8 semanas de infección y en el grupo de 20 semanas de infección se obtuvo un 100,0 % de negatividad,

empleando como punto de corte, 110 (Tabla 3).

Determinación de IL-10 y TNF- α

Al determinar las absorbancias en la prueba de ELISA para la IL-10 en RS, RI8 y RI20 se observó que hubo diferencia estadísticamente

significativa entre el grupo de, RS vs RI20 y RI8 vs RI20, además que esta diferencia tuvo un aumento gradual durante el tiempo de infección llegando a su concentración máxima en RI20 (Tabla 4).

Tabla 3. Respuesta IgM e IgG frente a PESH, PESGH y PESGM de *S. mansoni*

	IgM *	IgG*	SEMANAS
PESH	0%	30%	RI8
PESGH	35%	60%	
PESGM	0%	10%	
PESH	20%	0%	RI20
PESGH	0%	25%	
PESGM	5%	10%	

*Frecuencia de positivos en detección de Ig

TABLA 4. Correlación entre valores de absorbancia de IL-10 y TNF- α de RS, RI8 y RI20 con *S. mansoni*

		T Student (p)
IL-10	RS vs RI8	0,394
	RS vs RI20	0,027
	RI8 vs RI20	0,009
TNF-α	RS vs RI8	1,6x10-06
	RS vs RI20	1,7x10-06
	RI8 vs RI20	0,469

Al relacionar las concentraciones obtenidas de TNF- α en RS vs RI8, RS vs RI20 y RI8 vs RI20 se observó una diferencia estadísticamente significativa solo al relacionar RS vs RI8 y RS vs RI20 (Tabla 4).

Al analizar las correlaciones entre variables, se observó que existe una correlación positiva entre los valores de la IL-10 e TNF- α a las 8 semanas de infección, mientras que en los RI20 el TNF- α tuvo correlación con PESGH. Para la IgM la correlación frente al PESGH con los PESH a las 8 semanas y 20 semanas de infección; mientras que para la IgG fue con los PESGH a las 8 y 20 semanas de la infección (Tabla 5 y 6). Asimismo, se encontró una asociación indirecta para la IgM de PESGM frente a la IgG de PESGH y PESH a las 8 y 20 semanas de infección y para la IgG de PESH

frente a la IgM de los PESGH y PESGM en los RI8 (Tabla 5 y 6).

Discusión

Para evaluar la patogénesis de la esquistosomiasis es necesario conocer tanto el tiempo de infección como la progresión del proceso inflamatorio, aspectos difíciles de evaluar mediante métodos coproparasitológicos y serológicos, debido a sus limitaciones. Se evaluó la respuesta humoral IgM e IgG murina contra antígenos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* y su relación con la histopatología y expresión de IL-10 y TNF- α , en ratones Balb/c a fin de precisar en dos fases de la infección, características inflamatoria y ambiente de citoquinas relacionadas.

Tabla 5. Correlación de variables en ratones Balb/c con 8 semanas de infección con *S. mansoni*

8 SEMANAS								
RI8	IgM			IgG				
	TNF- α	IL-10	PESGM	PESGH	PESH	PESGM	PESGH	PESH
	TNF- α	0,505						
	IL-10	0,505						
	IgM	PESGM		0,612	0,497		-0,613	
		PESGH	0,612		0,883	-0,619	-0,809	-0,626
		PESH	0,497	0,883		-0,714	-0,757	-0,572
	IgG	PESGM		-0,619	-0,714		0,518	
		PESGH	0,631	-0,809	-0,757	0,518		0,616
		PESH		-0,626	-0,572		0,616	
	RI20	TNF- α						
		IL-10						
		IgM	PESGM	0,463	0,539		-0,459	-0,613
			PESGH	0,594	0,779	-0,602	-0,639	
			PESH		-0,492	-0,661		0,618
	IgG	PESGM						0,590
		PESGH		-0,458	-0,499	0,475	0,676	0,469
		PESH		-0,579	-0,626	0,537	0,603	0,531

Tabla 6. Correlación de variables en ratones Balb/c con 20 semanas de infección con *S. mansoni*

