

# AKASMERIA



ppi 201502ZU4670  
Esta publicación científica en formato digital es continuidad de la  
revista impresa ISSN 00755222

**Volumen 45. N° 2. Julio - Diciembre 2017**

Universidad del Zulia  
Facultad de Medicina  
Escuela de Medicina  
Departamento de Enfermedades  
Infecciosas y Tropicales  
Maracaibo, Venezuela

**Kasmera** 45(2): 107-118, Julio-Diciembre 2017

---

## Efecto del praziquantel en los receptores angiogénicos, citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en la esquistosomiasis intestinal murina.

The effect of praziquantel in the angiogenic receptors, inflammation and inflammatory cytokines on the murine intestinal schistosomiasis.

**Barrios Emilia E<sup>1 2</sup>, Ochoa U Genesis<sup>1 2</sup>, Castillo C. Angel<sup>1 3</sup>,  
Cosenza C. Miguel<sup>1 3</sup>, Eva A Velásquez<sup>1 4</sup>, Alejandra C. Rojas<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP)

<sup>2</sup>Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional de la Escuela de Bioanálisis-Sede Carabobo.

<sup>3</sup>Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología (FACYT)

<sup>4</sup>Departamento Clínico Integral de la Escuela de Bioanálisis-Sede Aragua. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

**Autor de correspondencia:** Prof. Emilia Barrios. **e-mail:** barrios.emilia@gmail.com

---

### Resumen.

Los estudios en torno al papel patogénico del *Schistosoma mansoni* se enfocan en el daño hepático y la respuesta inmune en el hospedador definitivo, en contraste a la escasa información en relación a la patología intestinal. A tal fin, se evaluó el efecto del praziquantel en los receptores angiogénicos, citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en la esquistosomiasis intestinal murina. La respuesta inflamatoria granulomatosa intestinal se midió en secciones histológicas teñidas con H&E; la detección de TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ , el VEGF y sus receptores (FLK1 y FLT1) mediante inmunohistoquímica y ELISA, en suero e intestino de ratones BALB/c infectados con *S. mansoni* a las 8 (RI8S) y 20 semanas (RI20S), y ratones con 8 semanas de infección a los quince días de post-tratamiento, con praziquantel 40  $\mu$ gr/gr (RPT). En RI8S se observaron granulomas pequeños (11304  $\mu$ m<sup>2</sup> en promedio), sin bordes definidos ni zonas marcadas dentro del granuloma, y granulomas de gran tamaño con bordes definidos (70650  $\mu$ m<sup>2</sup>) sin zonas definidas dentro del granuloma, ambos con predominio de macrófagos y presencia de plasmocitos. En RI20S, los granulomas presentan una zona interna constituida por abundantes macrófagos y escasos plasmocitos, y una externa constituida solo por macrófagos (11985  $\mu$ m<sup>2</sup>). En RPT no se apreciaron granulomas, solo algunos focos inflamatorios cercanos a la *muscularis mucosae* y las glándulas de Lieberkuhn. La Inmunolocalización en el intestino solo fue positiva en RPT para VEGF y sus receptores, TGF- $\beta$  e IL-10; Los resultados muestran una discreta respuesta en cuanto a tamaño del granuloma, celularidad y la expresión de citocinas a nivel intestinal.

**Palabras clave:** *Schistosoma mansoni*, praziquantel, respuesta inflamatoria, VEGF, FLT- 1, FLK-1, TGF- $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ .

---

Recibido: 02/08/2016 Aceptado: 29/06/2017

## Abstract.

The studies on the pathogenic role of the *Schistosoma mansoni* focus on the hepatic damage and the immune response of the final host, in contrast to the limited information regarding intestinal lesion. This work evaluates. Intestinal granulomatous inflammation was measured in histological sections the effect of praziquantel in the angiogenic receptors (FLK1 and FLT1), inflammation and inflammatory cytokines on the murine intestinal schistosomiasis stained with H&E; the detection of TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF and its receptors was carried out by immunohistochemistry and ELISA, in serum and intestine sections of BALB/c mice infected with *S. mansoni* at 8 (RI8S) and 20 (RI20S) weeks post-infection, and mice infected for 8 weeks and evaluated 15 days post-treatment with praziquantel 40  $\mu\text{g}/(\text{RPT})$ . In RI8S small granulomas (11.304  $\mu\text{m}^2$  average), without sharp or marked edges within the granuloma; and large granulomas (70.650  $\mu\text{m}^2$ ) with defined borders without defined zones within the granuloma, In both groups of mice macrophages predominated and plasma cells were present. In RI20S, granulomas have an inner zone composed by abundant macrophages and few plasma cells, and external zone constituted only by macrophages (11.985  $\mu\text{m}^2$ ). In RPT, granulomas were not observed, only a few inflammatory foci nearby the *muscularis mucosae* and the Lieberkuhn glands. Localization of immune molecules in the intestine was only positive in RPT for VEGF, its receptors, TGF- $\beta$  and IL-10; the results show a discrete response over the granuloma size, cellularity and cytokine expression at intestinal level.

**Key words:** *Schistosoma mansoni*, praziquantel, inflammatory response, VEGF, FLT- 1, FLK-1, TGF- $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ .

## INTRODUCCION

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria transmitida a través de la penetración por piel de larvas de tremátodes de la familia Schistosomatidae, presentes en agua. Tres de las especies principales que infectan al humano (*Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* y *Schistosoma mansoni*), afectan a más de 249 millones de personas en el mundo, con una carga de morbilidad mundial de aproximadamente 24-56 millones (1).

La infección por *S. mansoni* puede causar esquistosomiasis con toque a nivel hepático e intestinal, en más de 100 millones personas que viven en las áreas endémicas de la enfermedad; principalmente en África, Sudamérica y el Caribe, lo que hace de esta especie de esquistosoma la más extendida por el mundo (1,2).

