



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología



Schistosoma mansoni: respuesta IgM e IgG en ratones con distintas cargas parasitarias y etapas de infección, frente a preparaciones antigénicas de huevos y adultos

Br. Miguel Cosenza

CI. 20.953.390

Tutores:

Dra. Emilia Barrios

Dra. Pimali Felibertt

Octubre de 2015

DEDICATORIA

A mis padres, Lucrecia y Franco, porque este trabajo representa el resultado de su atención y dedicación para hacer de mí, la persona que soy hoy.

AGRADECIMIENTOS

Parece complicado expresar en una página mis agradecimientos en este momento que cierra una etapa tan importante y me abre el camino para el viaje del resto de mi vida.

En primer lugar debo agradecer a la vida por darme tantas oportunidades, por llevarme siempre al lugar indicando y por haberme permitido enamorarme de la ciencia y demostrarme constantemente que estoy en el camino correcto.

Debo dar gracias infinitas, aunque nunca serán suficientes, a mis padres, quienes con su amor incondicional siempre supieron guiarme a través del viaje de la vida, sin quitarme la libertad de escoger mi propio camino. Gracias a ellos, por ser el ejemplo perfecto de integridad y aprecio por el trabajo propio; por estar ahí incondicionalmente y por todos los valores inculcados que hacen de mí la persona que soy actualmente.

A mis tutoras (Dra. Pimali Felibertt y Dra. Emilia Barrios), por creer en mí siempre, animarme y guiarme a través de estos últimos años de vida académica. Especialmente debo agradecer a quien considero mi madre académica (Dra. Emilia Barrios), quien ha sido la artífice de la culminación de mi desarrollo personal como científico. Todo lo que está escrito en este trabajo es indudablemente gracias a ella. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio, para aprender que con disposición y buen humor nada es imposible.

Gracias al equipo BioMolP del laboratorio de Helmintología, especialmente a mis compañeros de trabajo, siempre dispuestos a ayudar y abiertos siempre a fructíferas discusiones: Ángel, Génesis, Eva, Brigitte, y Javier.

A todos los profesores, que de una u otra manera dejan una marca en nuestro desarrollo personal y profesional.

A mis amigos y compañeros, especialmente a aquellos que han estado siempre ahí, y que han hecho especial esta estancia universitaria.

A todas las personas que de una u otra forma apoyaron el desarrollo de este trabajo especial de grado, gracias. Es también de ustedes este logro.

Título: *Schistosoma mansoni*: respuesta IgM e IgG en ratones con distintas cargas parasitarias y etapas de infección, frente a preparaciones antigénicas de huevos y adultos.

Autor: Br. Miguel Cosenza

Tutores: Dra. Emilia Barrio y Dra. Pimali Felibertt

Instituto de Biología Molecular de Parásitos FCS-UC

Proyecto Individual CDCH-UC #422-10

RESUMEN

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria crónica causada por tremátodos del género *Schistosoma*, endémica en regiones tropicales y subtropicales. La patología hepática de esta parasitosis puede desencadenar complicaciones, tales como fibrosis y cirrosis que pueden ser mortales. El área endémica en Venezuela es considerada de baja transmisión, situación que complica la detección de la infección y plantea la importancia de mejorar la sensibilidad de los métodos de inmunodiagnóstico. Se evaluó la respuesta IgM e IgG frente a antígenos solubles de gusano hembra, huevos (ASGH y ASH) y productos de excreción-secreción de hembras y huevos (PESGH y PESH) en ratones Balb/c infectados con distintas cargas parasitarias y tiempos de infección, mediante ELISA, conjuntamente con la evaluación histopatológica e inmunohistoquímica para IL-10, TNF- α y VEGF en hígado. Se observó un alto porcentaje de positividad por IgM para todas las preparaciones antigénicas en infección de 7 semanas (100% por ASH, ASGH y PESH en cargas altas) y una disminución de la misma en infección crónica. La positividad de IgG fue mayor en infecciones de 20 semanas (100% por PESH en carga baja; por ASH y PESH en carga media; y por PESH y PESGH en cargas altas). Se observó un predominio de células segmentadas neutrófilos en 7 semanas de infección y un predominio de fibroblastos en 20 semanas. El marcaje por IL-10 fue característico de 7 semanas de infección, mientras que TNF- α fue predominante en 20 semanas. Se identificaron cuatro isotipos reactivos de los antígenos evaluados de 73, 57, 35 y 15 kDa. Se demostró el uso potencial de las preparaciones antigénicas solas o combinadas en combinación con los isotipos de inmunoglobulinas M y G para el diagnóstico de infección activa, incluso para diferenciar fases de infección.

Palabras clave: *Schistosoma mansoni*, IgM, IgG, Antígeno, ELISA, Inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, endemic in tropical and subtropical regions. The hepatic pathology of this parasitosis could develop complications, as fibrosis and cirrhosis that can be mortal. The Venezuelan endemic area is considered as one of low transition, which complicates the detection of the infection and set the importance of improving the sensitivity of immunodiagnosis methods. It was evaluated the IgM and IgG response to soluble antigens of eggs and females adult worms (SEA and SFWA) and excretion-secretion products of eggs and females (ESPE and ESPAW) in infected Balb/c mice with different parasitic charge and infection times by ELISA, together with histopathologic and immunohistochemical evaluation for IL-10, TNF- α and VEGF in liver. It was observed a high rating of positivity by IgM for all antigenic preparations in 7 week infection (100% by SEA, SFWA, ESPE and ESPWA in high parasitic loads) and a reduction of this immunoglobulin in chronic infection. The IgG positivity was higher in 20 week infections (100% by ESPE in low loads; in medium loads by SEA and ESPE; and in high loads by ESPE and ESPWA). In the liver of infected mice it was observed a predominance of neutrophil segmented cells in 7 week infection and a of fibroblasts in 20 weeks. Four reactive isotopes from the evaluated antigenic preparations of 73, 57, 35 and 15 kDa were identified. The potential use of combined or unique antigenic preparations in combination with immunoglobulin isotypes M and G for diagnosis of active infection, which may be also useful for the differentiation of infection phases.

Key words: *Schistosoma mansoni*, IgM, IgG, Antigen, ELISA, Immunohistochemical.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
ANTECEDENTES	18
MARCO TEÓRICO	20
Esquistosomiasis	20
<i>Schistosoma mansoni</i>	20
Tegumento	22
Patología	23
Inmunopatología	26
Angiogénesis y esquistosomiasis	29
Diagnóstico	30
Tratamiento	35
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Obtención de estadios de <i>Schistosoma mansoni</i> .	38
Preparación de Antígenos.	38
Modelo Experimental Murino.	38
Muestra de Ensayo.	39
Evaluación Parasitológica.	39
Evaluación serológica de la infección.	39
Evaluación de la Respuesta Inflamatoria Hepática.	40
Detección Hepática de Marcadores Inflamatorios y Fibróticos.	41
Análisis de Datos.	41
RESULTADOS	43
Evaluación Serológica	43
Coprología y PPCO	43
Respuesta IgM e IgG por ELISA	45
Caracterización antigénica	48

Análisis histológico	50
Histopatología del hígado	51
Área de respuesta inflamatoria	53
Pesos de hígado y bazo	53
Detección de marcadores de fibrosis hepática	57
Pruebas inmunohistoquímicas	57
DISCUSIÓN	59
Evaluación serológica	59
Respuesta IgM e IgG por ELISA	61
Caracterización Antigénica	64
Histopatología del Hígado	65
Detección de Marcadores de Fibrosis Hepática	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1	19
Figura 2	25
Figura 3	31
Figura 4	33
Tabla 1	36
Figura 5	40
Figura 6	42
Figura 7	44
Figura 8	45
Figura 9	46
Tabla 2	46
Tabla 3	47
Figura 10	48
Figura 11	50
Tabla 4	51
Tabla 5	52
Figura 12	53
Figura 13	55

INTRODUCCIÓN

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria crónica causada por trematodos del género *Schistosoma*. La infección es prevalente y endémica en 77 países, fundamentalmente de las regiones tropicales y subtropicales y se encuentra directamente relacionada con factores socio-económicos que impliquen el contacto directo con aguas infectadas, como es el caso de la agricultura, recreación y actividades domésticas. El desarrollo clínico de la enfermedad está relacionado con la especie infectiva, así *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* están asociados a esquistosomiasis intestinal, y *S. haematobium* se asocia a esquistosomiasis urogenital (Organización Mundial de la Salud, 2015).

La esquistosomiasis producida por *S. mansoni* se encuentra asociada a patologías hepáticas, y puede clasificarse como esquistosomiasis aguda o crónica. En el primer caso las afecciones principales al inicio de la infección son fiebre, escalofríos, debilidad, pérdida de peso, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, diarrea y eosinofilia, las cuales no son diferenciables de otras parasitosis (Lambertucci, 1993). En etapas avanzadas de la infección, la esquistosomiasis crónica puede producir obstrucción hepática y promover reacciones inflamatorias y granulomatosas, las cuales son reemplazadas por depósitos fibróticos, cuya severidad depende tanto de la magnitud de la infección, como de la respuesta inmune del hospedador (Gryseels *et al.*, 2006). Las complicaciones más graves se relacionan con la inflamación crónica en bazo e hígado, caracterizadas por cuadros de fibrosis y cirrosis hepática, hipertensión portal, entre otros que pueden desencadenar la muerte del paciente (Elbaz & Esmat, 2013).

El diagnóstico tradicional de la esquistosomiasis se basa en métodos de demostración de huevos del parásito en las heces de los pacientes empleando el método de Kato en exámenes seriados. Sin embargo, estos presentan la limitante de que su sensibilidad depende de la carga parasitaria del paciente y de la fase de la infección. Es por esto que en zonas endémicas donde la prevalencia es de 25% o menos y predominan las infecciones con baja carga parasitaria, es recomendable realizar el diagnóstico a través de pruebas indirectas

basadas en la búsqueda de anticuerpos en el suero del paciente (Noya *et al.*, 2006). La mayoría de estas técnicas detectan IgG, IgM y/o IgE contra antígenos solubles de gusano o huevo a través del método de ELISA o hemaglutinación indirecta, en cortes de gusanos por inmunofluorescencia (Gray *et al.*, 2011) y Western blot (WB), para la detección específica de isotipos y especies de parásitos, reservada para estudios confirmatorios debido a que requiere una buena estandarización de la técnica (Sulahian *et al.*, 2005). En este sentido, la detección de antígenos circulantes de gusano adulto en el suero del paciente se constituye una prueba prometedora en cuanto a su especificidad y sensibilidad (Grenfell *et al.*, 2013). Mientras que, la prueba de precipitación circumoval (PPCO), considerada de alta sensibilidad y especificidad se ha mantenido como prueba confirmatoria, no de rutina, debido a su alta laboriosidad (Noya *et al.*, 2002). El ensayo de ELISA es una prueba serológica empleada en estudios epidemiológicos, utilizando antígenos crudos de *S. mansoni*; teniendo ventajas interesantes en cuanto a especificidad de respuesta para distintos subtipos de inmunoglobulinas. Sin embargo, no ha sido efectivo para la discriminación entre infección activa o pasada, aparte de presentar reacción cruzada con otros helmintos, ocasionando falsos positivos, por lo que es necesaria una buena selección de antígenos que permita disminuir las limitaciones de su uso (Carvalho *et al.*, 2011).

En las zonas de baja transmisión debido a las características epidemiológicas, se recomienda el uso de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos como ensayo de despistaje general seguido de pruebas confirmatorias posteriores en el caso de obtener pacientes positivos (Cavalcanti *et al.*, 2013). Es entonces notable la necesidad de establecer protocolos estándar de diagnóstico con distintas preparaciones antigénicas y distintos isotipos de inmunoglobulinas con una mayor sensibilidad y especificidad que permitan superar las limitaciones actuales con respecto a la detección oportuna de la enfermedad y tratamiento.

Por lo anteriormente señalado, esta investigación se basa en determinar si el empleo de distintas preparaciones antigénicas en un ensayo inmunológico puede contribuir a aumentar la sensibilidad y especificidad diagnóstica en diferentes inóculos, fases y tiempos de infección establecidos en un modelo experimental de esquistosomiasis. Adicionalmente, teniendo en cuenta que se ha demostrado que se puede incrementar la sensibilidad en la pruebas serológicas, empleando preparaciones antigénicas con distintos estadios de huevo y

gusano para distintos isotipos de inmunoglobulinas, lo que podría contribuir a caracterizar la respuesta específica por preparación antigénica y ensayo, complementando así estrategias de diagnóstico y control.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria crónica causada por tremátodos sanguíneos del género *Schistosoma*. Esta enfermedad afecta anualmente a más de 230 millones de personas a nivel mundial y se encuentra asociada principalmente a individuos implicados en actividades de contacto con aguas infectadas, lo que está relacionado directamente con factores socioeconómicos. Además, es prevalente y endémica en 77 países, fundamentalmente de las regiones tropicales y subtropicales (Organización Mundial de la Salud, 2015).