20 SEMANAS								
RI8	IgM			IgG				
	TNF- α	IL-10	PESGM	PESGH	PESH	PESGM	PESGH	PESH
	TNF- α							
	IL-10							
	IgM	PESGM		0,594				
		PESGH	0,463	0,779	-0,492		0,458	-0,579
		PESH	0,539	0,784	-0,661		-0,499	-0,626
	IgG	PESGM		-0,602			0,475	0,537
		PESGH	-0,459	-0,639			0,676	0,603
		PESH	-0,613		0,618	0,590	0,469	0,531
	RI20	TNF- α	0,528					
		IL-10						
		IgM	PESGM			-0,475	-0,538	-0,737
			PESGH	0,528			-0,521	-0,634
			PESH					
	IgG	PESGM	-0,475					0,499
		PESGH	-0,538	-0,521				0,655
		PESH	-0,737	-0,634		0,499	0,655	

En este estudio se observó que en fases tempranas de infección, donde aún se conserva la arquitectura del huevo en los granulomas, estos son de mayor tamaño en comparación con granulomas en infecciones avanzadas donde existe una de generación del huevo. En relación a esto, se conoce que la respuesta inmunitaria inducida por los huevos de *S.mansoni* es un mecanismo de protección iniciada por el hospedador que paradójicamente es responsable de la patología de la enfermedad cuando la infección se hace crónica. Borim y cols. (14) demostraron que la longitud y el tamaño de los granulomas son proporcionales a la persistencia del huevo en la lesión y la capacidad de las células del hospedador para destruir antígenos, a su vez indican que a mayor tamaño de los huevos, estos aportan más epítopes antigénicos a ser procesados por los mecanismos de defensa del hospedador. En contraste, con nuestro estudio se observa que en los RI8 existen variaciones en el tamaño de los granulomas, por lo que en promedio el área resulta menor a pesar de la existencia de granulomas con área mayor a la promediada en comparación con la fase más avanzada de la infección (RI20) donde el área de los granulomas es más constante. En cuanto a la composición celular, observamos que los granulomas de RI8, presentan mayor cantidad de macrófagos, plasmocitos y pequeños focos de neutrófilos; Barrios y cols. (15) sugirieron que en las primeras semanas de la infección se estimulan la producción de mediadores relacionados con estas células, mientras que Hams y cols. (16) señalan que la respuesta granulomatosa es rica en eosinófilos, macrófagos y células TH₂, que actúan para proteger el tejido del hospedador de las toxinas liberadas por el huevo, proporcionando una barrera física, y secuestrando los productos antigénicos secretados por el parásito.

Los resultados obtenidos en este estudio, revelaron que la composición celular de los granulomas de RI20 está representada por acúmulos de fibroblastos, en menor medida macrófagos y pequeños focos de plasmocitos, autores (16) afirman que el cambio a una reacción de tipo TH₂ se acompaña de un cambio en la celularidad del granuloma con presencia eosinófilos, mastocitos y fibroblastos en la lesión. Lundy y Lukacs (17), en su estudio indican que a medida que el huevo degenera ocurre un proceso

de regeneración parcial del tejido, donde los fibroblastos ocupan la zona donde se encontraba el huevo y que la activación constante del sistema inmune con el tiempo y evolución de la infección, conduce al desarrollo de lesiones fibróticas que sustituyen las células en el infiltrado inflamatorio (18), a consecuencia de la respuesta del hospedador frente al parásito, lo que se ajusta a lo observado en nuestro estudio.

En este orden de ideas Chuah y cols. (19) refieren que los granulomas en la esquistosomiasis se desarrollan en dos etapas: la pre-granulomatosa y la granulomatosa, la primera corresponde a la etapa más temprana de la respuesta granulomatosa y se caracteriza por una agregación desordenada de células mientras que la última se asocia con una estructura más delineada y corresponde a etapas más tardías de esta, en esta fase el miracidio que habitaba dentro del huevo ha muerto por lo que la estructura se desintegra, lo que se asocia con una reducción en la respuesta inflamatoria y por ende en una reducción significativa del tamaño de este. Al relacionar dicho estudio con nuestros resultados se puede observar que existe similitud entre ambas y que en nuestro caso los granulomas de RI8 corresponden según su distribución celular y características del huevo a granulomas de una etapa intermedia entre la pre-granulomatosa y granulomatosa mientras que los granulomas de RI20 pertenecerían propiamente a granulomas maduros.