*S. mansoni* presenta un ciclo de vida digenético alternado entre el hospedador intermediario, moluscos del género *Biomphalaria* y un hospedador definitivo, el

hombre y otros mamíferos. En *B. glabrata*, el parásito se multiplica poliembriónicamente, hasta alcanzar el estadio de cercaria, estadio que infecta al hospedador definitivo; donde continua su desarrollo a gusano adulto sexualmente diferenciado. Estos se ubican en el sistema portal intra-hepático, se aparean y migran contra corriente hacia las venas mesentéricas, donde la hembra grávida expulsa los huevos (1,2).

Algunos huevos quedan atrapados en la pared intestinal y los que la atraviesan van a las heces, constituyendo elemento crucial de la transmisión. Otros son arrastrados por la circulación al hígado, donde inducen una intensa reacción inflamatoria granulomatosa, ocasionando hepatoesplenomegalia, hepatitis, fibrosis, cirrosis e hipertensión portal (1).

Los huevos en el tejido intestinal generan una respuesta granulomatosa, similar a la hepática, más no idéntica, responsable de la sintomatología gastrointestinal (diarrea, colitis, anorexia, náusea y dolor abdominal), relacionada a la severidad de la infección (1,2).

En la infección murina aguda por *S. mansoni*, la respuesta inmune frente a los antígenos del parásito adulto es fundamentalmente de linfocitos T cooperadores del tipo 1 (Th1). Cuando comienza la oviposición, aproximadamente a las 6 semanas de la infección, predomina la respuesta Th2 debida a la interacción de los epítopes carbohidratos de los antígenos del huevo con las células dendríticas. Esto ocasiona un aumento en la producción de la interleucina 13 (IL-13), citocina clave en el desarrollo de complicaciones hepato-esplénicas y fibrosis. Alternativamente, los macrófagos activados y la interleucina 10 (IL-10), limitan la inflamación granulomatosa inicial a las ocho semanas de la infección (1).

La IL-10 y el Factor de Crecimiento y Transformación  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) son considerados citoquinas que contribuyen a limitar la inflamación hepática, mediante un mecanismo que no está del todo claro, no obstante, se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-TGF- $\beta$  e IL-10 suprimen las citoquinas pro-inflamatorias y el daño hepático durante la esquistosomiasis aguda (1), mecanismo relacionado con un aumento de la respuesta TH17. Similarmente, el Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) posee una potente actividad reguladora sobre la respuesta Th2, vía la inhibición del receptor para la IL-13 (3).

Por su parte, el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), constituye un regulador clave de la respuesta inmune, puesto que puede aumentar la inflamación mediada por Th2 (4). No obstante, el tratamiento con praziquantel, medicamento de elección en la esquistosomiasis, disminuye la expresión del VEGF a las 48 h de su administración en ratones infectados con *S. mansoni* (5).

Lo anterior es importante puesto que se dispone de un número limitado de medicamentos para el tratamiento de la esquistosomiasis, de los cuales el praziquantel (PZQ) es el menos costoso y hasta ahora el más eficaz contra todas las especies de esquistosomas que infectan a los seres humanos (2, 3). Sin embargo, el medicamento es eficaz solo contra las formas sexualmente maduras del parásito, no así sobre las cercarias que se encuentran invadiendo a través de la piel, ni sobre esquistosomas juveniles (6, 7,8).

En esquistosoma el praziquantel causa graves daños al tegumento, ocasionando vacuolización e interrupción de los procesos fisiológicos del parásito en los tejidos sub-tegmentales (9). Además, el daño de éste medicamento a nivel del tegumento se traduce en cambios antigénicos y en la pérdida de la habilidad del parásito para escapar del sistema inmune, lo que hace que la respuesta inmune del hospedador sea realmente la clave en el éxito del tratamiento (7, 8, 9).

Es escasa la información en relación a la morfología básica de las alteraciones intestinales observadas en la esquistosomiasis, causada por *S. mansoni*, particularmente en cuanto al tiempo de la infección, y efectos del tratamiento con PZQ, en éste tejido.

Por tanto, es importante estudiar el papel que desempeñan las citocinas IL-10, el TGF- $\beta$ , el TNF- $\alpha$ , el VEGF y sus receptores (FLT-1 y FLK-1), debido a la relación existente entre éstos y los procesos de fibrogénesis, angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular, morfogénesis tisular, quimiotáxis, proliferación y diferenciación celular (2), en el tejido intestinal, de los cuales tampoco existe extensa documentación.

En vista de esto, el presente estudio fué dirigido a evaluar el efecto del praziquantel en los receptores angiogénicos, citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en el tejido intestinal, en la esquistosomiasis murina, mediante el estudio de la celularidad intestinal y la participación del VEGF, sus receptores, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, en ratones BALB/c infectados con *S. mansoni* y tratados con praziquantel, a fin de conocer el papel de estas citocinas en la patogénesis de la esquistosomiasis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de estadios de *Schistosoma mansoni*.** Se utilizó el aislado "Puerto Rico" del *S. mansoni*, obtenido a partir de un ciclo de mantenimiento entre *Biomphalaria glabrata* y hámster dorado (*Mesocricetus aureatus*) (10).

**Infección y grupos de experimentación.** Las cercarias de *S. mansoni* obtenidas de caracoles *B. glabrata* con cinco semanas de infección, se emplearon en la infección de ratones BALB/c machos

con seis semanas de edad, empleando un inóculo de aproximadamente 100 cercarias; vía percutánea durante 1h a temperatura ambiente. Los ratones se dividieron en 4 grupos: grupo control sano no infectado (RS), ratones infectados por 8 semanas (RI8S), ratones infectados por 20 semanas (RI20S), y otro de ratones con 8 semanas de infección, quince días post-tratamiento con praziquantel (RPT). El número de ratones empleados, fue de 20 por cada grupo.