En América del Sur y Venezuela, la esquistosomiasis es producida por la especie *S. mansoni*, cuyo hospedador intermediario es el caracol *Biomphalaria glabrata*, un caracol pulmonado habitante común de afluentes lentos, lagos y estanques, y cuya presencia está directamente relacionada con las áreas endémicas de esquistosomiasis (Barrios *et al.*, 2013b). Tradicionalmente, su distribución es localizada en la región centro-norte del país, aunque existen reportes de *B. glabrata* fuera de ésta área, en Estados como Trujillo, Táchira, Apure, Sucre y Anzoátegui (Alarcón de Noya *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2001).

La prevalencia parasitológica más reciente reportada en áreas endémicas, oscila entre 0,4% y 3,5%, en poblaciones estudiadas por contaje fecal de huevos. Sin embargo, en las mismas poblaciones, estudiadas mediante métodos más específicos como ELISA-SEA (de antígeno soluble de huevo) o Western Blot, la prevalencia reportada es considerablemente mayor (entre 19% y 35%), lo que indica una subestimación por parte de los métodos coprológicos (Hofstede *et al.*, 2014; Organización Mundial de la Salud, 2006).

Por otra parte, las zonas endémicas en Venezuela están caracterizadas como zonas de baja transmisión, debido a que exhiben: (1) presencia promedio de prevalencia de los casos de esquistosomiasis menor al 25% de la población examinada, (2) en donde son predominantes las infecciones de baja intensidad, (3) se observan mayormente infecciones asintomáticas y (4) constan de una presencia focal susceptible de caracoles de *Biomphalaria sp.* (Noya *et al.*, 2006).

Esta caracterización particular se da como consecuencia de medidas de control, que provocaron la disminución de la transmisión debido a la reducción de la población y al decrecimiento de infección en caracoles y por lo tanto la disminución de emisión de cercarias. Las consecuencias finales de estas características implican una infección menor de individuos susceptibles, así como el daño patológico y las manifestaciones clínicas menos dramáticas, además de que la fase aguda suele pasar desapercibida. Durante este período se mantiene una baja producción de huevos y estos permanecen en el tejido y su presencia en las heces es cada vez menos evidente. El primer y más importante parámetro afectado por esta serie de particularidades es el diagnóstico clínico, debido a que la fase aguda se presenta asintomática y el diagnóstico coprológico directo (Kato) se torna difícil debido a la disminución de la carga de huevos en las heces, por lo que pierde sensibilidad y se tiende a subestimar la prevalencia (Noya *et al.*, 2006).

El diagnóstico tradicional en Venezuela se ha dado a través del método coprológico directo. Sin embargo, se ha demostrado que, bajo la condición de área de baja transmisión, la sensibilidad de estas pruebas decrece hasta en 60%. La Prueba de Precipitación Circumoval (PPCO) es una reacción de precipitinas que se ejecuta con huevos viables del parásito; es considerada la prueba de referencia por su alta especificidad y sensibilidad no obstante, al requerir de estadios del parásito viables se hace imposible su uso rutinario y a escala poblacional (Noya *et al.*, 2002). La detección de anticuerpos específicos para los antígenos del parásito constituye una prueba de alta sensibilidad en el caso de la detección de infecciones de baja carga parasitaria y puede ser aplicable en pruebas a gran escala y esta se puede llevar a cabo a través de distintas pruebas inmuno-serológicas como el ensayo de ELISA, hemaglutinación, inmunofluorescencia (Gray *et al.*, 2011) y Western blot (Sulahian *et al.*, 2005). El inmunoensayo de ELISA es una prueba serológica útil en estudios epidemiológicos, debido a su alta sensibilidad. Sin embargo, hasta ahora el diagnóstico por ELISA para esquistosomiasis no ha sido efectivo en la discriminación de infección activa o pasada, aparte de la posibilidad de presentar reacción cruzada con otros helmintos (Carvalho *et al.*, 2011).

En áreas de baja transmisión es necesario realizar constantemente despistajes programados en la población como medida de control, debido a que en medida general los pacientes se presentan asintomáticos hasta etapas avanzadas de la infección, cuando el cuadro

clínico es más complicado. Se ha recomendado ampliamente la aplicación de pruebas serológicas para la realización de este tipo de diagnóstico a gran escala, teniendo en cuenta su sensibilidad y su fácil realización en condiciones de laboratorio (Cavalcanti *et al.*, 2013). La detección de IgG a través del ensayo de ELISA con antígenos crudos de gusano adulto y huevo ha sido ampliamente utilizada con resultados positivos en cuanto a la sensibilidad, por lo que se considera una buena alternativa para la aplicación en programas de diagnóstico (Rodrigues *et al.*, 2012). Sin embargo, en las condiciones en las cuales se realizan estos ensayos, no es posible definir la presencia de infección activa o pasada, ni conocer si el paciente se encuentra en etapas crónicas o agudas de la infección, además de que la literatura también reporta reactividad cruzada con otros helmintos (Noya *et al.*, 2006).

El modelo experimental murino para infección por *Schistosoma mansoni* ha sido ampliamente utilizado y caracterizado, de forma que puede emplearse información existente sobre el comportamiento de la enfermedad y la respuesta inmune en animales experimentales, de acuerdo a su etapa aguda y crónica, en función del desarrollo y regulación de patologías como la fibrosis hepática y la formación de granulomas. Al homologar esta información con la enfermedad en humanos, es posible indagar sobre las variables de interés para la resolución de problemas del inmunodiagnóstico, en un entorno experimental, pudiendo entonces controlar factores como las fases e intensidad de la infección, permitiendo así relacionar respuestas específicas para distintas características infecciosas (Cheever *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta lo expuesto, y tomando en consideración experiencias positivas previas con pruebas serológicas, empleando preparaciones antigénicas de huevo y gusano, y el conocimiento de la presencia de respuestas específicas para los distintos subtipos de inmunoglobulinas que permiten distinguir la esquistosomiasis de otras parasitosis y diferenciar infección activa y pasada (Grenfell *et al.*, 2012; Rodríguez-Molina *et al.*, 1962), resulta pertinente la búsqueda y análisis de métodos que permitan un diagnóstico correcto y oportuno de la enfermedad, con la finalidad de complementar las estrategias de control y tratamiento.

En función de lo expresado anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue la evaluación de la respuesta IgM e IgG en ratones Balb/c infectados con distintas cargas parasitarias y etapas de infección, frente a preparaciones antigénicas de huevos y gusanos adultos de *Schistosoma mansoni*.

JUSTIFICACIÓN

La esquistosomiasis es una infección intravascular parasitaria, producida por gusanos tremátodos a través de la deposición de sus huevos en los tejidos cercanos al sistema circulatorio del hospedador. Las lesiones más graves se deben a respuestas inflamatorias contra los huevos atrapados en el tejido, los cuales en el caso de *Schistosoma mansoni*, se alojan en el hígado, lo que induce una respuesta inmunitaria que deriva en fibrosis y que en consecuencia, produce la formación de granulomas, lo que lleva a complicaciones importantes tales como hipertensión portal, várices y sangramiento; todas complicaciones que ocasionar la muerte del paciente (Gray *et al.*, 2011). Además de afectar órganos adyacentes al sistema circulatorio, es también conocido el efecto de la infección sobre tejidos neuronales, particularmente el cerebro y la espina dorsal (Ferrari & Moreira, 2011).

Existen más de 200 millones de personas infectadas mundialmente y cerca de 800 millones están en riesgo, siendo así considerada la esquistosomiasis la enfermedad tropical de mayor relevancia (Steinmann *et al.*, 2006). En Venezuela, la infección se localiza en la región centro-norte del país, aunque existen reportes de la misma en estados como Trujillo, Táchira, Apure, Sucre y Anzoátegui, relacionada principalmente a zonas rurales con presencia de afluentes lentos como ríos o lagunas que tengan presencia del hospedador intermediario *Biomphalaria glabrata* (Hofstede *et al.*, 2014).

Gracias a la aplicación de programas de control de la enfermedad a gran escala, se ha logrado la disminución de la prevalencia y la transmisión en zonas endémicas. Sin embargo, esto ha traído consecuencias importantes en cuanto al diagnóstico de la enfermedad, debido a que esta se hace más complicada por métodos coprológicos de detección directa. (Noya *et al.*, 2006).

El diagnóstico oportuno y certero del paciente es de vital importancia para la realización de un tratamiento eficiente y a tiempo, que evite la progresión de la enfermedad a etapas crónicas y el desarrollo de una patología hepática grave; además de que se ha demostrado recientemente que cambios en el arreglo estructural de los tejidos afectados por

la deposición de huevos y la formación de granulomas pueden inducir proliferación descontrolada, promoviendo el desarrollo de cáncer hepático (El-Tonsy *et al.*, 2013).

Por otro lado, el tratamiento oportuno con praziquantel del paciente constituye actualmente la única estrategia de control esquistosomiasis, pero se han reportado problemas de resistencia por parte del parásito (Wang *et al.*, 2012); aparte, el control a nivel del hospedador intermediario no es posible, debido a que el uso de molusquicidas no es viable desde el punto de vista ecológico y el control biológico empleando otras especies de moluscos es ineficiente desde el punto de vista temporal (Pointier & Augustin, 1999).

En función de esto, se han desarrollado pruebas serológicas que resultan una alternativa diagnóstica efectiva. La prueba de precipitación circunoval, aunque presenta una alta sensibilidad y especificidad para esquistosomiasis, resulta muy laboriosa para ensayos a gran escala. El inmunoensayo de ELISA ha demostrado ser muy útil en estudios epidemiológicos debido a su alta sensibilidad, dependiendo del antígeno de *S. mansoni* utilizado. Sin embargo, el diagnóstico de ELISA para esquistosomiasis no ha sido efectivo para la discriminación entre infección activa o pasada, aparte de presentar reacción cruzada con otros helmitos, por lo que es importante estudios para la estandarización de antígenos y anticuerpos para estas pruebas (Carvalho *et al.*, 2011), teniendo en cuenta que existen indicios que advierten que dependiendo de los parámetros del ensayo sería posible diferenciar la esquistosomiasis de otras parasitosis y definir la presencia de infección activa o pasada, e incluso dilucidar severidad y morbilidad de la infección (Cavalcanti *et al.*, 2013).

Un modelo experimental permite establecer condiciones en las que es posible controlar factores como el tiempo de infección y la carga parasitaria; aparte de que la respuesta inmunitaria está bien caracterizada (Cheever *et al.*, 2002). Debido a esto, permiten evaluar de manera objetiva la respuesta de los anticuerpos del suero frente a distintos antígenos en función del isotipo de inmunoglobulina. El modelo ofrece la capacidad de establecer características específicas de la respuesta inmunológica en distintas etapas de la infección y bajo distinta carga parasitaria. Este aspecto es de importancia por cuanto su dilucidación permitirá diseñar estrategias de control, diagnóstico y tratamiento de la esquistosomiasis, teniendo en cuenta la necesidad de complementación de las mismas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta IgM e IgG en ratones Balb/c infectados con distintas cargas parasitarias y etapas de infección, frente a preparaciones antigénicas de huevos y gusanos adultos de *Schistosoma mansoni*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la predominancia y tipo celular presente en la respuesta granulomatosa en ratones Balb/c infectados con *S. mansoni* en diferentes cargas y etapas de infección.
2. Identificar en ratones Balb/c infectados con *S. mansoni*, marcadores inflamatorios y de fibrosis en tejido hepático en las diferentes cargas parasitarias y etapas de infección.
3. Determinar la respuesta IgM e IgG en los sueros de ratones infectados con *S. mansoni* con cargas parasitarias bajas, medias y altas, en etapas prepatente, aguda y crónica, frente a antígenos solubles y productos de excreción-secreción de gusanos y huevos.
4. Caracterizar el perfil antigénico de los homogenatos y productos de excreción-secreción de gusanos adultos y huevos de *S. mansoni*.
5. Comparar la respuesta inflamatoria y de inmunoglobulinas en los ratones infectados con diferentes cargas y etapas de la infección.

ANTECEDENTES

Los subtipos celulares que forma parte de la respuesta granulomatosa en modelos experimentales murinos son motivo de múltiples estudios. Barrios *et al.* (2006) evaluaron la respuesta celular hepática en ratones Balb/c infectados unisexual y bisexualmente, mediante técnicas histológicas convencionales, inmunofluorescencia para CD4⁺ y CD8⁺, inmunohistoquímica e inmunomicroscopía electrónica para macrófagos activados. Para la infección bisexual estos autores reportaron una reacción granulomatosa con predominio de macrófagos, linfocitos, neutrófilos segmentados, células gigantes y epitelioides, con un área de $195,6 \pm 74,43 \mu\text{m}^2$.