Además, se observó que la cantidad y ubicación de colágeno en el granuloma en sus diferentes estadios de infección, es similar a lo señalado en estudios previos en los cuales observaron una acumulación excesiva del colágeno y proteínas de la matriz extracelular en el área granulomatosa, conservando la arquitectura normal del hígado en las zonas donde no existe la presencia del huevo (18,19).

Al determinar la respuesta IgM e IgG a las 8 semanas frente a PESGH, los resultados sugieren que este puede ser más eficiente en la detección de la infección, mientras que a las 20 semanas lo son los PESH con la IgM y el PESGH con la respuesta IgG. En este sentido, nuestros resultados confirman lo obtenido por Wang y cols. (20) en el cual determinaron que son los gusanos los principales productores de antígenos en fases iniciales de la infección y por tanto, inducen respuesta inmune específica e

inespecífica en la esquistosomiasis. Doenhoff y cols.(21) relacionan el mayor tamaño en los estadios adultos, con una mayor capacidad para proporcionar material antigénico, unido a una alta sensibilidad y especificidad obtenida en el inmunodiagnóstico, al ser comparados los antígenos de huevos y adultos con los antígenos de esquistosómulos.

Pienheiro y cols.(22) en su estudio hacen referencia al rol importante de los isotipos de IgG en los mecanismos de protección inmune en la infección o durante la re-infección, al contrastar sus resultados con los obtenidos en este estudio se puede observar que quizás la IgG en combinación con los PESG sea más eficaz en la detección de la infección, debido a que pueden existir antígenos comunes entre los estadios adultos y los esquistosómulos, ya que estos últimos constituyen el primer estadio de contacto y los primeros antígenos estimulantes de memoria inmunológica, esto explicaría quizás porque la IgG es más eficiente para detectar la infección empleando PESG a las 8 y 20 semanas de infección, mientras que la IgM lo son para la detección de la infección con PESH a las 20 semanas (23).

Estudios previos sugirieron que durante la infección con *S.mansoni* se podría inducir una respuesta de anticuerpos de corta duración en los seres humanos correspondiente a la inducida por los productos de excreción-secreción de los gusanos adultos, mientras que simultáneamente, se produce una respuesta inmune de larga duración en respuesta a los productos de excreción-secreción de los huevos, ya que ellos perduran a lo largo del tiempo de infección (24).

La producción de IL-10 es dependiente de la fase de infección, al inicio de esta, las células T expresan CD4⁺CD25⁻ que producen concentraciones constantes de IL-10, luego de la oviposición las células expresan CD4⁺ CD25⁺ con lo que se incrementa la producción de IL-10, con la consecuente modulación del tamaño del granuloma (25). Esto confirma lo obtenido en nuestro estudio con respecto a la concentraciones IL-10, en ratones infectados, donde se aprecia un aumento significativo de la IL-10 en RI20 con respecto a RI8, así mismo que los gusanos estimulan la respuesta TH₁ que es sustituida en la infección crónica por TH₂, caracterizada por un incremento de esta citoquina (26). No obstante, las altas concentraciones de IL-10 producidas

en el paso a TH₂ favorecen el proceso fibrótico observado durante la infección (27).

Estos mecanismos reguladores no sólo actúan sobre la respuesta TH₂, sino también en las respuestas mediadas por TH₁, tanto en ratones como en seres humanos, cuando se exponen a una infección primaria o una re-infección por esquistosoma(25).