A los ratones del grupo RPT se les administró una dosis de 40 µg/gr de praziquantel por peso del animal, vía intragástrica a la 8va semana de infección. En este grupo de ratones los ensayos se realizaron 15 días posteriores a la administración del tratamiento.

Durante el sacrificio a cada ratón de los grupos experimentales y controles, se les tomó sangre mediante punción cardíaca y el suero fue separado por centrifugación de la sangre a 2500 g por 10 min a 4 °C. Inmediatamente se les retiró el intestino destinado al procedimiento histopatológico. Todos los procedimientos se hicieron siguiendo los lineamientos del Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT (11).

**Histopatología intestinal.** Los intestinos se fijaron con paraformaldehído (4% p/v)-glutaraldehído (0,2% v/v) en tampón Fosfato Millonig (0,1 M; pH 7,2-7,4). Luego seccionaron de intestinos de RS, RI8, RI20 y RPT fijados, fueron incluidas en parafina, mediante el protocolo histológico convencional. Las secciones intestinales de 4 µm de espesor se colocaron en láminas portaobjeto previamente tratadas con poli-L-lisina (0,2 % p/v en agua). Posteriormente, se hizo el desparafinado por incubación del corte a 60 °C por 30 min y lavado con xilol. El tejido se hidrató con etanol 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% diluida en etanol.

En estas secciones se determinó la composición celular observándose 10 campos por lámina de cada grupo 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 10X, a la cual se restó el espacio ocupado por los huevos del parásito y se expresó en µm<sup>2</sup>.

**Detección de TGF-β, VEGF, FLK-1 y FLT-1.** La detección de citocinas en suero se efectuó mediante el método de ELISA indirecto. La sensibilización se hizo con sueros de ratones BALB/c con 8 y 20 semanas de infección, diluidos 1:50 en tampón carbonato- bicarbonato pH 9,5. Estos se incubaron 12 horas a 4 °C en una placa de microtitulación de 96 pozos (Immulon 1B), transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados sucesivos con 200 µL de PBS (0,15 M pH 7,5) + tween al 0,05% (v/v). Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween (BSA en PBS-T), por 1 hora a 37 °C. Se emplearon como anticuerpos primarios anti-TGF-β, anti IL-10, anti-TNF-α, anti-VEGF, anti-FLK-1 y anti-FLT-1 de ratón en una dilución 1:500 en BSA al 1% en PBS-Tween, y fueron incubados por 1 hora a 37 °C. Luego se agregó como anticuerpos secundarios un anti anti-IgG total conjugada a peroxidasa en una dilución 1:500 con BSA al 1%. El revelado se hizo adicionando una solución de 40 µg de orto-fenilendiamina (ALDRICH), diluidos en 20 µl de peróxido de hidrógeno en 100 ml buffer fosfato-citrato pH 5. La lectura se hizo a 450 nm en un lector Multiscan Thermo Labsystem (12).

**Inmunohistoquímica.** Se realizó una detección localizada en tejido intestinal de marcadores pro-inflamatorios y profibróticos (TGF-β, TNF-α y IL-10) y VEGF y sus receptores (FLT-1 y FLK-1) a través de la técnica de inmunohistoquímica. Para esto, seccionaron de 4 µm incluidas en parafina, se procesaron por la metodología de la biotina estreptavidina peroxidasa (5). Las secciones se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-TGF-β, TNF-α, IL-10, VEGF, FLT-1 y FLK-1 de ratón en dilución 1:50 en solución de bloqueo (BSA 0,5% en PBS pH 7,5-7,6; 0,1 M), por 90 min. Como anticuerpo secundario se empleó una anti-IgG de ratón producida en conejo conjugada a biotina y se incubó por 45 min, sobre las secciones, seguido de la adición de estreptavidina peroxidasa (Kit Immunocruz Biotechnology, CAL, USA) por 20 min. A las láminas lavadas en tampón fosfato (PBS, pH 7,5; 0,1 M) se adicionó 40 mg de 3-amino-9-etil-carbazol y peróxido de hidrógeno (0,3% v/v) en buffer acetato de sodio (0,1M a pH 5,3). Los

núcleos se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se realizó el montaje en gelatina glicerizada.

Las observaciones de los tipos celulares en secciones teñidas con H&E y las células inmunomarcadas con los distintos anticuerpos evaluados, se les hizo el registro fotográfico en un microscopio NIKON modelo E-600, con cámara Coolpix 995 acoplada.

### **Análisis de los datos**

La comparación de los valores de absorbancia de las distintas citocinas y factores de crecimiento se hizo mediante una prueba de Kruskal- Wallis con un  $\alpha=0,05$ . El área de la respuesta inflamatoria granulomatosa en cada grupo, se expresó como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graph Pad Prism versión 6.0.

## **Resultados**

### **Histopatología**

En el intestino infectado a las 8 semanas se observó un abundante infiltrado inflamatorio disperso por todo el tejido compuesto principalmente por macrófagos, no obstante se observan escasos granulomas por corte y una tendencia a que estos se encuentren mayormente ubicados cercanos a la capa muscular intestinal.

A las 8 semanas la disposición y composición celular en los granulomas sigue los patrones descritos a continuación: granulomas pequeños ( $11304 \pm 65,8 \mu\text{m}^2$ ), de bordes no definidos sin zonas marcadas dentro del granuloma en donde existe un predominio de macrófagos y presencia de plasmocitos, no se observan neutrófilos; granulomas de gran tamaño con bordes definidos ( $70650 \pm 61,5 \mu\text{m}^2$ ), sin capas definidas en donde se observa un predominio de macrófagos y presencia de plasmocitos; granulomas con bordes no definidos, en donde solo se pudo observar de manera difusa la presencia de dos zonas la interna en donde se aprecia un predominio de macrófagos y presencia de plasmocitos y la externa en donde además de lo anteriormente mencionado se puede observar escasos neutrófilos (Tabla 1, Figura 1A, 1B y 1C).