Se han establecido diversos marcadores inflamatorios y de fibrosis hepática producida por esquistosomiasis. De Souza *et al.* (2012), caracterizaron el perfil de citoquinas y quimioquinas en sueros de humanos con diferentes niveles de fibrosis periportal a través de ensayos de ELISA con dos tipos de preparaciones antigénicas. Demostraron que la IL-5 y el TNF- α están presentes en mayor concentración en individuos con fibrosis moderada o aguda con respecto a individuos sin fibrosis. Por su parte, Booth *et al.* (2004) en Uganda, realizaron un estudio similar en el cual reportaron que en individuos con fibrosis periportal existen mayores concentraciones de IFN- γ y TNF- α y bajas concentraciones de IL-10.

Ochoa *et al.* (2015) demostraron la existencia de correlación entre los niveles de IL-10 y TNF- α sérica con la respuesta IgM e IgG frente a productos de excreción-secreción, indicando que el aumento de la concentración de TNF- α sérica a 8 y 20 semanas de infección y demostrando su relación con el desarrollo de la patología hepática. Barrios *et al.* (2013a) realizaron el marcaje con VEGF en el endotelio vascular hepático de ratones Balb/c determinaron cambios en la expresión de VEGF en el endotelio vascular hepático de ratones Balb/c indicando específicamente un importante número de células con expresión de VEGF en sitios asociados al infiltrado inflamatorio

En cuanto a la evaluación de inmunoglobulinas en relación con distintas cargas parasitarias y tiempos de infección, Grenfell *et al.* (2012) utilizaron un modelo experimental murino para simular distintas cargas parasitarias y tiempos de infección y realizaron ensayos

de ELISA con antígeno de gusano adulto (SWAP) y de huevo (SEA) en los sueros. Sus datos mostraron una correlación entre los valores de absorbancia para IgG y el número de gusanos contados por ratón ($R^2=0.62$), para ensayos con ELISA-SWAP. Además, el ensayo de ELISA-SWAP fue capaz de detectar diferencialmente muestras positivas con 30 y 60 días de infección, mientras que utilizando antígenos solubles de huevo (ELISA-SEA) fue posible detectar muestras de más de 140 días de infección.

La caracterización del perfil antigénico de distintos homogenatos y productos de excreción-secreción para evaluar la respuesta humoral murina y humana fue el principal aporte del trabajo realizado por Barrios *et al.* (2010), en el cual evaluaron la respuesta IgE e IgG en ratones y pacientes infectados, pre y post-tratamiento con praziquantel y fue posible caracterizar el perfil de antígenos presentes en cada preparación, observándose proteínas características expresadas diferencialmente en distintas preparaciones y distintas condiciones del paciente.

MARCO TEÓRICO

Esquistosomiasis

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria crónica causada por gusanos tremátodos sanguíneos del género *Schistosoma* que actualmente afecta a casi 250 millones de personas y se estima que aproximadamente 800 millones se encuentran en situación de riesgo, por lo que es considerada la más prevalente entre las enfermedades parasitarias (Organización Mundial de la Salud, 2015). La adquisición de la enfermedad se encuentra directamente relacionada con actividades que impliquen el contacto directo del paciente con aguas infestadas, tales como recreación, agricultura, pesca y actividades domésticas; éstas a su vez se relacionan con situaciones socio-económicas específicas que conllevan la falta de acceso a programas preventivos de salud y atención médica oportuna (Engels *et al.*, 2002). A pesar de los programas de control y eliminación de la enfermedad en los distintos países endémicos, aún existe una tasa importante de transmisión, debida en parte al aumento de la actividad agrícola en ciertas zonas para abastecer la demanda alimentaria mundial, lo que ha llevado al aumento del contacto con afluentes de agua dulce contaminada y por lo tanto el aumento de personas en situación de riesgo (Steinmann *et al.*, 2006).

Existen cinco especies representativas causantes de la infección en humanos: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi*; cada una con una epidemiología distintiva, afectando diferentes sistemas de órganos y con hospedadores intermediarios específicos (McManus *et al.*, 2013).

Schistosoma mansoni

Los parásitos del género *Schistosoma* son duelas sanguíneas del Phylum de los gusanos planos (Platelmintos) y se encuentran clasificados en la clase de los digeneos. Los organismos adultos son gusanos de 7-20 mm de longitud de color blanco-grisáceo con un cuerpo cilíndrico que consta de dos ventosas succionadoras en un extremo del parásito, un tegumento complejo, un ciego digestivo y órganos reproductivos. A diferencia de otros tremátodos, los esquistosomas presentan un diformismo sexual bien diferenciado. El cuerpo

del macho forma un espacio en la región ventral conocido como canal ginecóforo, en el cual se mantiene la hembra luego de la unión sexual, la cual es más larga y delgada.

Los esquistosomas constan de un ciclo de vida complejo que incluye estadíos en dos hospedadores. En estado adulto estos se mantienen principalmente en los plexos de las venas mesentéricas, donde se alimentan de sangre y globulinas a través de glicólisis anaeróbica. Las hembras producen cientos de huevos por día, cada uno de los cuales porta una larva ciliada conocida como miracidio, la cual secreta enzimas proteolíticas que ayuda a los huevos a migrar al lumen del intestino. Los huevos son excretados en las heces y se pueden mantener viables por 7 días; éstos liberan el miracidio al contacto con el agua, el cual a su vez, guiado por estímulos lumínicos y químicos, encuentra su hospedador intermediario, los caracoles de agua dulce de la especie *Biomphalaria glabrata*. Luego de esto, los miracidios se multiplican asexualmente en esporoquistes multicelulares y luego en larvas cercarias con una cabeza y cola bifurcada característica. Las cercarias empiezan a salir del caracol entre las 4-6 semanas de infección y son capaces de mantenerse en el agua por 72 horas hasta encontrarse con un hospedador definitivo. En este momento, la cercaria penetra la piel perdiendo la cabeza, y luego migra a través de la sangre hacia los pulmones y el hígado, transformándose en gusanos jóvenes o esquistosómulos. Éstos maduran en 4-6 semanas en la vena portal, se aparean y migran a su ubicación mesentérica, donde se reinicia el ciclo (Gryseels *et al.*, 2006).

Estos parásitos han co-evolucionado con sus hospedadores mamíferos para desarrollar mecanismos capaces de evadir los efectores inmunes de los mismos. La adaptación ha resultado en productos secretados o expuestos que influyen el hospedador suprimiendo y confundiendo su respuesta inmune y forman parte de la barrera protectora del parásito propiamente conocida como tegumento, la cual está directamente relacionada en las complejas interacciones parásito hospedador, por lo que el estudio de su estructura y conformación es un buen punto de inicio para entender los procesos inmunes que se desarrollan en el humano luego de la infección (Van Hellemond *et al.*, 2006).

Tegumento

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es importante plasmar una descripción general de las características del tegumento del parásito adulto, sus cambios estructurales y su importancia en los procesos de interacción parásito-hospedador. En las primeras etapas de la infección, el esquistosómulo recién ingresado aún mantiene las características tegumentales de la cercaria en cuanto a que sigue como una membrana trilaminar y que mantiene en parte un recubrimiento de superficie delgado. Éste sufre diversos cambios que terminan luego de 7 días de infección, entre los cuales se encuentran el recambio tegumental que lleva a la formación de membranas heptalaminares y finalmente pentalaminares en el estadio adulto; todo esto llevado a cabo gracias a la ayuda de sistemas de transporte vacuolar (Hockley & McLaren, 1973).

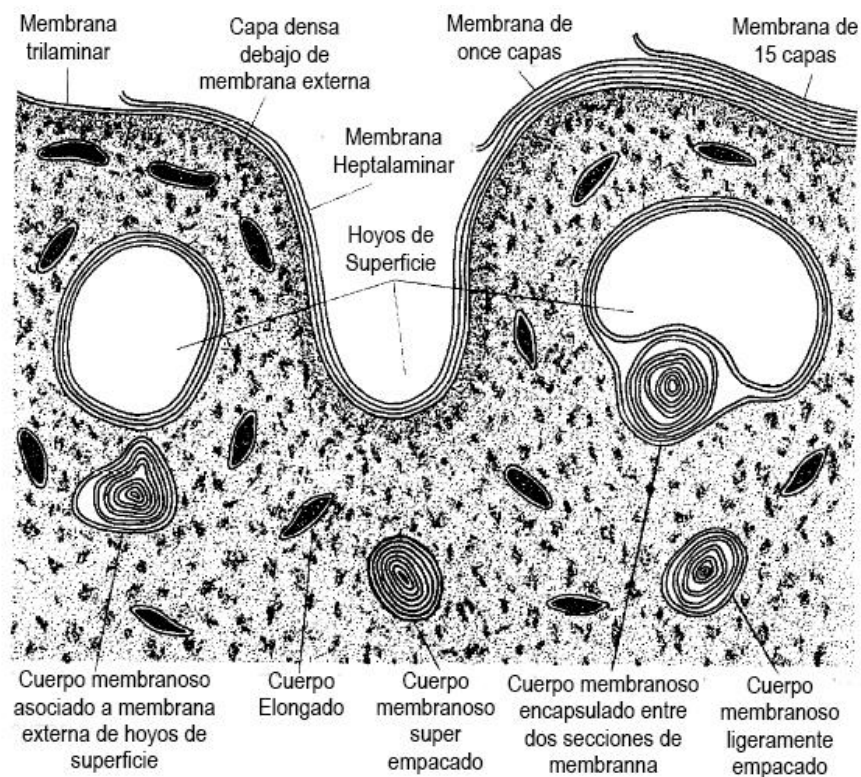


Figura 1. Diagrama de la estructura del tegumento de un gusano adulto. Modificado de (Hockley & McLaren, 1973)

En este punto, la superficie de interacción con el hospedador consiste en dos bicapas lipídicas que se superponen al sincitio. Asimismo, existen dos membranas externas, las cuales son identificadas como una membrana heptalaminar por microscopía electrónica, que incrementa la superficie de contacto del esquistosoma. Por otra parte, la matriz sincitial se caracteriza por la presencia de mitocondrias y estructuras vesiculares, así como cuerpos elongados y multilamelares. Y finalmente, la lámina basal separa el sincitio de una capa de células musculares (Van Hellemond *et al.*, 2006).

Los núcleos y ribosomas del tegumento están localizados en “citones”, los cuales se encuentran debajo de la capa muscular, y conectados a través de conexiones citoplasmáticas guiadas por microtúbulos. Estos “citones” sintetizan activamente cuerpos membranosos que se mueven a través de las conexiones citoplasmáticas al sincitio, donde aparentemente cumplen una función importante en la formación y reemplazo de las membranas externas de la superficie. En cuanto a la evasión inmune, se han propuesto diversos mecanismos que incluyen el mimetismo antigénico, degradación proteolítica de las proteínas inmunitarias del hospedador, así como las rígidas propiedades biofísicas de la membrana y el rápido intercambio de la membrana tegumental (Van Hellemond *et al.*, 2006).

En el exterior de la doble membrana del tegumento se encuentran diversas proteínas de importancia, entre ellas enzimas como la Fosfatasa Alcalina y la Fosfatasa Ácida, las cuales permiten absorber moléculas encontradas en la circulación sanguínea del hospedador definitivo y además son reconocidas de forma específica por los anticuerpos humanos y de animales infectados, por lo que son de utilidad para el diagnóstico y confirmación de la infección (Barrios *et al.*, 2013a).

Patología

Tomando como criterio ciertas características morfológicas y clínicas, la esquistosomiasis es clasificada como aguda o crónica (Andrade, 1987). La esquistosomiasis aguda se caracteriza, inicialmente, con la aparición de dermatitis cercarial y el síndrome de Katayama. La dermatitis cercarial se presenta como un prurito en el área de contacto de la piel a través de la cual penetran las cercarias la cual es observada luego de algunas horas del contacto con aguas infectadas y puede persistir por algunos días (Burke *et al.*, 2009). El

síndrome de Katayama es caracterizado por una fase febril que usualmente se encuentra asociada síntomas pulmonares o abdominales y suele desarrollarse de 2 a 10 semanas luego de la infección inicial. La fiebre no siempre se encuentra presente, pero existen otras manifestaciones clínicas relacionadas con la esquistosomiasis aguda que incluyen angioedema, síntomas respiratorios e intestinales, dolor de cabeza e incluso fatiga. Los síntomas de este síndrome aparentemente se deben a una reacción alérgica a la variedad de antígenos liberados durante la migración larvaria y la ovoposición temprana, lo cual además influye en la producción de complejos inmunes circulantes (Bottieau *et al.*, 2006). Estos síntomas, son encontrados mayoritariamente en individuos no inmunizados, como emigrantes o turistas al regreso de su estadía en áreas endémicas, mientras que pueden pasar desapercibidos en individuos locales, lo cual ha sido explicado por el hecho de que en condiciones endémicas la exposición a la infección ocurre en edades tempranas y los síntomas son poco detectables, por lo que no se realiza el diagnóstico (Lambertucci, 1993).