Se conoce que los monocitos circulantes también juegan un rol importante en la modulación de las repuesta TH₁ y TH₂, presentándose bajo dos formas: monocitos CD14⁺⁺CD16^o M ϕ aC (M ϕ activados clásicamente) considerados “pro-inflamatorios” (con altos niveles de L-6, TNF- α , IL-12 e IL-1) mientras que monocitos CD14⁺CD16⁺⁺o M ϕ aA (M ϕ activados alternativamente) son considerados “pro-fibroticos” y producen grandes cantidades de IL-10 al ser estimulados con PESH, cercarias o estimulados con IL-4 e IL-13, estos M ϕ A han sido denominados “M ϕ activados Tipo 2” (M ϕ aT2) debido a su habilidad para inducir respuestas TH₂, estos poseen arginasa, una enzima responsable de la conversión de L-arginina en prolina, el cual es un aminoácido esencial que participa en la producción de colágeno y en desarrollo de fibrosis, lo que podría sugerir en nuestro estudio que el aumento de los depósitos de colágenos en RI20 se debe principalmente a la presencia de M ϕ aA lo que coincide con una respuesta TH₂ (2, 28); se conoce que en la esquistosomiasis los diferentes tipos de monocitos en pacientes con moderada a severa fibrosis periportal participan en el inmunopatogénesis de la enfermedad, ya que expresan mezcla de altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas en combinación con una baja expresión de moléculas reguladoras (29).

El aumento en los niveles de TNF- α sérico a medida que se observa un aumento en el área del granuloma y la infección encontrada en el presente estudio, son similares a reportes previos que relacionan aumento en los niveles en esta citoquina, con casos graves de fibrosis portal y hepatoesplenomegalia en la infección crónica por *S. mansoni* (25, 30). El TNF- α es considerado una citoquina pro-inflamatorias, cuya función es inducir un aumento de la respuesta inmune, mediante el reclutamiento de leucocitos al sitio de la inflamación o activación de células inflamatorias en la

infección, asociándose el TNF- α con la fibrosis peri portal (31).

En conclusión, al describir la histopatología hepática en RI8 y RI20 con *S. mansoni* se observó que existe una diferencia significativa tanto en la celularidad como en los tamaños de los granulomas en los grupos experimentales, mientras que al identificar y determinar IL-10 e TNF- α en RI8 y RI20 por *S. mansoni*, se observa que el TNF- α aumento a medida que avanza la infección, mientras que en la IL-10, esto ocurre cuando la respuesta TH₁ cambia a TH₂.

En el estudio se demostró que los productos de excreción-secreción presentan un reconocimiento mixto por parte de la IgM e IgG sérica de los ratones Balb/c infectados, lo que no permite definir con estos de forma precisa la etapa de la infección. No obstante, los resultados en ratones con 8 semanas de infección, sugieren que el alto porcentaje de positividad de la IgG, y en menor magnitud la IgM con los PESGH, pueden contribuir a mejorar la detección de la infección en una fase activa de la infección.

Referencias bibliograficas

1. Lee E, Young N, Lim N, Gasser R y Fairlie W. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. Trends Parasitol 2014; 30(2). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.005>
2. Turner J, Bourke C, Meurs L, Mbow M, Die`ye T, *etal.* Circulating CD14^{bright} CD16⁺ 'Intermediate' Monocytes Exhibit Enhanced Parasite Pattern Recognition in Human Helminth Infection. Plos Negl Trop Dis 2014; 8(4). doi:10.1371/journal.pntd.0002817.
3. Monge E, Coelho P, Tavares C. Immunologic studies in hamsters (*Cricetus auratus*) infected with *Schistosoma mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32: 677- 82.
4. Negra`o-Corre`a D, Fittipaldi J, Lambertucci J, Teixeira M, Antunes C, *et al.* Association of *Schistosoma mansoni*-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. PLoS ONE. 2014; 9(2). doi:10.1371/journal.pone.0088042.
5. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet. 2006; 368: 1106–18.
6. Noya O, Losada S, Bermúdez H, Lorenzo M, Toledo M, *et al.* Vacunas Anti-Esquistosoma. Salus. 2007; 11: 48-52.
7. Alarcón de Noya B, Ruiz-Guevara R, Colmenares C, Losada S, Noya O. Las áreas bajas de transmisión de la esquistosomiasis en Venezuela: consecuencias sobre el diagnóstico, tratamiento y control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101 (1): 29-35.
8. Queiroz R, Martins W, Silva-Moraes V, Villas-Boas S, Ribeiro E, *et al.* Antigens of worms and eggs showed a differentiated detection of specific IgG according to the time of *Schistosoma mansoni* infection in mice. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(4): 505-9.
9. Caldas I, Campi-Azevedo A, Oliveira L, Silveira A, Oliveira R, *et al.* Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Trop. 2008; 108(2-3):109-17.
10. Rosales-Borjas D, Ortiz-Ortiz L. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. SABER-ULA. 2008; 2: 89-97.
11. Barrios, E.E. *Schistosoma mansoni*: Respuesta humoral y celular en la infección unisexual o bisexual experimental y el tratamiento con Praziquantel [tesis doctoral]. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2007.
12. Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. Anna Biochem. 1981; 86: 142-46.
13. Bancroft J. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Editorial: Churchill Livingstone. 1994; 2: 43-4.
14. Borim N, Marques S, Linhares A, Magalhaes L, Zanotti E. A Study of the Granulomatous Responses Induced by Different Strains of *Schistosoma mansoni*. Interdiscip Perspect Infect 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/953524>.
15. Barrios EE, Tonino P, Delgado V, Araque W. *Schistosoma mansoni*: respuesta celular hepática de ratones Balb/c

