

El factor de crecimiento del endotelio vascular hepático en la infección murina por *Schistosoma mansoni*

Emilia Elena Barrios^{1,2}, Víctor Delgado¹, Wolfan Araque¹, Juan F Quintana^{1,3}, Olga Ojeda¹, Jennifer Ayala¹.

¹ Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolIP).

² Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

³ Centre for Infection, Immunity and Evolution, Ashworth Laboratories, University of Edinburgh, West Mains Road, Edinburgh EH9-3JT, UK.

Correspondencia: Emilia Barrios

E-mail: barrios.emilia@gmail.com

Recibido: Abril 2013 **Aprobado:** Septiembre 2013

RESUMEN

Los antígenos secretados por los huevos de *S. mansoni* inducen la proliferación de células endoteliales *in vivo*, así como la producción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), sugiriendo que la patogénesis en la esquistosomiasis se relaciona con eventos angiogénicos. Se evaluó la expresión del VEGF, como una medida de angiogénesis estimulada por los huevos y los gusanos de *S. mansoni*, en la infección Bisexual (BIS) y los gusanos adulto (infección UNI) en el hígado de ratones Balb/c, antes y después del tratamiento con PZQ. Los resultados indican que tanto la infección UNI como BIS son capaces de estimular la producción de VEGF en tejido hepático, lo que explica la vascularización anómala durante este cuadro infeccioso. Este proceso se acompaña con la presencia de un elevado número de infiltrados leucocitarios en los sitios donde se observa lesión tisular; la producción de VEGF remite tras 48 de tratamiento con PZQ. Estos resultados indican que la producción anómala de VEGF junto con la intensa respuesta pro-inflamatoria asociada no solo a la actividad de VEGF sino también a los infiltrados leucocitarios observados en el tejido hepático,

causada tanto por los huevos secretados como por las formas adultas de *S. mansoni* son los mecanismos que subyacen a las lesiones granulomatosas observadas durante el curso de la esquistosomiasis, pudiendo al menos revertirse el incremento en la vascularización mediante el uso de PZQ.

Palabras clave: *S. mansoni*, infección experimental, VEGF, inflamación crónica.

ABSTRACT

The endothelial growth factor vascular infection in murine liver by *Schistosoma mansoni*

The antigens secreted by eggs of *S. mansoni* induce the proliferation of endothelial cells *in vivo*, as well as the production of Factor Vascular Endothelial Growth factor (VEGF), suggesting that the pathogenesis of schistosomiasis relations with angiogenic events. We evaluated the expression of VEGF, as a measure of angiogenesis stimulated by the eggs and worms *S. mansoni* in infection bisexual (BIS) and adult worms (UNI infection) in the liver of BALB / c mice before and after treatment with PZQ. These results indicate that abnormal production of VEGF with intense pro-inflammatory response not only associated with the activity of VEGF but also leukocyte infiltrates observed in the liver tissue caused by both secreted and eggs by adult forms *S. mansoni* are the mechanisms underlying granulomatous lesions observed during the course of schistosomiasis, and can be reversed at least the increased vascularization by using PZQ.

Key words: *S. mansoni*, experimental infection, VEGF, inflammation chronic.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares a partir de vasos pre-existentes mediante activación de las células endoteliales, degradación de la membrana basal proximal y matriz extracelular, migración direccional y proliferación de las células endoteliales. En su inducción participan la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y ciertas familias de quimioquinas (1).

Este proceso ocurre en condiciones fisiológicas, como son, ovulación, embarazo y cicatrización de heridas (1) y en la patología de la inflamación crónica y el crecimiento tumoral (2). Además, es un mecanismo importante en la neovascularización del sistema arterial hepático, particularmente en lesiones que reducen el flujo en la vena porta hepática (3). Algunos reportes también relacionan al VEGF con procesos inflamatorios y cáncer, especialmente cáncer de vejiga, asociado a infecciones por especies del género *Schistosoma* producto de alteraciones histológicas y moleculares (4,5).

En artritis reumatoidea, se demostró que la inflamación sinovial, la hiperplasia y angiogénesis en las articulaciones puede ser regulada por el VEGF, como lo demuestra el efecto que la administración de bloqueadores del receptor del VEGF, Flt-1, en la disminución de la sistematología de la enfermedad en estos pacientes (6).