A las 20 semanas de la infección, los granulomas presentan una zona interna constituida por abundantes macrófagos y escasos plasmocitos, mientras que la externa esta principalmente constituida por macrófagos sin presencia de plasmocitos. En cuanto al tamaño, estos son medianos, sin zonas definidas, predominantemente constituidos por macrófagos y algunos de plasmocitos y neutrófilos. Otros granulomas presentan la zona interna constituida por una hilera de macrófagos seguida por plasmocitos dispersos y escasos neutrófilos, y la zona externa con macrófagos y neutrófilos dispersos. Otro modelo observado similar a este, varía en que no se observan neutrófilos en la zona interna del granuloma, estos solo se observaron en la zona externa de forma dispersa (Tabla 1, Figura 1D, 1E y 1F).

En ratones infectados y tratados no se aprecian granulomas definidos, solo algunos focos inflamatorios dispersos constituidos principalmente por plasmocitos y macrófagos, cercanos a la *muscularis mucosae* y las glándulas de Lieberkuhn.

### **Inmunolocalización de IL-10, TGF- $\beta$ y TNF- $\alpha$**

El marcaje de células positivas solo fue evidente en ratones infectados y tratados con praziquantel, para TGF- $\beta$  ( $4 \pm 2$  células) e IL-10 ( $9 \pm 3$  células), mientras que el TNF- $\alpha$  fue negativo. En estos se pudo observar las células positivas en la capa muscular, en la luz de las glándulas o en las células apicales de estas (Figura 2).

En ratones con 8 y 20 semanas de infección, así como en los controles sanos, las células inmunoreactivas fueron escasas y observadas solo en algunas secciones de pocos ratones, mientras que las secciones de ratones no infectados, resultaron ser negativas para todas las citocinas evaluadas.

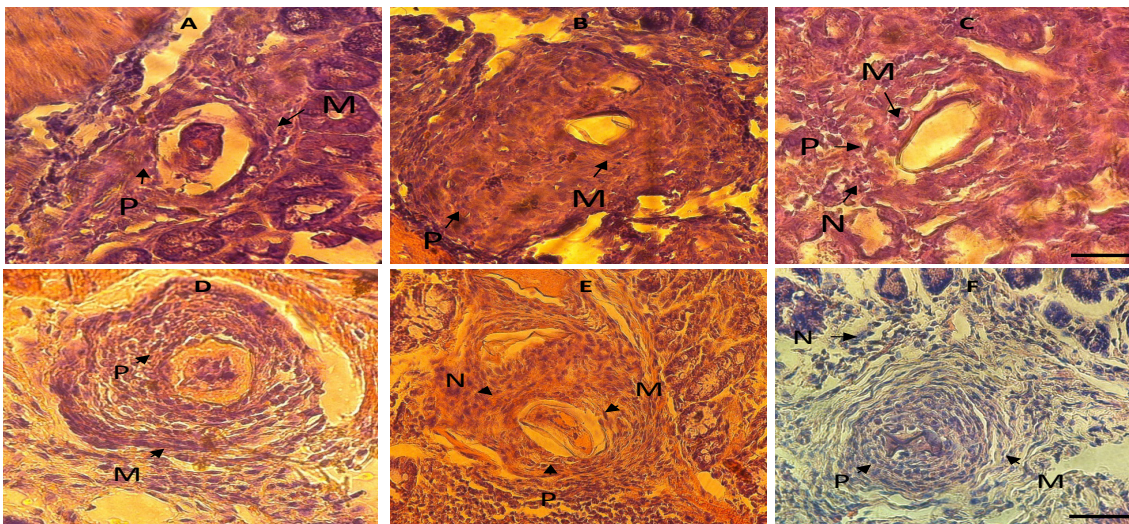
### **El VEGF y sus receptores en suero e intestino**

La determinación mediante ELISA del VEGF en suero, demostró que los ratones con 8 y 20 semanas de infección; así como en los infectados y tratados presentaron valores de

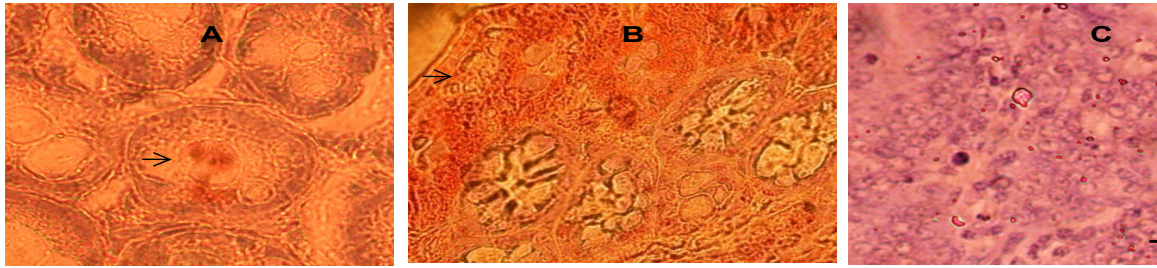
absorbancia mayores que los ratones controles y que tal diferencia es estadísticamente significativa ( $P=0,0025$ ;  $0,00019$  y  $0,005$ , respectivamente). Similarmente, ocurrió con los receptores de VEGF, las proteínas FLT-1 y FLK-1 (tabla 2).