En el caso de la enfermedad crónica, *Schistosoma mansoni* es responsable de al menos dos patologías importantes: la esquistosomiasis intestinal y hepática. El desarrollo de la enfermedad crónica se debe a los huevos atrapados en los tejidos luego de la migración perintestinal o luego de la embolización en el hígado. Los huevos secretan enzimas proteolíticas que provocan una respuesta inflamatoria eosinofílica y granulomatosa, las cuales son reemplazadas progresivamente por depósitos de fibroblastos y la severidad de los síntomas depende de la intensidad de la infección y de la respuesta inmune del hospedador (Gryseels *et al.*, 2006).

En el caso de la esquistosomiasis hepática, la afección primaria consiste en una reacción inflamatoria contra los huevos atrapados en los espacios portales presinosoidales y causar hepatoesplenomegalia, sobre todo en niños y adolescentes; su frecuencia en intensidad está relacionada con el número de huevos en las heces, lo que indica relación con la carga parasitaria; sin embargo, afecta la función hepática. Con la infección persistente en el tiempo se produce una fibrosis por depósito de colágeno en los espacios periportales típico de jóvenes y adultos de mediana edad denominada fibrosis de Symmers. Ésta produce una oclusión progresiva en la vena porta, hipertensión portal, esplenomegalia, circulación colateral y várices esofágicas. El hígado, no necesariamente aumentado de tamaño, presenta

una consistencia dura y nodular a la palpación. La ascitis es un signo tardío de la enfermedad, siendo finalmente la complicación más seria el sangrado por las várices esofágicas (de Quesada *et al.*, 2009).

Por otro lado, la migración de los huevos a través de la pared intestinal provoca inicialmente una inflamación mucosa granulomatosa, pseupolipolisis, microulceraciones y sangramiento superficial (Gryseels *et al.*, 2006). La esquistosomiasis intestinal se presenta en principio con tenesmo y pasaje rectal de sangre y moco. En algunos pacientes se observa diarrea, dolor abdominal y papiloma esquistosomal saliente del ano, además de desnutrición y pérdida de peso. Entre otras afecciones puede nombrarse anemia, hipoalbuminemia y prolapso rectal (Elbaz & Esmat, 2013).

Finalmente, unas de las afecciones clínicas menos comunes pero más severas de esquistosomiasis es la neuroesquistosomiasis, la cual se caracteriza por patologías asociadas directamente con el sistema nervioso central (SNC). El desarrollo de la neuroesquistosomiasis implica la llegada de los huevos al SNC a través del flujo venoso retrógrado en el plexo venoso vertebral epidural que conecta el sistema venoso portal y la vena cava con la espina dorsal y el cerebro al igual que en el resto de los órganos, el desarrollo de la neuroesquistosomiasis depende de la respuesta inflamatoria granulomatosa frente los huevos atrapados en el tejido. Sólo una minoría de los pacientes (menos del 5%) desarrolla síntomas asociados al SNC, teniendo en cuenta que en general es más común la afección cerebral que espinal. Los pacientes presentan principalmente encefalitis aguda o mielopatía o ambas durante las etapas agudas de la enfermedad o en etapas crónicas tempranas. En este sentido, se puede definir la esquistosomiasis cerebral con una serie de síntomas como fiebre, dolor de cabeza, nistagmo, fallas del habla y fallas motoras; por su parte la esquistosomiasis espinal se manifiesta principalmente con mielopatía o mielitis transversa, la cual es más comúnmente provocada por *S. mansoni* y *S. haematobium* (Ross *et al.*, 2012).

Inmunopatología

Como ya se ha señalado en secciones anteriores, *Schistosoma mansoni* adulto parasita las venas mesentéricas, en donde ponen cientos de huevos por día luego de 4-5 semanas de infección. Algunos de esos huevos quedan atrapados en la microvascularidad del hígado y otros tejidos (intestinal, nervioso, etc), en donde inducen una respuesta granulomatosa. Subsecuentemente, se desarrolla una fibrosis significativa e hipertensión portal en ciertos individuos. En este sentido, gran parte de la sintomatología de la esquistosomiasis está atribuida a la respuesta granulomatosa inducida por el huevo, teniendo en cuenta que, aunque la magnitud, severidad y localización de la patología varía entre especies de *Schistosoma*, los mecanismos patogénicos son similares en todos los casos (Wynn *et al.*, 2004).

El modelo murino ha sido usado extensamente para investigar la respuesta inmune a la infección por *Schistosoma*. Se ha demostrado, que tanto los anticuerpos como la activación de células T son necesarias para una protección máxima. Los primeros niveles de protección son otorgados por la entrada de la cercaria; la exposición a ésta induce una protección parcial asociada en principio con la producción de IFN- γ (Colley & Secor, 2014).

La mayoría de los infectados con esquistosoma no sufren enfermedad hepatoesplénica severa, sino que desarrollan síntomas de morbilidad menos dramáticos como anemia, fatiga o desnutrición. El número de personas que experimenta esta clase de síntomas es alto y, de hecho, mayor al que desarrollan cuadros clínicos más severos, por lo que resulta de gran impacto en cuanto a la calidad de vida de estos pacientes. Sin embargo, el rol de la respuesta inmunitaria en esta sintomatología no se encuentra bien descrito. En el caso de la anemia, solo han sido descritas dos posibles causas; entre la más importante, la relacionada con la anemia de inflamación, la cual se encuentra asociada con agentes infecciosos, cáncer y desordenes autoinmunes. Las citoquinas inflamatorias afectan negativamente la eritropoyesis y el tiempo de vida de los glóbulos rojos. Específicamente, TNF- α , INF- γ e IL-1 inhiben la diferenciación y proliferación de las células progenitoras eritroides. Estas citoquinas son componentes comunes de la respuesta inmunitaria de la esquistosomiasis, y han sido asociadas con aspectos más severos de la infección aguda y crónica (Secor, 2005).

En el caso de la morbilidad crónica por infección de *S. mansoni*, ésta se desarrolla como el resultado de los huevos que se alojan en el hígado, intestino y otros órganos, causando daño en el tejido. Un hospedador inmunocompetente organiza una vasta respuesta inmunológica contra los huevos del parásito, con el desarrollo de una respuesta granulomatosa rica en colágeno alrededor de los mismos. Ésta respuesta eventualmente secuestra los productos tóxicos de los huevos pero también lleva al desarrollo de una fibrosis hepática severa e hipertensión portal (Wilson *et al.*, 2007). La mayor parte de la respuesta inmunitaria e inmunopatología de la esquistosomiasis está descrita en modelos murinos sin embargo, está demostrado que existen grandes similitudes en cuanto a la respuesta hepática granulomatosa y tienen dinámicas y composiciones celulares similares (Abdul-Ghani & Hassan, 2010).

Teniendo en cuenta que la inmunocompetencia es necesaria para el desarrollo efectivo de las reacciones granulomatosas, los estudios en ratones inmunocompetentes manifiestan como dinámica general un cambio violento entre una respuesta de linfocito T CD4⁺ cooperadores de tipo 1 (Th₁ por sus siglas en inglés, T-helper) moderada a una reacción dominada por una respuesta T-helper de tipo 2 (Th₂) con el comienzo de la ovoposición del parásito cerca de las 5-6 semanas. Aunque, la contribución relativa de células Th₁ productoras de IFN- γ , y de las células Th₂ productoras de IL-4, IL-5 e IL-13, en la respuesta granulomatosa aún se debate, la fibrosis y gran parte de la patología está mediada principalmente por citoquinas Th₂ (Wilson *et al.*, 2007).

En el caso específico de la esquistosomiasis hepática, se ha descrito cierta dinámica celular asociada a la formación del granuloma, demostrando que éste se desarrolla a través de cinco etapas patológicas: reactiva débil, exudativa, exudativa-productiva, productiva e involucional (Lenzi *et al.*, 1998). La primera (reactiva débil), se caracteriza por una acumulación gradual de células mononucleares, neutrófilos y eosinófilos alrededor del huevo recién depositado que lleva a la formación de un microabsceso neutrofilico característico de la etapa exudativa. A medida que el granuloma madura a la etapa exudativa-productiva, los histiocitos y las células epiteloideas comienzan a aparecer en la periferia y a gradualmente reemplazar la zona leucocítica. Los fibrocitos también aparecen en la periferia de la lesión y forman una zona externa alrededor de los histiocitos y las células epiteloideas. Durante la

etapa productiva, el huevo resulta degenerado y desintegrado, los fibrocitos y las fibras de colágeno se vuelven más prominentes y los linfocitos, histiocitos, células plasmáticas y otros eosinófilos forman una zona adicional en la periferia de la lesión. Los fibrocitos y las fibras de colágeno eventualmente se convierten en la principal característica del granuloma mientras que los otros tipos celulares disminuyen en número. En la etapa involutiva, los granulomas se reducen en talla considerablemente y puede que exhiban deposición de fibras de colágeno donde el huevo es típicamente desintegrado y pudiera calcificarse (Burke *et al.*, 2009).

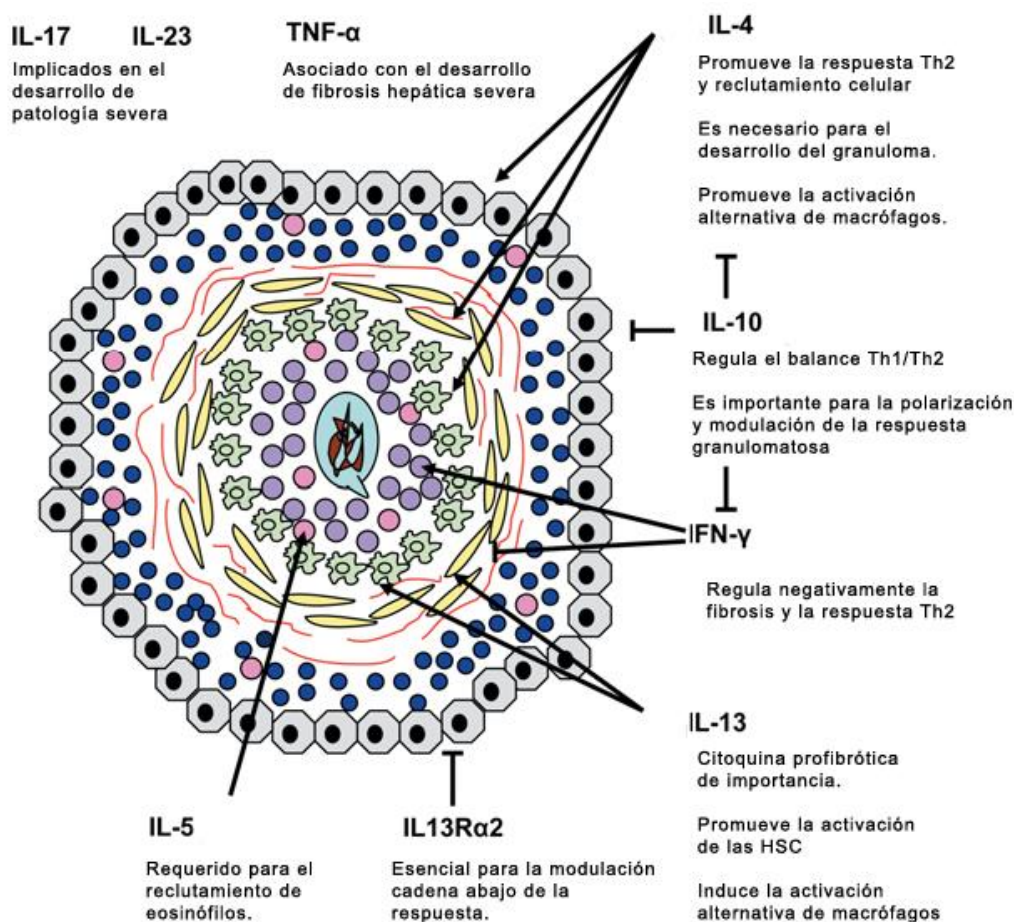


Figura 2. Principales componentes de la respuesta granulomatosa frente a huevos de esquistosoma en el hígado y las principales citocinas y quimioquinas que regulan la respuesta. Modificado de Burke *et al.* (2009).