La angiogénesis en enfermedad inflamatoria crónica se ha estudiado extensamente, no obstante, aún cuando los granulomas periovulares son similares a una herida, en los que se produce tejido granuloso menos vascularizado a medida que la cicatriz se torna mas compacta y crónica (7) y la respuesta granulomatosa hepática implica inflamación y daño a tejido con mecanismos de señalización inflamatorios comunes a otras patologías, son pocos los estudios orientados a evaluar la contribución de la angiogénesis en la patogénesis de la esquistosomiasis. Ensayos *in vitro* demostraron que los antígenos solubles del huevo inducen proliferación de las células endoteliales (8), y que la angiogénesis contribuye en la progresión de la fibrosis y cirrosis hepática, característica de la esquistosomiasis (9). Como parte del proceso, los antígenos de cercaria estimulan la producción de VEGF y FGF2 por los

macrófagos alveolares (10). Mientras que los productos secretados por los huevos de *S. mansoni* promueven la producción de VEGF y la angiogénesis completa en líneas celulares de cordón umbilical humano (11).

Los hallazgos anteriores enfatizan el papel inductor de los productos de excreción-secreción de los huevos en el proceso de angiogénesis, sustentado sobre la base de que el granuloma constituye el elemento patogénico mas importante de la esquistosomiasis; sin quedar claro el papel del gusano adulto ubicado a nivel de la circulación intrahepática, venas mesentéricas y hemorroidales en el intestino, que pudiera actuar como elemento obstructivo y estimulador del proceso angiogénico.

Dada la relación entre angiogénesis y progresión de fibrosis y cirrosis alcohólica (9), uno de los aspectos interesantes a evaluar en ese contexto lo constituye sin duda, conocer una vez aplicado el tratamiento, con drogas como el praziquantel (PZQ), que ocurre con la activación de etapas de la angiogénesis o el proceso completo.

Como parte del estudio del proceso de angiogénesis en asociación con patología, autores pioneros en el área han enfocado su interés en el VEGF (12), una proteína termoestable considerada un factor de crecimiento que tiene efectos mitogénicos sobre las células endoteliales, inicialmente aislado de células de la corteza renal, epiteliales lenticulares, endoteliales corneales, queratinocitos y fibroblastos (13).

Es considerado como el mayor mediador de angiogénesis patológica, su expresión y la de sus receptores Flt-1 y Flk-1/KDR, se relacionan con la formación de nuevos vasos en embriones de ratones y ratas, como lo demuestra la interrupción de la formación de los islotes sanguíneos en embriones carentes de un alelo del gen para el VEGF (12).

Por tanto, el objetivo del estudio fue evaluar la expresión del VEGF, como una medida de angiogénesis estimulada por los huevos y los gusanos adultos de *S. mansoni* en el hígado de ratones, pre y post- tratamiento con PZQ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estadios del parásito. Se empleó el aislado Puerto Rico de *S. mansoni*, mantenido por pases sucesivos *Biomphalaria glabrata* y hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*).

Infecciones experimentales y tratamiento con PZQ. Ratones Balb/c machos de 8 semanas fueron infectados por vía percutánea e inmersión con 100 cercarias obtenidas de infecciones clonales del molusco o infección unisexual (UNI) o con cercarias de infecciones con 10 miracidios o infección bisexual (BIS). Adicionalmente, se evaluó un grupo de ratones controles no infectados (RCNI). Cada grupo experimental (n=45) entre la semana 7 y 8 de infección y RCNI, fue tratado con PZQ (40 µg/g de peso) por vía intragástrica.

Moldes de las ramificaciones de la vena porta hepática. Los ratones infectados (BIS y UNI) e infectados y tratados (UNIt y BIS_t, 48 h y 2 meses postratamiento), controles sanos (RCNI) y sanos tratados (RCNI_t), se anestesiaron en cámara con cloroformo, se expuso la vena porta hepática y se inyectó a través de ella con acetato de etilo al 12% (v/v) en acetona pura coloreada con azul de Evans (1% p/v). Luego de la polimerización del acetato de etilo, los hígados se sumergieron en agua por 48 h y luego se digirieron con ácido clorhídrico al 1% (v/v) por 48 h. Los moldes obtenidos se lavaron con agua destilada (14) y se fotografiaron en un fotomicroscopio Nikon, E-600 con cámara digital Coolpix 995.