- infectados unisexualmente. *Salus*. 2006; 10(3): 5-9.
16. Hams E, Aviello G, Fallon P. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol*. 2013; 4:1-8doi: 10.3389/fimmu.2013.00089.
17. Lundy S, Lukacs N. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Front Immunol*. 2013; 4:39: 1-18.doi: 10.3389/fimmu.2013.00039.
18. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J Adv Res*. 2013; 4: 445-52.
19. Chuah C, Jones M, Burke M, McManus D, Gobert G. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol*. 2014; 30(3) 141-50.
20. Wang J, Zhao F, Yu C, Xiao D, Song L, *et al*. Identification of proteins inducing short-lived antibody responses from excreted/secretory products of *Schistosoma japonicum* adult worms by immune proteomic analysis. *J Proteome Res*. 2013; 87: 53 - 67
21. Doenhoff M, Chiodini P, Hamilton J. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?. *Trends Parasitol*. 2004; 20(1): 35-9.
22. Pinheiro C, Ribeiro A, Cardoso F, Martins V, Figueiredo B, *et al*. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunol*. 2014; 36(7):303-12. DOI: 10.1111/pim.12118
23. El_ridi R, Tallima H, Dalton J, Donnelly S. Induction of protective immune responses against schistosomiasis using functionally active cysteine peptidases. *Front. Genet*. 2014; 5:119. doi:10.3389/fgene.2014.00119.
24. Wilson M, Cheever A, White S, Thompson R, Wynn T. IL-10 bloquea el desarrollo de resistencia a la Re-infección por *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*. 2011. 7: e1002171.
25. Scheer S, Gross S, Mouahid G, Moné H, Lamers M, *et al*. A novel tool to identify the relative contribution of lymphoid cell types that contribute to IL-10 production during the infection with *Schistosoma mansoni*: The TIGER index. *J Immunol Methods*. 2014; 406: 66-73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.008>.
26. Mazigo H, Nuwaha F, Wilson S, Kinung S, Morona D. Epidemiology and interactions of Human Immuno deficiency Virus-1 and *Schistosoma mansoni* in sub-Saharan Africa. *Infect Dis Poverty*. 2013; 2:2. <http://www.idpjournals.com/content/2/1/2>.
27. El-Ahwany E, Bauimy I, Nagy F, Zalat R, Mahmoud O, *et al*. T Regulatory Cell Responses to Immunization with a Soluble Egg Antigen in *Schistosoma mansoni*-Infected Mice. *Korean J Parasitol*. 2012; 50(1):29-35. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2012.50.1.29>
28. Stempin C, Cerban F. Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos. *Medicina*. 2007; 67: 737-46.
29. Souza J, Araujo M, Mota D, Da Paixão R, Carvalho E, *et al*. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/703653>.
30. Booth M, Mwatha J, Joseph S, Jones F, Kadzo H, *et al*. Periportal Fibrosis in *Schistosoma mansoni* Infection Is Associated with Low IL-10, Low IFN- γ , High TNF- α , or Low RANTES, Depending on Age and Gender. *J Immunol*. 2004; 172(2): 1295-1303.
31. Yu L, Sun X, Yang F, Yang J, Shen J, Wu Z. Inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, IL-13 and TNF- α alterations in schistosomiasis: a meta-analysis. *Parasitol Res*. 2012; 110:1547-1552. DOI 10.1007/s00436-011-2661-4.