Los componentes principales de los granulomas inducidos por huevo de esquistosoma y de las citocinas y quimioquinas que inducen esta respuesta se encuentran ilustrados en la

Figura 1. Durante las primeras 4 a 6 semanas de infección en el ratón, se genera una respuesta moderada de Th₁ contra los esquistosómulo migrando y los gusanos adultos inmaduros. Esta respuesta está caracterizada por altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias circulantes que incluyen TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ . Elevados niveles de estas citoquinas, también ha sido asociado con el desarrollo del Síndrome de Katayama en humanos, como se describió anteriormente. Luego de esto, la respuesta inmune cambia a una respuesta dominada por células Th₂, que coincide con el inicio de ovoposición, caracterizada por la expresión incrementada de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. La respuesta Th₂ alcanza un pico aproximadamente a las 8 semanas después de la infección, luego de lo cual es modulada con la progresión de la infección crónica (Burke *et al.*, 2009).

Se ha planteado la importancia de la matriz extracelular en el desarrollo de la fibrosis teniendo en cuenta que las células estrelladas hepáticas (HSC) presentes en la misma, son las principales promotoras de fibrosis hepática guiada por esquistosoma. Esta además se desarrolla por macrófagos activados inducidos a través de la respuesta Th₂, a lo cual se encuentran relacionadas citoquinas del tipo IL-13 y IL-4 principalmente, por lo que pueden ser usados como marcadores de fibrosis (Burke *et al.*, 2009).

Angiogénesis y esquistosomiasis

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes mediante la activación de las células endoteliales, degradación de la membrana basal proximal y matriz extracelular, migración direccional y proliferación de las células endoteliales. Entre las moléculas de señalización más importantes que intervienen en el desarrollo de este proceso está el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y está relacionado en patología con el desarrollo de inflamación crónica y el crecimiento tumoral (Barrios *et al.*, 2013a), a través de la activación de respuesta linfocitaria de tipo Th₂ que finalmente puede llevar un remodelado vascular que puede estar asociado a diversas patologías como la hipertensión pulmonar o hepática en esquistosomiasis (Chabon *et al.*, 2014).

En la cinética del VEGF en la infección por esquistosomiasis, se ha observado que se encuentra relacionada con procesos angiogénicos promovidos por el desarrollo de la fibrosis

en el tejido hepático, y se ha demostrado el aumento de su concentración en etapas agudas y tardías de la infección, asociándose con el desarrollo de capilaridad en el tejido luego del desarrollo de la respuesta inflamatoria por lo que esta citoquina puede ser entonces un marcador de interés de infección avanzada (Shariati *et al.*, 2011).

Diagnóstico

La detección parasitaria, que consiste principalmente en la detección de los huevos de *Schistosoma* en las heces del paciente, es la más utilizada para el diagnóstico de esquistosomiasis debido a que se ha presentado un método efectivo en cuanto a su efectividad y costo. Sin embargo, su rol en el diagnóstico, evaluación de la respuesta frente al tratamiento y la medición del control de la transmisión o eliminación, es limitado. Los sistemas de monitoreo, evaluación y vigilancia deben incluir herramientas efectivas de detección para re-evaluar el control y eliminación de la infección en la población. Sin embargo, el impacto del tratamiento con quimioterapia a gran escala y de otras medidas sanitarias de control como el uso de moluscquicidas, ha sido difícil de determinar teniendo en cuenta que la sensibilidad de la detección parasitológica disminuye de manera importante cuando la excreción de huevos disminuye o desaparece, cuestión usual especialmente en áreas de baja transmisión (ABT) lo cual se encuentra sistematizado en la Figura 3 (Cavalcanti *et al.*, 2013).

Las áreas de baja transmisión (ABT) se definen como todas aquellas que incluyen todos los siguientes factores: (1) una prevalencia de esquistosomiasis de un 25% o menos de la población examinada; (2) predominancia (75% o más) de infecciones de baja intensidad; (3) baja morbilidad en los pacientes, predominantemente asintomáticos; (4) presencia focal de caracoles *Biomphalaria* spp. Estas se establecen como consecuencia de medidas de control, como la aplicación de quimioterapia a gran escala y el control de caracoles, que finalmente promueven la disminución de la transmisión de la infección. Al reducir la población de caracoles con la aplicación de molusquicidas o control biológico y el tratamiento de la infección activa en los huéspedes humanos, menos caracoles llegan a ser infectados y la producción de cercarias disminuye notablemente, por lo que consecuentemente hay menor cantidad de huevos contaminando los cuerpos de agua. Como una cadena, los huéspedes susceptibles se infectan con una menor cantidad de cercarias y el daño patológico producido por los huevos de *Schistosoma* es menos severo, por lo que las

manifestaciones clínicas no son tan dramáticas solían ser en etapas de transmisión normal y la fase aguda de la enfermedad suele pasar desapercibida. Durante este período, continúa una deposición baja de huevos, que son atrapados en el tejido y no son excretados, por lo que la detección de los mismos en las heces es cada vez menos evidente. Teniendo en cuenta estos factores, en las ABT existen circunstancias especiales en cuanto al diagnóstico de la esquistosomiasis tanto a nivel clínico como de laboratorio (Noya *et al.*, 2006).

La técnica de Kato-Katz es actualmente el método más usado para exámenes fecales, debido a que es cuantitativo, relativamente de bajo costo, simple y rápido. Sin embargo, dado a la baja cantidad de muestra examinada y a los efectos de distribución aleatoria, la muestra analizada puede no contener huevos incluso si la infección permanece activa, obteniendo como resultado falsos negativos; por lo que es entonces difícil obtener confirmaciones concluyentes de infección o de un tratamiento exitoso para cuestiones de control y seguimiento. Se ha reportado un aumento significativo en la sensibilidad aumentando el número de réplicas para el examen, pero esto suele ser limitado en el trabajo de campo (Allam, 2012).

Para superar estas limitaciones con respecto al diagnóstico, se ha planteado el uso simultáneo de diferentes métodos diagnósticos, como el uso de técnicas de detección de anticuerpos seguida de un examen de heces en individuos seropositivos; técnica que ha sido aplicada para monitorear poblaciones humanas y para identificar números pequeños de personas infectadas luego de que se ha logrado un control de la morbilidad. En este sentido, se ha observado una gran diferencia en la prevalencia detectada por la prueba serológica con respecto a la parasitológica, lo cual está directamente relacionado a la baja sensibilidad diagnóstica de los métodos parasitológicos y además con la presencia de individuos que han desarrollado respuestas inmunes al exponerse a las cercarias pero que no desarrollaron la infección (Allam, 2012). Por estas razones es que suele decirse que en muchos casos ciertas pruebas serológicas pudieran sobreestimar la prevalencia de la enfermedad en una población determinada, debido a que, aunque poseen una alta sensibilidad, presentan una baja especificidad porque no son capaces de diferenciar entre infecciones activas o pasadas y en otros casos pueden presentar reactividad cruzada con otros helmintos. Sin embargo, esta información es de mucha utilidad para análisis epidemiológicos, porque muestra la cantidad

de individuos en una población que han estado en contacto con el parásito (Grenfell *et al.*, 2012).

Se han propuesto gran cantidad de métodos inmunológicos para el diagnóstico de la esquistosomiasis, pero solo unos pocos han alcanzado la validación en el campo para su desarrollo. Las técnicas más comúnmente utilizadas que fueron validadas en ensayos a gran escala incluyen diferentes formatos del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), la Prueba de Precipitación Circumoval (PPCO), el ensayo de inmunohemaglutinación indirecta (IHI) y la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Gomes *et al.*, 2014).

Usando la prueba de IFI con secciones de tejido de gusano adulto, ciertos autores han reportado que la fluorescencia asociada al intestino puede ocurrir 44 días luego de la infección, y está consecuentemente asociado con la infección aguda. Una muestra es positiva para una prueba de IgG-IFI cuando se observa fluorescencia en el parénquima y/o intestino de los gusanos; y es positiva para una prueba de IgM-IFI cuando se observa fluorescencia solo en el intestino de los gusanos. Se ha reportado una alta sensibilidad para esta prueba en ABT en comparación con los métodos parasitológicos, sin embargo, su aplicación es limitada en áreas endémicas debido a la necesidad de un microscopio complejo, personal experimentado y reactivos que son lábiles debido a su sensibilidad con la luz (Gomes *et al.*, 2014).

La técnica de IHI utiliza glóbulos rojos liofilizados recubiertos con antígenos de *Schistosoma*, más comúnmente antígeno crudo de huevo (SEA por schistosomal eggs antigen), para la detección de sueros positivos de un paciente a través de aglutinación. Debido a su simplicidad, esta técnica puede ser empleada en condiciones de campo y requiere solo equipamiento básico de laboratorio. Esta ha demostrado tener una alta sensibilidad, de hasta 97%, pero su especificidad es baja y variable, por lo que su aplicación a nivel de población es limitada como método auxiliar de pre-control y no como herramienta efectiva de diagnóstico individual (Gomes *et al.*, 2014).

La prueba de precipitación circumoval (PPCO) está basada en la precipitación del suero del paciente en contacto con huevos viables de gusano, como forma de reacción entre los anticuerpos y los antígenos presentes en el huevo. Este método es muy útil y se mantiene como el estándar oro de diagnóstico de *S. mansoni* y *S. japonicum* debido a su alta

sensibilidad (92-100%) y especificidad (96-100%) y ha sido utilizado en Venezuela en combinación con otros métodos parasitológicos para evaluar ABT. Los valores la prueba de PPCO disminuyen lentamente luego del tratamiento del paciente, llegando a ser negativa luego de seis meses a un año luego de una quimioterapia efectiva, por lo que es de gran ayuda para el seguimiento y control de la persona enferma. Sin embargo, su aplicación tiene importantes limitaciones a gran escala de evaluación poblacional, principalmente debido a que su realización es laboriosa en cuanto a que necesita 48 hrs de tiempo y que depende del mantenimiento de un ciclo de vida de *Schistosoma* para obtener los huevos viables, lo cual es complicado para cualquier laboratorio clínico (Gomes *et al.*, 2014; Noya *et al.*, 2006).

La prueba de ELISA es la más comúnmente utilizada para la detección serológica de esquistosomiasis, debido a que ofrece la opción de detectar diferentes clases de anticuerpos así como un rango amplio de antígenos. Esta se basa principalmente en la detección de anticuerpos contra *Schistosoma* con en el uso de antígenos crudos de huevo y de proteínas solubles de gusano adulto; entre los anticuerpos que reportan mayor sensibilidad están IgG, IgM e IgE, siendo el primero el más utilizado en pruebas de campo debido a su alta sensibilidad (Carneiro *et al.*, 2012; Grenfell *et al.*, 2012); por otro lado, la respuesta diferencial de distintos anticuerpos puede relacionarse con distintos estadios de la infección, por lo que se presenta como una alternativa diagnóstica de gran utilidad. Por otro lado, se ha demostrado que las mezclas antigénicas utilizadas actualmente presentan una sensibilidad bastante baja, por lo que se han desarrollado investigaciones importantes para conseguir alternativas útiles a estas preparaciones antigénicas (Barrios *et al.*, 2010; Cavalcanti *et al.*, 2013).