Detección de células VEGF positivas en el hígado. Las células hepáticas positivas para VEGF fueron evaluadas mediante

inmunohistoquímica en ratones sanos e infectados entre la séptima y octava semana de la infección y a 48 h y dos meses del tratamiento con PZQ, por cuadruplicado. En el procedimiento se emplearon secciones hepáticas fijadas con formalina neutra al 10% e incluidas en parafina y la metodología de la biotina estreptavidina peroxidasa (15). A las secciones hepáticas de 4 µm se incubaron con un anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-VEGF de ratón (Santa Cruz Biotechnology, CAL, USA), diluído 1:25 e incubado por 90 min. Como anticuerpo secundario se empleó una anti-IgG de conejo conjugada a biotina y se incubó por 45 min en la secciones, seguido de la adición de estreptavidina peroxidasa (kit Immunocruz Biotechnology, CAL, USA) por 20 min. A las láminas lavadas en PBS se adicionó 3-amino-9-etil-carbazol, se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se hizo montaje en Cristal mountain medium (Santa Cruz Biotechnology, CAL, USA). En el control negativo, el anticuerpo primario se reemplazó por PBS. Las observaciones se realizaron en un microscopio Nikon E-600 con cámara digital Coolpix 995.

Análisis de los resultados. El número de células VEGF positivas expresadas como la media ± desviación estándar se estimó en ambos modelos de infección antes y después del tratamiento y fue evaluada con la prueba T de Student, empleando el paquete estadístico STATISTICA versión 9. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La construcción de moldes de ramificaciones de la vena porta hepática se observó un discreto aumento en el número de ramificaciones de la vena porta hepática como consecuencia de la infección BIS, en ratones no-infectados, con infección UNI pre y post-tratamiento o BIS post-tratamiento (Fig. 1A-H).



Figura 1. Moldes de ramificaciones de la vena porta hepática en ratones con infecciones UNI y BIS, a las 48 h y 2 meses post-tratamiento (A-D).

Contrario a lo anterior, la inmunorreacción del VEGF en células del infiltrado inflamatorio fue intensa alrededor de la vena centrolobulillar y de zonas aparentemente no-vascularizadas, en las infecciones UNI y BIS.

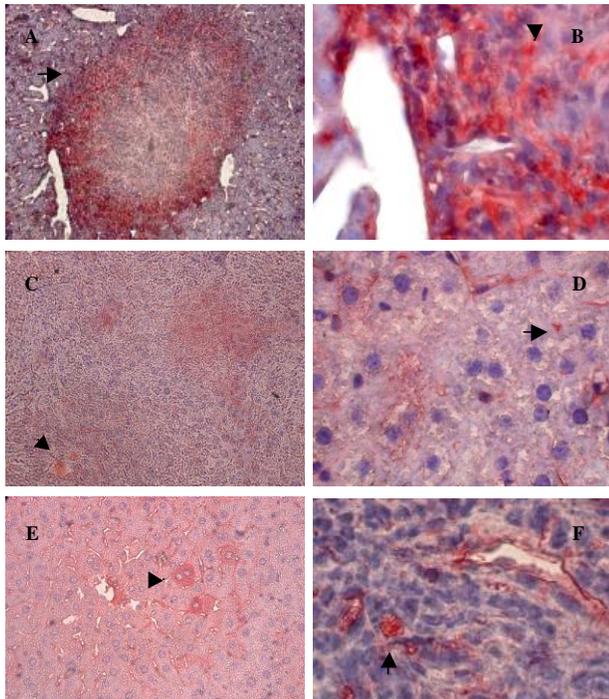


Figura 2. Inmunolocalización de células VEGF positivas en secciones hepáticas de la infección UNI, numerosas células inmunorreactivas en sitios aparentemente no vascularizados (flecha, A), cercanos a la vena centrolobulillar (B). A las 48h post-tratamiento en pequeños grupos celulares (C y D, flecha). Escasas células inmunorreactivas a los 2 meses post-tratamiento (E y F, cabeza de flecha). En A, B, D y E, barra =25 μ m. En C, 50 μ m. En F, 100 μ m.

En la infección UNI se observaron gran número de células VEGF positivas asociadas al infiltrado inflamatorio hepático, en un promedio de 42 ± 26 células por μm^2 , en sitios aparentemente no vascularizados, en grupos celulares constituidos por incontables células (Fig. 2A) y en las venas centro lobulillares (Fig 2B), a las 48 h del tratamiento, la inmunorreactividad se observó en pequeños grupos celulares (16 ± 12) en sitios no-vascularizados que se extienden en el tejido (Fig. 2C), algunas de ellas cercanas a los pigmentos del gusano (Fig. 2D).