Por otra parte, el inmunomarcaje para VEGF en las secciones intestinales de ratones con 8 semanas de infección y 15 días post-tratamiento, fue escaso y se ubicó principalmente

en la *muscularis mucosae* y acinos glandulares. El marcaje de los receptores de VEGF (FLT-1 y FLK-1) fue negativo en la mayoría de los cortes, con ubicación preferencial en células cercanas a la luz glandular, en las secciones positivas. En tejidos con 20 semanas de la infección, se observaron escasas células marcadas positivas con VEGF, FLT-1 y FLK-1, muchas de estas ubicadas lejos del granuloma.



**Figura 1.** Secciones de granulomas de intestinos de RI8S (A, B y C) y de RI20S (D, E y F) teñidas con H&E. **A)** Granulomas pequeños, de bordes no definidos, con predominio de macrófagos y presencia de plasmocitos (P), no se observaron neutrófilos. **B)** Granulomas grandes, con borde definido, constituido por macrófagos (M) y plasmocitos. **C)** Granulomas sin borde definido, con un área interna constituida por macrófagos (M) y plasmocitos (P), y escasos neutrófilos (N) en el área externa. **D)** Granulomas constituidos por abundantes macrófagos (M) y escasos plasmocitos (P), área externa conformada por macrófagos (M). **E)** Granulomas de tamaños mediano, sin áreas definidas dentro del granuloma, conformado por macrófagos (M), plasmocitos (P) y neutrófilos (N). **F)** Granulomas de tamaño mediano, el área interna conformada por plasmocitos (P) y escasos macrófagos (M), en el área media se observa por una hilera de macrófagos que la separa del área externa constituida principalmente de macrófagos y algunos neutrófilos. Barra= 25 $\mu$ m.



**Figura 2.** Inmunolocalización de IL-10 en sección de intestino de ratones BALB/c con 8 semanas de infección y quince días post- estos se encuentran mayormente ubicados cercanos a la capa muscular intestinal. En **A** y **B** se observa inmunotinción positiva (flecha), **C** es un control sano con inmunotinción negativa. Barra=25μm.

**Tabla 1.** Área de la respuesta inflamatoria intestinal en RI8S y RI20S infectados con *S. mansoni* (A. area del granuloma. B. Área de la respuesta inmune).

A. Area del granuloma (μm <sup>2</sup> )					
Tiempo de infección	Promedio	±	DS	Mínima	Máxima
RI8S (n=20)	36005,9	±	65,8	11304,0	76650,0
RI20S (n=20)	29620,5	±	61,1	7834,3	70507,9

B. Area de la respuesta inmune (μm <sup>2</sup> )					
Tiempo de infección	Promedio	±	DS	Mínima	Máxima
RI8S (n=20)	17662,0	±	62,8	3846,0	45216,0
RI20S (n=20)	11917,0	±	61,0	2418,0	70508,7

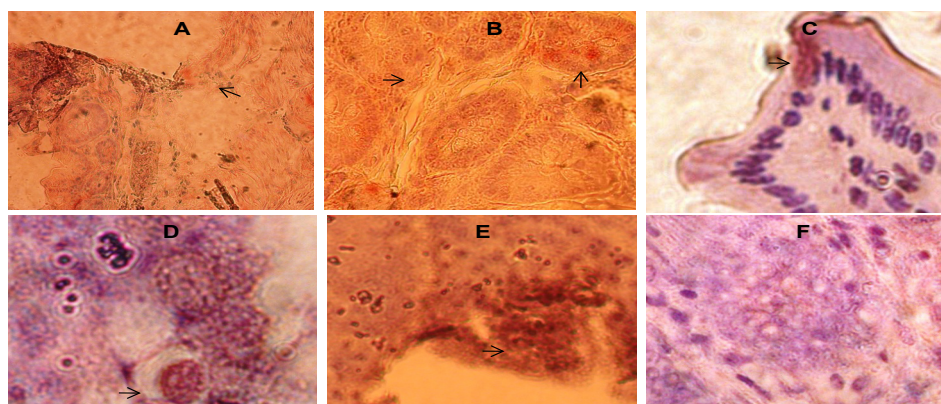
RI8S: ratón con 8 semanas de infección con *S. mansoni*, RI20S: ratón con 20 semanas de infección con *S. mansoni*.



**Tabla 2.** Comparación de la densidad óptica de citocinas en suero de ratones BALB/c CS, RI8S, RI20S y RTP.

Citocina	Grupo	Densidad óptica (X ± DS)	significancia contra CS	significancia contra RTP
VEGF	CS	0,093 ± 0,053	-	ns
	RI8S	0,172 ± 0,036	ns	ns
	RI20S	0,174 ± 0,154	** (0.0017)	ns
	RTP	0,170 ± 0,046	* (0.0137)	-
FLT-1	CS	0,127 ± 0,028	-	ns
	RI8S	0,188 ± 0,03	**** (<0.0001)	ns
	RI20S	0,178 ± 0,014	** (0.0093)	ns
	RTP	0,205 ± 0,06	*** (0.0009)	-
FLK-1	CS	0,061 ± 0,037	-	ns
	RI8S	0,169 ± 0,021	**** (<0.0001)	ns
	RI20S	0,205 ± 0,06	* (0.0345)	ns
	RTP	0,203 ± 0,063	*** (0.003)	-
TGP-β	CS	0,061 ± 0,064	-	ns
	RI8S	0,222 ± 0,064	*** (0.0002)	ns
	RI20S	0,192 ± 0,027	* (0.0314)	ns
	RTP	0,199 ± 0,045	ns	-

CS: ratón control sano, RI8S: ratón con 8 semanas de infección con *S. mansoni*, RI20S: ratón con 20 semanas de infección con *S. mansoni*, RTP: ratón con 8 semanas de infección con *S. mansoni* y quince días post-tratamiento con praziquantel, ns: no estadísticamente significativo.



**Figura 3.** Inmunolocalización de VEGF en intestino de ratones BALB/c con 8 semanas de infección y quince días post-tratamiento (A-E, flechas) y en ratones BALB/controles sanos (F con inmunotinción negativa). Barra A-C=50μm y D-F=25μm.