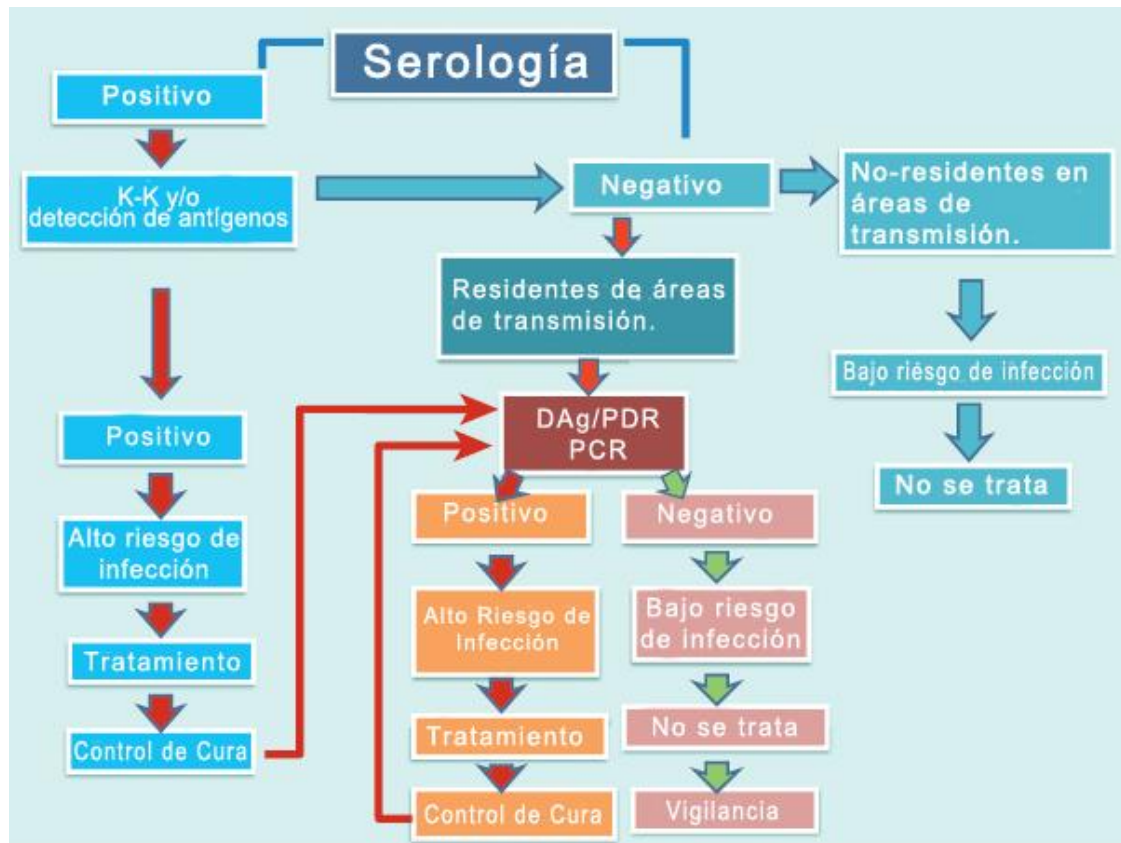


Figura 3. Esquema de diagnóstico, tratamiento y control para áreas de baja transmisión. Leyenda: DAg: Detección de antígenos; PDR: Prueba de diagnóstico rápido; PCR: Detección de ADN por reacción en cadena de la polimerasa; K-K: Kato-Katz.

Otra alternativa inmunodiagnóstica que ha demostrado efectividad ha sido el uso de Western Blot, con el cual se han presentado ciertas ventajas en cuanto a la diferenciación de infecciones recientes y crónicas de *Schistosoma*, la capacidad de discernir entre especies del parásito y el reconocimiento de isotipos en niños infectados; sin embargo, no existen protocolos estándar para la aplicación de esta técnica a gran escala (Sulahian *et al*, 2005). Además, esta herramienta resulta de gran utilidad en estudios que apunten a la detección y caracterización de isotipos de antígenos para mejorar la especificidad de las pruebas inmunodiagnósticas (Barrios *et al.*, 2010).

También se han desarrollado pruebas diagnósticas que consisten en la detección de antígenos circulantes del parásito como criterio de infección activa y la detección de ADN. El primer método consiste en la detección del antígeno anódico circulante (CAA) y el antígeno catódico circulante (CCA) en suero y orina a través de un ensayo de ELISA con captura de antígenos, utilizando anticuerpos monoclonales; entre sus principales ventajas se cuenta una alta especificidad, tiene correlación positiva con la carga de gusanos con la posibilidad de medir la intensidad de la infección, y finalmente, debido a que estos antígenos desaparecen luego del tratamiento, pueden ser usados como valoración de curación. Por otro lado, la detección de antígenos es baja en ABT, de forma similar a lo que ocurre con la técnica parasitológica, por lo que puede ser utilizada como sustituta de la evaluación parasitológica en áreas con altas tasas de infección o como un método complementario en ABT (Grenfell *et al.*, 2013). Por su parte, la detección de ADN se ha llevado a cabo a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizada en el caso de *S. mansoni* para la detección de ADN en muestras de heces mostrando una alta sensibilidad (96,7%) y especificidad (88%) en ABT, sin embargo su aplicación general no se ha logrado debido a la falta de estandarización de la prueba e implicaciones de costo-beneficio, teniendo en cuenta su baja demanda; por lo que en general ha sido utilizada bajo escenarios de investigación (Gomes *et al.*, 2014).

Tratamiento

Actualmente la terapia de tratamiento de la esquistosomiasis es la quimioterapia con praziquantel (dosis 40mg/Kg), la cual se ha convertido en la única droga de elección debido a su alta efectividad e inocuidad, además de que ha demostrado tener una actividad antifibrótica en ciertos modelos experimentales con animales infectados con esquistosoma. El tratamiento con praziquantel hace posible la quimioterapia en masa como la principal estrategia de control de transmisión en casi todos los países endémicos, sin embargo, se ha reportado resistencia por parte de ciertos individuos (Wang *et al.*, 2012). El praziquantel es una isoquinolina, de la fórmula 2-ciclohexilcarbonil(1,2,3,6,7,11b)hexahidro-4H-pirazina(2,1-a)isoquinolin-4-ona (C₁₉H₂₄N₂O₂; PM: 312.42) que posee un centro asimétrico (Figura 3). Su mecanismo activo consiste en el aumento de la permeabilidad de los iones de

calcio en los gusanos adultos de esquistosoma, por lo que produce la contracción de los parásitos, lo que resulta en la parálisis del mismo (Andrews, 1985).

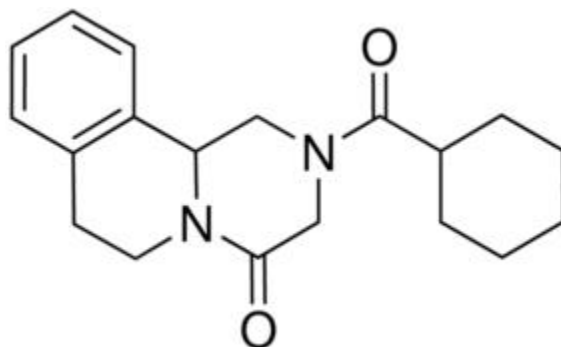


Figura 4. Estructura química básica del praziquantel.

El Modelo Murino en Estudios de Esquistosomiasis

Teniendo en cuenta la naturaleza compleja de los esquistosomas y su complicada interacción con sus hospedadores mamíferos, resulta necesario el uso de modelos con animales vivos en varios aspectos de la investigación en esquistosomiasis (Abdul-Ghani & Hassan, 2010). Las infecciones experimentales de animales de laboratorio por esquistosoma han sido usadas frecuentemente para modelar las características anatomo-patológicas y patofisiológicas de la infección en humanos, así como el estudio de la inmunidad y la eficacia quimioterapéutica (Cheever *et al.*, 2002).

Para que los resultados obtenidos en modelos animales sean equivalentes en comportamiento a lo que ocurre en el humano es importante tener en cuenta que existen diferencias particulares en cuanto a la infección en las distintas especies. En general las variaciones más importantes corresponden al número de gusanos adultos por unidad o por peso del animal y la distribución de los huevos entre el hígado y la circulación mesentérica, tomando en consideración entonces que las infecciones experimentales son de una alta intensidad (un solo par de gusanos de *S. mansoni* en un ratón pudiera equivaler a más de 1000 pares en una persona infectada).

Otro factor es el hecho de la variabilidad en el desarrollo de cronicidad en la enfermedad entre especies, pero se ha establecido predictivamente en varios aspectos, que una semana o dos en vida de ratón puede ser equivalente a un año en humanos (Cheever *et al.*, 2002). Sin embargo, en todas las especies experimentales se observa un comportamiento similar en cuanto a que desarrolla inflamación hepática granulomatosa y tienen composiciones celulares y dinámicas similares. Es por esto, que a pesar de las diferencias entre los hospedadores murinos y humanos en algunos aspectos de la enfermedad, el uso de ratones facilita el entendimiento de muchos fenómenos de esta parasitosis, de forma que sigue siendo una herramienta de gran importancia y objetividad en el control de la enfermedad a través de su aplicación en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, vacunas y finalmente para evaluar de forma controlada nuevos métodos y técnicas diagnósticas (Abdul-Ghani & Hassan, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de estadios de *Schistosoma mansoni*. Se utilizó un aislado “Puerto Rico” del parásito, obtenido a partir de un ciclo de mantenimiento de *Biomphalaria glabrata* y hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Los hámsters fueron infectados con 1000 cercarias vía percutánea. A las 7 semanas de infección se sometieron a perfusión portal y los gusanos obtenidos fueron mantenidos en medio RPMI1640 pH 7. Para la obtención de los huevos, se extrajeron los hígados y se mantuvieron en autodigestión por 24 horas y se tamizan en mallas metálicas de poro decreciente (Cesari *et al.*, 1987).

Preparación de Antígenos. Se prepararon cuatro tipos de antígenos para este estudio: antígenos solubles de gusano hembra (ASGH), huevo (ASH) y productos de excreción-secreción de gusano hembra (PESGH) y huevo (PESH). Esta selección se realizó bajo el criterio de respuesta obtenido en experimentos previos realizados en el laboratorio, los cuales se encuentran en vías de publicación. Los huevos y gusanos se lavaron 3 veces con medio RPMI (SIGMA-ALDRICH) diluido 1:2 con agua destilada estéril a 454 g a 4 °C por 5 minutos. Para la preparación de los antígenos solubles, los gusanos hembra y macho ($n=1 \cdot 10^3$) y huevos ($n=1 \cdot 10^6$) fueron separados y macerados en un homogenizador de tejidos de teflón. El homogenato obtenido se centrifugó a 14243 g por dos horas a 4 °C, para la posterior obtención del sobrenadante. Para los productos de excreción-secreción, los gusanos fueron incubados luego de la perfusión en medio RPMI1640 por 4 horas a 37 °C con CO₂ al 2,5% y 5% de O₂. Luego de esto, se centrifugaron a 14243 g por 30 minutos, para posteriormente obtener el sobrenadante. Cada extracto fue sometido a centrifugación y diálisis para su concentración y desalinización, empleando membranas de diálisis (Ultrafuge 30.000 NMWC POLYSULFONE 3 mL) con solución de NaCl 0,1 M. Los extractos (con 10 µm de EDTA y fluoruro de sodio) se guardaron -20 °C hasta su uso. Finalmente, se realizó la determinación de proteínas totales para cada uno de los antígenos preparados por medio del método de Bradford modificado por Spector (Spector, 1978).

Modelo Experimental Murino. Con la finalidad de simular las distintas etapas y condiciones de la esquistosomiasis en el modelo experimental, se infectaron ratones Balb/c bajo las condiciones planteadas en la Tabla I. Para cada condición se utilizó un número de 10 ratones, y 3 ratones para cada control negativo (sin infección). Luego del tiempo

respectivo de infección éstos fueron sacrificados y sometidos a perfusión portal para obtener los estadios adultos del parásito y se obtuvieron los tejidos para su posterior análisis.

Tabla 1. Condiciones de infección para el modelo experimental murino, los grupos están divididos en función del tiempo de infección. Cada grupo con tres condiciones de carga parasitaria y un control negativo.

Infección Prepatente (3 semanas)	Infección Aguda (7 semanas)	Infección Crónica (20 semanas)
Carga Baja (25 cerc.)(B3)	Carga Baja (25 cerc.)(B7)	Carga Baja (25 cerc.)(B20)
Carga Media (50 cerc.)(M3)	Carga Media (50 cerc.)(M7)	Carga Media (50 cerc.)(M20)
Carga Alta (200 cerc.)(A3)	Carga Alta (200 cerc.)(A7)	Carga Alta (200 cerc.)(A20)
Control 1 (Sin infección)	Control 2 (Sin infección)	Control 3(Sin infección)

Muestra de Ensayo. Se obtuvieron los hígados y sangre por punción cardíaca a partir de cada uno de los ratones infectados. Los hígados fueron conservados con fijador paraformaldehído (4%)-glutaraldehído (0,2%) en Buffer Fosfato Millonig (0,1 M; pH 7,2 – 7,4) para posteriores tratamientos histoquímicos. Esto para la evaluación de marcadores inflamatorios y fibróticos.

El manejo experimental de los animales se realizará bajo los lineamientos del código de Bioética y Seguridad del FONACIT (FONACIT, 2008).

Evaluación Parasitológica. Luego del sacrificio de los ratones, se realizaron exámenes de detección directa de los huevos en heces con la finalidad de evaluar la patencia de la infección.