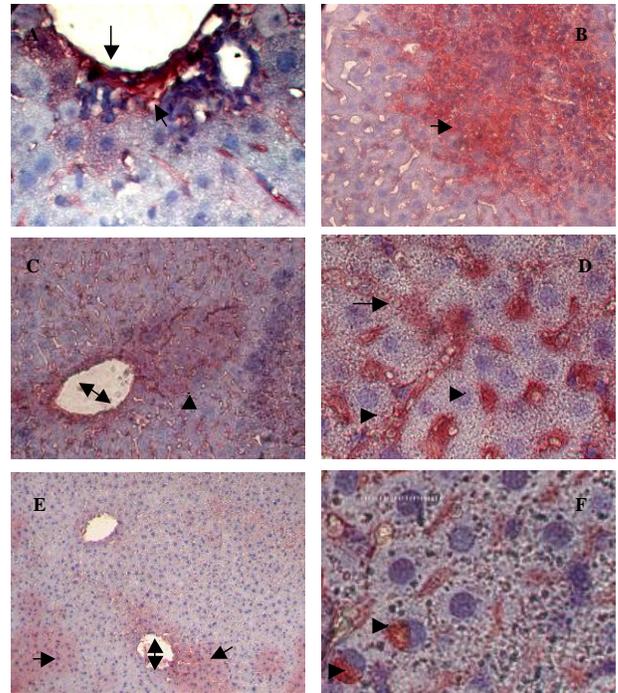


Figura 3. Inmunolocalización de células VEGF positivas en secciones hepáticas de la infección BIS (A, flecha) en una vena centro-lobulillar (A, doble flecha) y en grupos (B, flecha). A las 48 h post-tratamiento en pequeños grupos celulares alrededor de las venas centro-lobulillares (C y D, flechas). Escasa inmunorreactividad a los 2 meses post-tratamiento (E y F, flechas). En B, Cy E, barra= 50 μ m. En A y D, 25 μ m. En F, 10 μ m

A 2 meses de tratamiento las células positivas fueron escasas (7 ± 3) en grupos celulares (Fig. 2E), mientras que en zonas vascularizadas se agruparon células intensamente inmunorreactivas. En la infección BIS, el número de células

VEGF positivas fue 99 ± 58 , localizadas en sitios similares a los descritos en la infección UNI, formando grupos de cientos de células (Fig. 3A y 3B). A las 48 h post-tratamiento el número de células fue 32 ± 17 , rodeando las venas centro lobulillales y se difunde a otros sitios del tejido (Fig. 3C y 3D). El mismo patrón se observó a 2 meses post-tratamiento con 14 ± 9 células por μm^2 (Fig. 3E y F)

En el tejido hepático de los RCNI (4B), RCNI a las 48 h y dos meses (Fig. 4C y D, respectivamente) se encontró un número de células VEGF positivas de 13 ± 5 ; 10 ± 4 y 13 ± 5 por μm^2 , respectivamente.

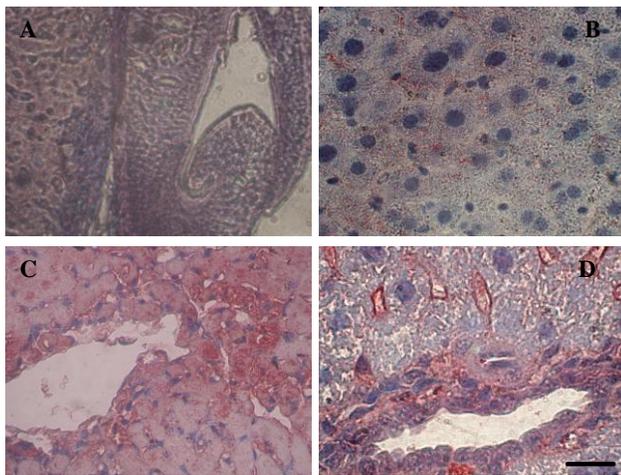


Figura 4. En las secciones hepáticas: controles negativos (A), sano a las 48 h (B) y a los 2 meses del tratamiento con PZQ (C y D). En A, B y D, barra =25 μm . En C, 50 μm .