En secciones de intestino de ratones con 8 semanas de infección (Figura 3) la inmunotinción para VEGF se ubicó en acinos glandulares, mientras que células positivas para los receptores de VEGF, se presentaron aisladas, en el granuloma y a distancia de éste, en valores significativamente mayor en comparación con controles sanos ( $p=0,0001$ ). En las secciones de 20 semanas, la inmunotinción fue equivalente a los controles sanos, mientras que en los ratones infectados y tratados (8 semanas de infección y 15 días post-tratamiento), se observó un aumento significativo de células positivas para el VEGF ( $p=0,0001$ ). Para los receptores FLT-1 y FLK-1 el número de células positivas en los ratones infectados y tratados fue significativamente más alto ( $p= 0,0001$  y  $0,01$ , respectivamente).

## DISCUSIÓN

Las complicaciones graves durante la esquistosomiasis, han motivado numerosos estudios con el fin de dilucidar los mecanismos determinantes y asociados a la patogénesis hepática (2). De igual manera, es necesario profundizar en la patogénesis intestinal, para evaluar la gravedad en casos agudos y la progresión a cuadros crónicos, debido a que durante el desarrollo de la infección, la respuesta inmune del hospedador puede presentar rasgos particulares en cada órgano afectado, y en la intensidad del estímulo de los estadios parasitarios. En este estudio, se evaluó el predominio de tipos celulares y la expresión de TNF- $\alpha$ , el TGF- $\beta$ , IL-10, el VEGF y receptores de VEGF en el intestino de ratones infectados con *S. mansoni* y tratados con praziquantel; a fin de definir las particularidades de estos elementos de la respuesta inflamatoria e inmune en el intestino.

Si se compara anatómicamente el hígado con el intestino a simple vista se observa que el tejido hepático es más denso que el tejido intestinal, lo que supone que los huevos tienden a quedar atrapados en el tejido hepático generando una lesión fibrótica, mientras que en el intestino, al poseer una menor extensión tridimensional y presentar la posibilidad de que los huevos atraviesen la pared intestinal y sean eliminados con las heces, se limita la cantidad de huevos que puedan quedar atrapados en

la pared intestinal. A esto además contribuye la gran longitud del intestino, a lo largo del cual los granulomas quedan distantes, y en consecuencia son menos las lesiones fibróticas que pueden desarrollarse con el tiempo de infección.

En este estudio se observó en intestinos RI8S, un abundante infiltrado inflamatorio y granulomas en etapas tempranas de formación, con tamaño variable donde se observan macrófagos, plasmocitos y neutrófilos, sin zonas definidas dentro del área del granuloma; también se observó una menor cantidad de granulomas que los que se reportan en tejido hepático (12), esto último puede deberse bien sea a que los huevos pasan a la luz intestinal para continuar el ciclo del vida, o que los huevos son arrastrados por circulación al hígado.

Por otro lado, en intestinos de RI20S se observó que el tamaño de los granulomas es más homogéneo en comparación con los observado en RI8S; estos granulomas están constituidos principalmente por macrófagos y en algunos casos se agrupan en forma de hilera dentro de granuloma, además se pueden observar escasos neutrófilos y plasmocitos en zonas externas, el número de granulomas por corte sigue siendo menor al observado en los cortes hepáticos de RI20S (13). La morfología de los granulomas intestinales de RI8S y RI20S es indicativa de una etapa pre-granulomatosa propia de una respuesta TH<sub>1</sub>. Con relación a esto Borim Zuim y col.(14) en experimentos donde inocularon huevos de distintas cepas del parásito, en animales con 8 semanas de infección, demuestran 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, lo que es interesante debido a que en esta fase de la infección, otros autores demostraron que la composición celular en los granulomas hepáticos, indica que estos se encuentran en una fase granulomatosa, característica de una respuesta TH<sub>2</sub> con presencia de fibroblastos y escasos macrófagos (13).

El cambio a una respuesta de tipo TH<sub>2</sub>, se relaciona a un predominio de mastocitos y fibroblastos en la lesión (13). En el hígado, este cambio es perfectamente observable, mientras que en intestino no, por lo que se presume que una posible razón para esta diferencia,

podiera ser que el huevo en su paso por el intestino, produce una respuesta inflamatoria, pero el tiempo de permanencia en la lesión no es suficiente para inducir una lesión fibrótica, por lo que en este estudio, la señal en el inmunomarcaje para TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-10, tanto en cortes de RI8S como para RI20S, fue escasa.

En contraste, el escaso inmunomarcaje para TNF- $\alpha$ , se relaciona a la tolerancia inmunológica a microbios comensales que presenta el intestino, y a que la estimulación antigénica a este nivel, induce principalmente la producción de TNF- $\beta$ , por parte de las células del estroma intestinal (3,15), lo que inhibe en gran medida la respuesta TH<sub>1</sub> y la producción de TNF- $\alpha$ . Así mismo, estudios recientes han demostrado que los parásitos metazoarios son potentes inductores de la respuesta TH<sub>2</sub> constituyendo un notable elemento regulador en las inflamación intestinal, como demuestra el efecto de la enzima de 28-kDa glutatión S-transferasa (P28GST) de *Schistosoma*, en la disminución de la expresión de enfermedades inflamatorias intestinales tales como la colitis, mediante la reducción de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (16). Esto sumado a las características inmunológicas únicas del intestino, podría explicar por qué el TNF- $\alpha$ , una citocina propia de la respuesta TH<sub>1</sub> resultó negativa en los distintos grupos experimentales, al igual que IL-10.