Evaluación serológica de la infección. Esta se realizó mediante un ensayo de ELISA y test de PPCO. En la ELISA, se realizó la sensibilización con cada uno de los antígenos (ASH, ASGH, PESH y PESGH) a una concentración de 1µg/50 µL por pozo diluidos en buffer carbonato-bicarbonato (0,05M y pH 9). Los lavados se realizaron con buffer fosfato (pH 7,5-7,6; 0,15 M). La saturación de sitios de unión específica se realizó con seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en buffer fosfato (pH 7,5-7,6; 0,15 M) con incubación a 37 °C por 1 h. Luego de un lavado se adicionó el anticuerpo primario, siendo este el suero de ratones evaluados en una dilución 1:200 de BSA al 1% en buffer fosfato; éstos se incubaron a 37 °C por una hora. Previo lavado, se adicionó el anticuerpo secundario, en este caso, según el

ensayo, se usaron anticuerpos anti-IgM o anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa y se incubaron a 37 °C por 1 h. Finalmente, el revelado se realizó con peróxido de hidrógeno y el cromógeno utilizado fue ortofenilendiamina (40mg disuelto en 100 ml de buffer fosfato-citrato 0,1M y pH 5). La reacción se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro (MultiskanLabsystem).

Para la detección de bandas específicas reactivas para esquistosomiasis, se realizaron ensayos de Western Blot. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras por cada uno de los antígenos analizados, en una minicámara (Bio-Rad modelo 1000/500) a corriente constante de 200 V por 45 min a 4 °C en Buffer Tris-Glicina pH 8,3 (Tris 20 mM; glicina 192 mM, SDS al 1% v/v). Los antígenos se migraron en el gel a una concentración de 100 µg por pozo. Las proteínas fueron electrotransferidas a papel de nitrocelulosa (0,45 µm) a 100 V por 1 hora. Se realizó un bloqueo de los sitios de unión inespecífica sobre el papel de nitrocelulosa con BSA al 5% diluido en TBS-Tween (0,1M pH 7,5). Se cortaron tiras de nitrocelulosa de 2 mm y se prepararon pool de sueros con los más reactivos de cada grupo de infección, con los cuales se incubaron las tiras diluidos en solución de bloqueo y luego con las inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas a peroxidasa a una concentración 1:500 para IgM y 1:1000 para IgG (IgG e IgM). El revelado se realizó por quimioluminiscencia, empleando luminol y peróxido de hidrógeno 1:1 (Supersignal, Pierce, USA) seguido de revelado fotográfico.

Evaluación de la Respuesta Inflamatoria Hepática. Los tejidos fueron fijados en mezcla en paraformaldehído (4%)-glutaraldehído (0,2%) en buffer fosfato Millonig (0,1 M; pH 7,2 – 7,4) e incluidos en parafina para luego realizar secciones histológicas de 4 a 5 µm, estas se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las observaciones y el registro fotográfico se realizaron en un microscopio Nikon E-600 con cámara digital Coolpix 995. Se describió el tejido a partir del registro digital, primero, en función de su celularidad, haciendo conteo de morfotipos celulares a través de un contador digital, y segundo, a través del tamaño de la respuesta inflamatoria, tomando en cuenta el desarrollo de fibrosis y el área del granuloma, calculada a partir de una escala de lámina calibrada al mismo aumento de la fotografía analizada. Todos estos análisis digitales se realizaron con software analizador de imágenes (ImageJ 1.50b).

Detección Hepática de Marcadores Inflamatorios y Fibróticos. Se realizó una detección localizada en tejido hepático de marcadores inflamatorios y fibróticos (VEGF, TNF- α y IL-10) a través de la técnica de inmunohistoquímica. Para esto, los tejidos fijados en paraformaldehído (4%)-Glutaraldehído (0,2%) en Buffer Fosfato Millonig (0,1 M; pH 7,2 – 7,4), fueron incluidos en parafina para obtener secciones del tejido y se utilizó la metodología de la biotina estreptavidina peroxidasa (Barrios *et al*, 2006). Las secciones de 4 a 5 μ m se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-VEGF, TNF- α e IL-10 de ratón en dilución 1:50 en solución de bloqueo (BSA 0,5% en PBS pH 7,5-7,6; 0,1 M). Como anticuerpo secundario se empleó una anti-IgG de conejo conjugada a biotina y se incubó por 45 min en las secciones, seguido de la adición de estreptavidina peroxidasa (Kit inmunocruz Biotechnology, CAL, USA) por 20 min. A las láminas lavadas en PBS (pH 7,5-7,6; 0,1 M) se les adicionó 3-amino-9-etil-carbazol y peróxido de hidrógeno en buffer acetato de sodio (0,1M, pH 5,3), se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se realizó el montaje en gelatina glicerizada. Las observaciones y el registro fotográfico se realizaron en un microscopio Nikon E-600 con cámara digital Coolpix 995.

Análisis de Datos. Para la evaluación serológica de la infección en sueros a través de los ensayos de ELISA, se obtuvo el punto de corte a partir de los sueros controles negativos. Este se tomó como el promedio de los valores de absorbancia de los sueros controles negativos más dos veces la desviación estándar, considerándose como casos positivos para esta técnica los valores de absorbancia ubicados por encima del punto de corte. La evaluación de esta técnica se realizó a partir de los porcentajes de positividad de cada preparación antigénica por grupo de estudio. Se realizaron análisis de Kruskal-Wallis para la diferenciación de los porcentajes de positividad entre pruebas utilizadas y entre grupos, y análisis de Dunn de emparejamiento múltiple para los casos necesarios.

Los datos de celularidad se expresaron en cantidad de morfotipos celulares contados por granuloma. Se realizaron análisis de Kruskal-Wallis para la diferenciación del conteo celular entre los grupos de estudio y análisis de Dunn de emparejamiento múltiple en los casos necesarios. Los datos de área del granuloma se expresaron en función de estadística descriptiva.

La movilidad relativa de las bandas reveladas en la película de rayos X (Western Blot), correspondiente al reconocimiento de los antígenos parasitarios por los sueros de ratón, se calculó a partir de una curva semilog, construida con el marcador de peso molecular comercial (Blue Rangers, Promega) y la distancia de migración (Barrios *et al.*, 2010). La curva se construyó a partir de cálculos de distancia realizados con el programa analizador de imágenes ImageJ 1.50b. Se realizaron análisis de frecuencia entre los sujetos de estudio y se determinarán bandas comunes y específicas entre antígenos.

Todos los análisis se realizaron basados en una significancia de $P < 0,05$ con el paquete estadístico Graph Prism 6.

RESULTADOS

Evaluación Serológica

La evaluación serológica se realizó mediante la comparación de la capacidad de detección de positividad (porcentaje de positividad por prueba), dentro de cada uno de los grupos de infección relacionando una prueba coprológica directa, test de PPCO y ensayos de ELISA con distintas preparaciones antigénicas para IgM e IgG.

Coprología y PPCO

La prueba de PPCO presentó resultados satisfactorios en cuanto a la visualización de la reacción de precipitina en los huevos, en los cuales se observaron principalmente reacciones de tipo granular pequeñas, además de una buena proporción de reacciones globulares y de tipo serpentina (Figura 5).

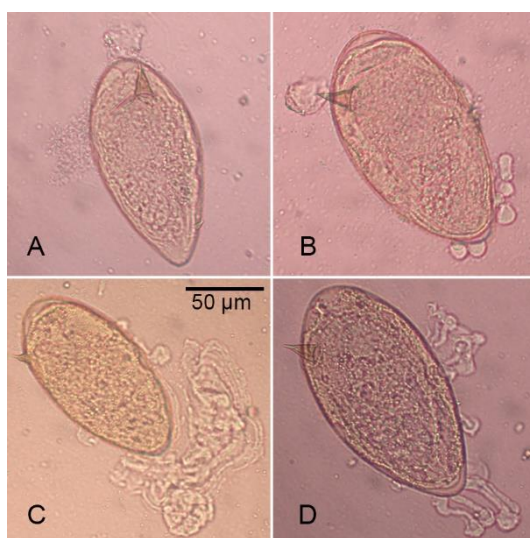


Figura 5. Registro fotográfico de los distintos tipos de reacción de precipitina observados mediante el test de PPCO en ratones Balb/c. A: Reacción granular. B: Reacción Globular. C y D: Reacción de tipo serpentina

Las pruebas presentaron diferencias en su capacidad de detección de la infección, dependientes de los grupos de infección evaluados. La coprología solo presentó positividad para infecciones de 7 y 20 semanas, siendo esta mayor en los grupos de 20 semanas de infección con cargas medias y bajas (30% de positividad contra 20% de positividad en 7 semanas); el pico de detección de esta prueba se observa en cargas altas con 7 semanas de

infección (90%). La prueba de PPCO presentó capacidad de detección para todos los grupos de infección; sin embargo los mayores porcentajes de positividad para esta prueba se obtuvieron en tiempos de 7 y 20 semanas de infección, siendo siempre menor en grupos de 3 semanas con respecto al resto de los grupos de tiempo de la misma carga parasitaria (40% en carga baja, 50% en carga media y 10% en carga alta). La mejor detección se observó en grupos de carga baja de 7 y 20 semanas (90% de positividad), seguido de los grupos de carga media de 7 y 20 semanas (70% de positividad). En cargas altas la capacidad de detección disminuyó para todos los tiempos de infección (60% en 7 semanas, y 50% en 20 semanas) (Figura 5).

La varianza en la detección de positividad entre grupos de infección es significativa para el análisis de Kruskal-Wallis para coprología y PPCO ($P=0,0003$ y $P=0,0028$, respectivamente). Los análisis de comparaciones múltiples dentro de los grupos por prueba, demostraron que, en el caso de la coprología, solo existieron diferencias significativas en la detección de la infección en el grupo A7 con respecto al resto de los grupos; para el caso del test de PPCO el único grupo que presentó diferencias significativas con respecto al resto fue el grupo A3 (10% de positividad). Existen diferencias significativas en la detección de positividad entre la coprología directa y el test de PPCO ($P=0,0025$ para test de Mann-Whitney). En la mayoría de los grupos, el porcentaje de positividad es mayor mediante el test de PPCO con la excepción del grupo de infección A7, donde la coprología directa presentó mayor positividad (Figura 6).

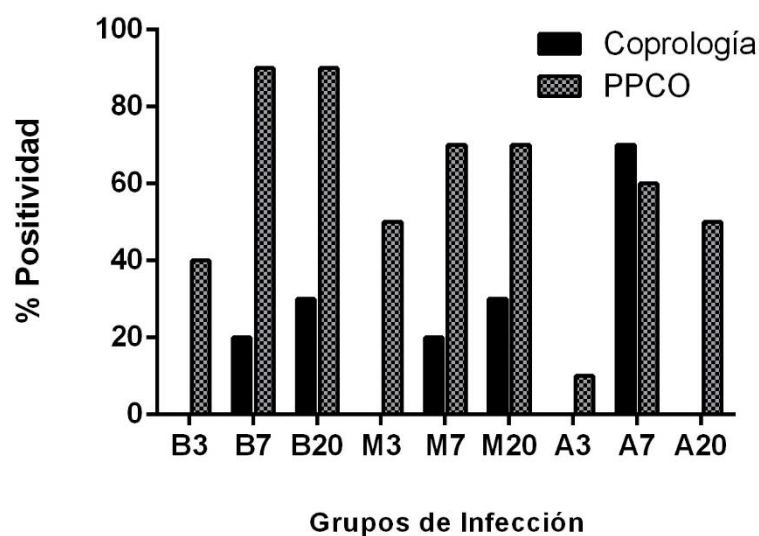


Figura 6. Porcentajes de positividad de las pruebas de coprología directa y PPCO para cada grupo de infección. B: Carga Baja, M: Carga Media, A: Carga Alta; 3: 3 semanas, 7: 7 semanas, 20: 20 semanas. Ejemplo: B3: Grupo de carga baja, 3 semanas de infección.

Respuesta IgM e IgG por ELISA

Inicialmente se calculó el punto de corte para las pruebas de ELISA con tres grupos de ratones sanos ($n=9$) con distinto tiempo de sacrificio (3, 7 y 20 semanas). Este se ubicó en 0,1259 como promedio para todas las preparaciones antigénicas y se tomaron como pruebas positivas para ELISA los sueros que presentaron absorbancia mayor o igual al mismo. La respuesta IgM e IgG fue variable para las distintas preparaciones antigénicas dependiendo de los tiempos de infección. Los porcentajes de positividad son mínimos en 3 semanas de infección, presentando mayor respuesta dentro del grupo de carga alta con PESH y PESGH-IgG (20%), ASH-IgG(10%) y ASH-IgM(10%), aunque 10% por encima de lo detectado por PPCO; para el resto de las cargas, la respuesta IgM e IgG es casi nula (10% por PESH-IgG en M3, 10% ASH-IgM en B3) y siempre menor a lo detectado por PPCO (50% M3 y 40% en B3) (Figura 7).

La respuesta aumenta en tiempos de 7 y 20 semanas de infección. En 7 semanas se observa un mayor porcentaje de positividad por pruebas con IgM con respecto a IgG ($P=0,0278$ para Mann-Whitney) especialmente en cargas altas, donde ASH, ASGH y PESH presentaron un 100% de detección, mayor a lo detectado por PPCO y coprología (60 y 70%

respectivamente); en cargas medias y bajas la respuesta IgM disminuye con respecto a cargas altas, pero esta se mantiene siempre por encima de 50%, a excepción de ASGH en M7 (10%).