Los resultados demostraron en la infección UNI un incremento de células VEGF positivas y su ubicación corresponde a zonas asociadas con acumulación de productos del gusano o a su presencia. Una reducción importante en las células VEGF positivas a 48 h del tratamiento, las cuales caen a cifras similares a los controles a 2 meses del tratamiento. En la infección BIS, como era de esperarse, el número de células VEGF positivas es 8 veces mayor a los controles, en esta condición los huevos y gusanos en el tejido son los

responsables de tal reacción, a 48 h del tratamiento se observó una caída de 3,2 veces, hasta alcanzar contajes similares a los controles no-infectados a 2 meses del tratamiento.

DISCUSION

La metodología de moldes de ramificaciones de la vena porta, se empleó con éxito para estudiar el proceso de neovascularización previa obstrucción parcial de la circulación de la vena porta hepática como un medio de inducir hipertensión portal (3) y en el estudio de los vasos sanguíneos hepáticos en ratas infectadas con *Fasciola hepática* (14). La ausencia o el discreto aumento en neovascularización en nuestros resultados se puede explicar sobre la base a que la naturaleza e intensidad del daño al tejido vascular en la infección UNI o BIS es menor que el ocasionado por agentes químicos (9), así como el tiempo de evaluación (8 semanas) de infección en este trabajo.

El alto número de células VEGF positivas en hígado de animales infectados bisexualmente se corresponde con los reportes de inducción de la expresión del VEGF en las células hUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana, siglas en inglés) por antígenos solubles de huevo *in vitro* (11). Estos hallazgos permiten establecer una relación entre infección UNI y angiogénesis, y que esta parece afectada por el tratamiento con PZQ, puesto que observamos contajes menores a las 48 h y 2 meses post-tratamiento, lo que jugaría un rol determinante en la mejoría de los síntomas en pacientes tratados con PZQ. La expresión de VEGF y sus receptores por las células tumorales en cáncer de mama son postuladas como un novel mecanismo de inhibición de apoptosis, que favorece la migración de dichas células (16) y el hallazgo de disminución de un factor angiogénico tan importante como el VEGF ofrece un criterio

para responder ciertas interrogantes en relación con la terapia con PZQ, así como relacionar terapia con las lesiones granulomatosas e inmunomodulación vía posiblemente procesos de apoptosis de linfocitos (17), puesto que se ha demostrado que los niveles de expresión de VEGF y sus receptores está íntimamente relacionado con la respuesta pro-inflamatoria (6).

La fibrosis observada en torno a las lesiones tisulares como producto de la infección parasitaria es una consecuencia directa del ambiente proinflamatorio que se observa en el sitio de la lesión (predominantemente del tipo Th2. Lo que resulta interesante es que estos resultados parecen indicar, además, que el parásito hace uso de la respuesta proinflamatoria derivada de una expresión “desregulada” de VEGF como un mecanismo de protección. El ambiente proinflamatorio establecido en el sitio de la lesión favorece el reclutamiento y actividad de macrófagos, generando así una protección o un “aislamiento físico” por la formación de lesiones granulomatosas dentro de las cuales se encuentran los estadios adultos del parásito (6).

Este es el primer reporte que relaciona al factor angiogénico VEGF con el gusano adulto de *S. mansoni* y los cambios a causa del tratamiento con PZQ. Además resulta interesante el incremento de células VEGF positivas en la infección UNI, porque sugiere que la activación de la angiogénesis es posible en etapas previas a la fibrosis y/o cirrosis hepática, donde el principal elemento inductor es el gusano. En contraste, con el papel atribuido exclusivamente a los productos de excreción-secreción de los huevo en el proceso angiogénico en la esquistosomiasis (7).

La importancia de estos hallazgos es evidente en virtud que se conoce que el VEGF, controla la movilización e incorporación de la células

endoteliales progenitoras durante el proceso de formación de nuevos vasos (18).

Adicionalmente, estos resultados soportan la hipótesis propuesta por otros autores de que el VEGF representa un potencial marcador del éxito del tratamiento con PZQ, basado en que los niveles séricos de este factor se encuentran aumentados en pacientes con formas hepatoesplénicas e intestinales de la infección por *S. mansoni* (19) y en intestino, hígado y bazo de ratones infectados asociado al microambiente de hipoxia (20).