Otro elemento contribuyente, es la gran capacidad de *S. mansoni* de modular la respuesta inmune, impidiendo que el paso de los huevos por el intestino produzca casos de inflamación grave como las observadas en enfermedades intestinales inflamatorias ocasionadas por otros patógenos o enfermedades autoinmunes, en los que se observa perfiles de respuesta TH<sub>1</sub> característicos de procesos inflamatorios (16).

En cuanto a los resultados con el TGF- $\beta$ , debemos recordar que tratándose de una citocina producida por diferentes linajes celulares y con múltiples funciones, tales como la diferenciación celular, migración celular y la formación de matriz extracelular (2), esta parece actuar de manera pro o anti-inflamatoria, en intestino.

La expresión del TGF- $\beta$  es esencial para la producción de IL-10 por células T en el intestino durante infecciones por helmintos

(17,18), sin embargo, el mecanismo por el cual se inhibe la señalización del TGF- $\beta$  a células T en la esquistosomiasis no se encuentra del todo claro, se conoce que éste factor es producido por células del estroma intestinal y tiene como inhibidor un nucleótido TGP- $\beta$ RRII dominante negativo(DN), el cual es producido por células epiteliales intestinales, con el fin de no entorpecer las funciones de otras líneas celulares. No obstante, la presente investigación aporta resultados que demuestran la escasa expresión de este factor en los grupos de ratones infectados (RI8S y RI20S), que incrementa luego del tratamiento con praziquantel, hallazgos que sugieren que elementos del parásito (proteínas, enzimas y productos de excreción-secreción) pudieran fungir como factores inhibidores en la producción de este factor, y sobre otras citocinas relacionadas, entre ellas la IL-10 y el VEGF, a través de las cuales se modularían procesos tan vitales como son la fibrogénesis y la angiogénesis, a nivel intestinal.

A diferencia de los hallazgos de éste estudio, en otros procesos inflamatorios la expresión de TGF- $\beta$  en el intestino, ejerce una influencia sobre células T CD8+ residentes en el tejido, que es crítica para la formación de una respuesta en infecciones locales y sistémicas (19). Adicionalmente, el TGF- $\beta$  se considera un mediador clave de la cicatrización de heridas, un importante regulador de la morfogénesis de tejidos y en procesos fibróticos en la regulación de la conversión de fibroblastos a miofibroblastos (2, 17,18).

En los cortes de intestino de RPT, no se observaron granulomas en la histopatología, lo cual concuerda con lo observado hasta ahora en numerosos estudios, en donde después de la administración del PZQ existe una disminución en la excreción de huevos por las heces, debido a una disminución significativa en la reproducción del parásito por acción del PZQ (6,7).

A nivel de Inmunohistoquímica, el marcate para RPT fue positivo tanto para TGF- $\beta$ , VEGF, FLT-1 y FLK-1 cercano a acinos y luz glandular, que no se observó en los cortes de RI8S y RI20S. Fattah & Ahmed (20) hacen referencia que luego del tratamiento curativo de ratones con fibrosis crónica infectados con *S. mansoni*, existe un proceso de activación de la angiogénesis en los tejidos afectados, como

parte de los procesos de sanación y restauración de las funciones del tejido. Nos planteamos como hipótesis, que esto se pueda deber a que una vez que el praziquantel es absorbido a nivel de tegumento por los vermes adultos, disminuye la tasa de oviposición en las hembras, por lo que a su vez disminuye el número de huevos que migran por la pared intestinal; pero en la lesión causada por el paso de los huevos antes de administrar el tratamiento, se inicia la reparación, reactivándose la producción endógena de VEGF, FLT-1 y FLK-1 y TGF- $\beta$ . Sin embargo, aún no queda claro el mecanismo por el cual se inhibe este proceso en ratones infectados sin tratamiento. Puesto que además de las funciones protagónicas del VEGF en el proceso angiogénico, éste tiene un papel crítico como elemento regulador de la producción de TGF- $\beta$  y a su vez, puede dar lugar a la fibrosis excesiva mediante la transformación de los fibroblastos a miofibroblastos, en diversas enfermedades.

El VEGF es responsable además de reducir los niveles de TGF- $\beta$  y con él la fibrosis, debido a la disminución de la transformación de los fibroblastos a miofibroblastos (21), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la determinación sérica de ambas proteínas en este estudio. Esto a pesar de que se observó un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de VEGF y TGF- $\beta$ , en los animales tratados con respecto a CS, lo cual podría obedecer al hecho de que a nivel intestinal las lesiones no son lo suficientemente persistentes para producir una lesión fibrótica, tal como ocurre a nivel hepático y otros órganos, o en los animales luego del tratamiento.

EL VEGF ejerce su actividad a través de dos receptores de tirosina quinasa (22, 23), VEGFR-1 (FLT-1) y VEGFR-2 (FLK-1), los cuales fueron determinados en éste estudio. El FLT-1 actúa en la quimiotaxis y la permeabilidad vascular, y el FLK-1 está implicado en la proliferación y supervivencia de células endoteliales (22). Los resultados muestran que a medida que avanza la infección los niveles de FLT-1 se mantienen constantes y los de FLK-1 aumentan. Esto sugiere que al iniciar el proceso de reparación de tejido o proceso fibrótico, el FLT-1 juega un papel principal al disminuir la permeabilidad vascular y atraer al foco de lesión células encargadas de la reparación de

tejidos, sin embargo, a medida que se inicia este proceso esta pasa a un papel secundario y el FLK-1 incrementa al iniciar la proliferación del endotelio en el granuloma.

Finalmente, los resultados muestran que en el tejido intestinal pese a desarrollarse una importante respuesta granulomatosa, con participación de macrófagos, plasmocitos y segmentados neutrófilos, indistintamente del tiempo de infección, y condición de tratamiento, se desarrolla una limitada respuesta de TGF- $\beta$  e IL-10, que aumenta discretamente en los animales infectados y tratados. Estos hallazgos sustentan la idea de que la poca persistencia del huevo en la pared intestinal y la extensión del tejido intestinal, parecen ser insuficientes para inducir la respuesta inmune a nivel celular y de mediadores químicos y en consecuencia, no se observa una definida respuesta de células T (Th1 o Th2).