En conclusión, los resultados permiten confirmar que la infección UNI y BIS el VEGF se produce en células hepáticas y células inflamatorias en respuesta a la estimulación simultánea de los estadios huevo y gusano, corroborando la relación entre la infección por *S. mansoni* y angiogénesis y demostrando la participación del gusano adulto en la patogénesis de la esquistosomiasis y el efecto del tratamiento con PZQ sobre la producción del VEGF, en forma temprana. Estos hallazgos son perfectamente congruentes con evidencias actuales que suponen una participación de los procesos de angiogénesis en la formación del granuloma y en la regeneración hepática (21).

Financiamiento. El trabajo fue financiado por los Proyectos de Investigación CDCH-UC N° 00220-08 y CDCHUC N° 2010-004.

REFERENCIAS

1. Salcedo R, Wasserman K, Young H.A, Grimm M.C, Zack-Howard O M, Ander MR, Kleinman H K, Murphy WJ, Oppenheim J J. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells. *Am J Pathol* 1999; 154: 1125-1135.
2. Kuruppu D, Christophi C, O'Brien PE.. Microvascular architecture of hepatic metastases in a mouse model. *Discussion* 1997; 158. 10: 149-157.

3. Yokohama Y, Baveja R, Sonin N, Clemens M G, Zhang J X. (Hepatic neovascularization alter partial portal vein ligation: novel mechanism of chronic regulation of blood flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 21-31.
4. Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib Microbiol* 2006; 13: 81-100.
5. El-Chennawi F A, Auf F A, Metwally SS, Mosaad Y M, Shaaban A A, El-Baz M A, Tawhid Z E, Lotfy Z F. Vascular endothelial growth factor, p53, and the H-ras oncogene in egyptian patients with bladder cancer. *World Gastrointest Oncol* 2009; 15: 62-68.
6. Yoo S, Kwok S, Kim W. Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention. *Mediators Inflamm* 2008; 129873. Published online 2009 February 10. doi: 10.1155/2008/129873.
7. Baptista AP, Andrade Z A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 183-185.
8. Freedmen DO, Ottesen EA. Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation *in vitro*. *J infect Dis* 1988; 158: 556-562.
9. Guang-Fu, X, Xin-Yue W, Gui-Ling G, Peng-Tao L, Xu J, De-Lu T, Liang-Duo J, Jin-Xiang Y.. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 238-243.
10. Shariati F, Pérez-Arellano JL, Carranza C, López-Abán J, Vicente B, Arefi M, Muro A. Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. *Experimental Parasitol* 2011; 128: 44-49.
11. Loeffler D A, Lundy S, Singh K P, Gerard H C, Hudson A P, Boros D L. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Infect Dis* 2002 ;185: 1650-1656.
12. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'shea S, Powell-Braxton L, Hillan K J, Moore M W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation on the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.
13. Ferrara N, Henzel W. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor for vascular endothelial cells. 1989. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science>. [Consulta: 2007, Febrero, 15].
14. Shirai W, Sato H, Shibuya H, Naito K, Tsukise A. Anatomicopathological study of vascular and biliary systems using cast samples of *Fasciola*-infected rats livers. *J Veterinary Med* 2006; 53: 239-242.
15. Barrios EE, Tonino P, Delgado V, Araque W. *Schistosoma mansoni*: respuesta celular hepática de ratones Balb/c infectados unisexualmente. *Salus* 2006; 10: 6-13.
16. Mercurio A M; Lipscomb E A., Bachelder R E. Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mam Gland Biol Neo* 2005; 10: 283-290.
17. Rumbley C A, Sugaya H, Zekavat A, Perrin P, Phillips M. Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by FAS-mediated apoptosis in murine schistosomiasis. *Am Trop Med Hyg* 2001; 65: 442-449.
18. Skora J, Biegus J, Pupka A, Barc P, Sikora J, Szyber P. Molecular basics of angiogenesis. *Postepy Hig Med Dosw* 2006. 60: 410-415.
19. Tawfeek GM, Alafifi A M, Azmy MF. Immunological indicators of morbidity in human schistosomiasis mansoni: role of vascular endothelial growth factor and anti-soluble egg antigen IgG4 in disease progression. *J Egypt Soc Parasitol* 2003; 33: 597-614.
20. Paiva Araujo A, Ferraz Frezza T, Marques Allegretti S, Giorgio S. Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. *Exp Mol Pathol* 2010; 89: 327-333.
21. Anthony BJ, Ramm GA, McManus D. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends Parasitol* 2012; 28: 572-579.