## Referencias Bibliográficas

1. Colley D G and Secor W E. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol* 2014. 36(8): 347-357.
2. Herbert D B R, Orekov T, Perkins C and Finkelman F D. IL-10 and TGF- $\beta$  redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. *J Immunol* 2008. Doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7214 <http://www.jimmunol.org/content/181/10/7214>.
3. Ramalingam T R, Gieseck R L, Acciani T H, Hart K M, Cheever A W *et al*. Enhanced protection from fibrosis and inflammation in the combined absence of IL-13 and IFN- $\gamma$ . *J Pathol* 2016; 239(3):344-354.
4. Chabon J J, Gebreab L, Kumar R, Debella E, Tanaka T *et al*. Role of vascular endothelial growth signaling in schistosome-induced experimental pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2014; 4(2): 289-299.
5. Barrios E E, Delgado V, Araque W, Quintana J, Ojeda O *et al*. El factor de crecimiento del endotelio vascular hepático en la infección murina por *Schistosoma mansoni*. *Salus* 2013; 17(3)27-33.
6. Lee E, Young N, Lim N, Gasser R and Fairlie W. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. *Trends Parasitol* 2014;

- 20(2): 75-84.
7. Mwangi I N, Sanchez M C, Mkoji G M, Agola L E, Runo S M *et al.* Praziquantel sensitivity of Kenyan *Schistosoma mansoni* isolates and the generation of a laboratory strain with reduced susceptibility to the drug. *Int J Parasitol* 2014; 4(3): 296-300.
  8. Hines-Kay J, Cupit P M, Sánchez M C, Rosenberg J H, Hanelt B *et al.* Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with praziquantel *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 2012; 186(2): 87-94.
  9. Shaw M K and Erasmus D A. *Schistosoma mansoni*: structural damage and tegumental repair after *in vivo* treatment with praziquantel. *Parasitology* 1987; 94(2): 243-254.
  10. Cesari I, Ramos A, Alarcón de Noya B. Aislamiento de Huevos: En Diagnostico y Control de la Esquistosomiasis mansoni. Centro de estudios Avanzados IVIC, 1987: p. 49-52.
  11. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias y Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de bioética y bioseguridad. 3a ed. Caracas: Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias y el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación; 2009.
  12. Barrios E E. *Schistosoma mansoni*: Respuesta humoral y celular en la infección unisexual o bisexual experimental y el tratamiento con Praziquantel. [Tesis Doctoral]. 2007, Universidad Central de Venezuela: Caracas.
  13. Ochoa G, Mujica A, Barrios E E, Cosenza M, Capellán R *et al.* 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- $\alpha$ . *Kasmera*, 2015. 43(2): 98-111.
  14. Borim Zuim N R, Marques Allegretti S, Lihhares A X, Magalhães L A, Zanoti Magalhães M. A study of the granulomatous responses induced by different strains of *Schistosoma mansoni*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/953524>.
  15. Liao G, Van Driel B, Magelky E, O'Keeffe M S, Waal Malefyt R *et al.* Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein ligand regulates the migration of monocytes to the inflamed intestine. *FASEB J* 2014. 28(1): p. 474-484.
  16. Dris V, El Nady M, Delbeker M, Rousseaux C, Dubuquoy L *et al.* The Schistosome glutathione S-transferase P28GST, a unique helminth protein, prevents intestinal inflammation in experimental colitis through a Th2-type response with mucosal eosinophils. *Mucosal Immunol*, 2016; 9(2): 322-335.
  17. Beck P L, Rosenberg I, Xavier R J, Koh T, Wong J F *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$ ; Mediates Intestinal Healing and Susceptibility to Injury *in vitro* and *in vivo* through epithelial cells. *Am J Pathol* 2003; 162(2):597-608.
  18. Ince M N; Elliot D E, Setiawan T, Metwali A, Blum A *et al.* Role of T cell TGF- $\beta$  signaling in intestinal cytokine responses and helminthic immune modulation. *Eur J Immunol* 2009. 39(7): 1870-1878.
  19. Bergsbake T and Bevan M J. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8+ T cells responding to infection. *Nat Immunol* 2015; 16(4): 406-414.
  20. Abdel Fattah N S and Ahmed N S. Evidence of intra-hepatic vascular proliferation remodeling early after cure in experimental schistosomiasis mansoni: An immunohistochemical descriptive study. *Exp Parasitol* 2012; 130(1): 58-62.
  21. Park H-Y L, Kim J H, and Park C K. VEGF Induces TGF- $\beta$ 1 Expression and Myofibroblast Transformation after Glaucoma Surgery. *Am J Pathol* 2013; 182(6): 2147-2154.
  22. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:789-91.
  23. Ferrari G, Terushkin V, Wolff M J, Zhang X, Valacca C *et al.* TGF- $\beta$ 1 Induces Endothelial Cell Apoptosis by Shifting VEGF Activation of p38MAPK from the Prosurvival p38 $\beta$  to Proapoptotic p38 $\alpha$ . *Am Assoc Cancer Res* 2012; 10(5): 605-614.



UNIVERSIDAD  
DEL ZULIA

---

## **Kasmera**

Revista del Departamento de  
Enfermedades Infecciosas y Tropicales

**Vol. 45 N° 2, Julio - Diciembre 2017**

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada  
en diciembre de 2017, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**  
**Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela***

[www.luz.edu.ve](http://www.luz.edu.ve)  
[www.serbi.luz.edu.ve](http://www.serbi.luz.edu.ve)  
[produccioncientifica.luz.edu.ve](http://produccioncientifica.luz.edu.ve)