Comparativamente la respuesta IgM es mayor a la respuesta IgG en este tiempo de infección aunque esta última presente porcentajes de positividad importantes; en todas las cargas los porcentajes de positividad por IgM en general son mayores que los de IgG: en A7 solamente ASH-IgG presentó positividad del 100%, mientras que con ASGH, PESH y PESGH fue menor (60, 20 y 70% respectivamente). Sucede similarmente en cargas parasitarias menores: Solo ASH y PESH presentan reactividad positiva en M7 (60%, ambos); y en B7, aunque todas las preparaciones antigénicas tuvieron positividad, su máxima fue con ASH (50%), menor a todas las IgM (Figura 7).

La respuesta IgG es predominantemente mayor en tiempos de 20 semanas de infección ($P=0,0009$ para Mann-Whitney), siempre manteniéndose por encima de 80% para todas las cargas, a excepción de ASGH-IgG en B20 (50%). En A20 PESH y PESGH-IgG presentan 100% de positividad, y ASH y ASGH-IgG 90%, comparado con un 90% máximo por ASH, PESH y PESGH-IgM y 70% por ASGH-IgM. En M20 ASH y PESH-IgG presentan 100% de positividad, seguido de PESGH y PESH-IgG con 90 y 80% de positividad, respectivamente; el máximo de positividad para IgM en este grupo se dio por ASH (70%). Esta tendencia se mantiene en cargas bajas, observándose positividad de 100, 90, 80 y 50% en PESH, ASH, PESGH y ASGH-IgG respectivamente, contrastado con un máximo de 30% de positividad por ASH-IgM. En el único caso en donde la detección por PPCO fue mayor que un ensayo de ELISA-IgG para 20 semanas de infección, fue en el grupo B20, donde la PPCO presenta una positividad de 90% (Figura 7).

No existieron diferencias significativas entre los grupos de cargas parasitarias evaluados en un mismo tiempo de infección ($P=0,1099$ para 3 semanas de infección; $P=0,2071$ para 7 semanas de infección; $P=0,06615$ para 20 semanas de infección); no ocurrió lo mismo al analizar los grupos en distintos tiempos de infección para una misma carga parasitaria, observándose diferencias significativas en los porcentajes de positividad entre los grupos de tiempo para las distintas cargas ($P=0,00053$ para carga baja; $P=0,0008485$ para carga media, $P=0,001335$ para cargas altas) (Figura 3). No se observaron diferencias significativas en la capacidad de detección de positividad entre las distintas preparaciones

antigénicas ($P=0,2249$ y $P=0,3197$, para 7 y 20 semanas de infección respectivamente por prueba de Kruskal-Wallis).

En referencia a los grupos de carga parasitaria, análisis a posteriori de Mann-Whitney para datos pareados demostraron que solo existen diferencias significativas entre los grupos de tiempos de infección de 3 semanas en comparación con grupos de 7 y 20 semanas, mientras que el discernimiento de positividad en las pruebas de ELISA entre grupos de 7 y 20 semanas no presentó diferencias significativas dentro de ningún grupo de carga parasitaria (Figura 8).

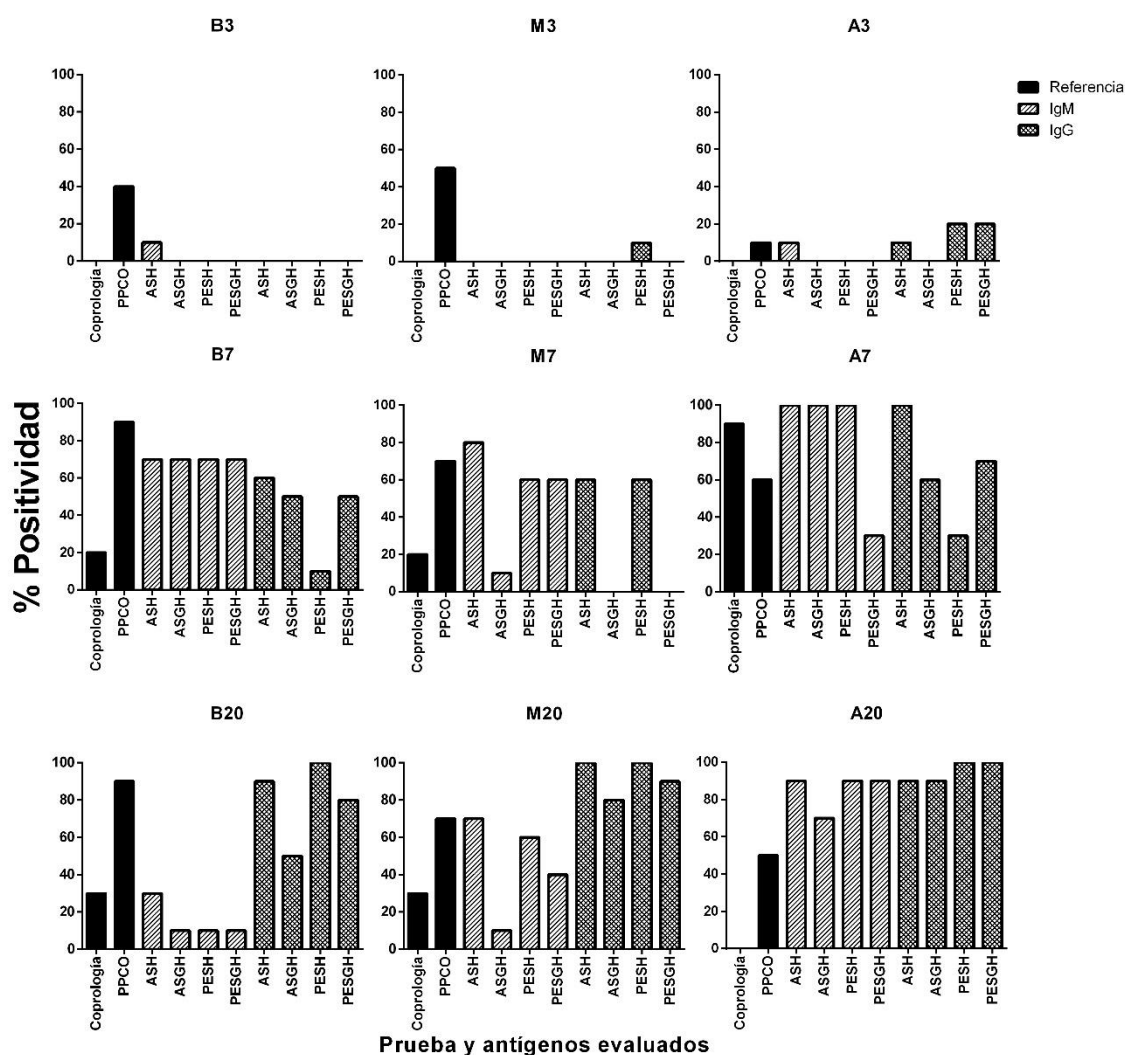


Figura 7. Respuesta IgM e IgG en sueros infectados frente a antígenos solubles de huevo y hembra, y productos de excreción/secreción de huevo y hembra, evaluada en función del porcentaje de positividad por ensayo. B: Carga Baja, M: Carga Media, A: Carga alta

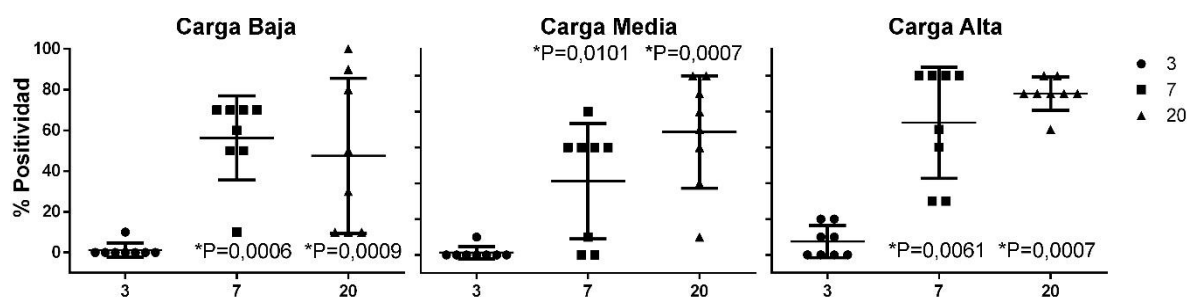


Figura 8. Porcentajes de positividad entre grupos de tiempo para cada grupo de carga parasitaria. 3: 3 semanas, 7: 7 semanas, 20: 20 semanas. *P: Significancia de Mann-Whitney contra el grupo de 3 semanas de infección.

Caracterización antigénica

Se presenta el reconocimiento de isotipos específicos de las distintas preparaciones antigénicas de *S. mansoni* para IgM e IgG en ratones de distintos grupos de infección (Figura 8). Solo 5, de los 9 grupos de infección evaluados presentaron reactividad, al igual que 2 de 3 de los grupos de control negativo. Los anticuerpos de tipo IgM solo reaccionaron con proteínas de PESGH (8 moléculas). Los polipeptidos de 139, 107, 96 y 10 kDa se mostraron únicamente en grupos de ratones infectados, mientras que los de 164, 127 se presentaron grupos positivos y en el control negativo. Los polipeptidos de 175 y 115 kDa solo reaccionaron con controles negativos. Solo el grupo control C3 presentó reactividad (Tabla 2).

Los anticuerpos de tipo IgG presentaron reactividad antigénica con todas las preparaciones evaluadas, siendo ASGH la más reactiva (8 moléculas). Prosiguen en reactividad las preparaciones antigénicas ASH y PESH (3 moléculas) y PESGH (2 moléculas). Las moléculas de 147, 90, 73, 57, 35, 25, 15 y 10 kDa solo se observaron en grupos de infección positivos. Solo el grupo control C20 presentó reactividad (polipeptidos de 139 y 103 kDa), esto con ASH y estas moléculas fueron reactivas también en los grupos de infección M20 y B20. El grupo A20 presentó reactividad con el antígeno de 139 kDa reactivo para el control negativo.

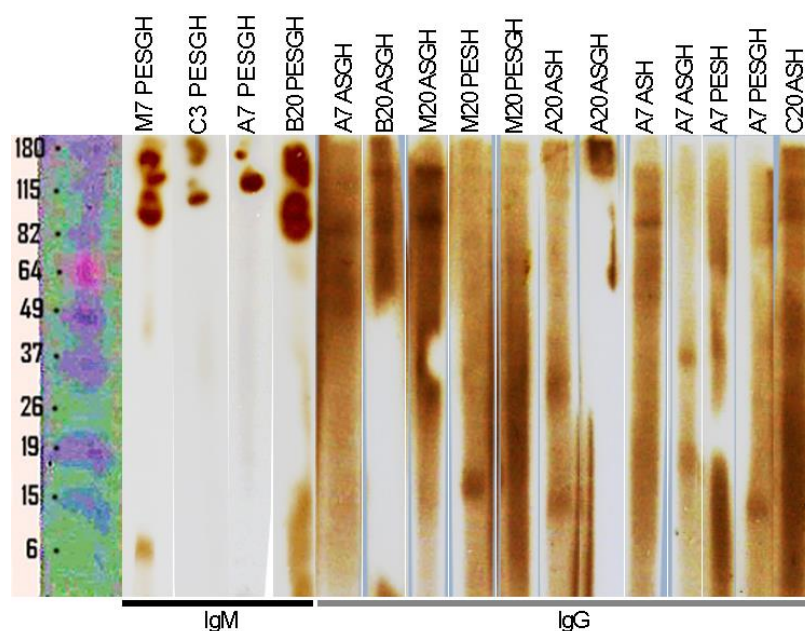


Figura 9. Revelado de Western Blot para el reconocimiento de IgM e IgG de pool de sueros de ratón de distintos grupos de infección por distintas preparaciones antigénicas. Cada tira representa un pool de los sueros seleccionados de los diferentes grupos.

Tabla 2. Reconocimiento de inmunoglobulinas IgM e IgG sobre isotipos de distintas preparaciones antigénicas de *Schistosoma mansoni*, por sueros de ratón infectados con diferentes cargas parasitarias y tiempos de infección.

Antígeno	Proteínas Antigénicas (kDa)	Grupo	Proteínas Antigénicas (kDa)
IgM		IgM	
PESGH	175; 164; 139; 127; 115; 107; 96; 10	A7	164; 139
		M7	164; 139; 127; 96; 9
		B20	164; 139; 107; 96
		C3	175; 164; 127; 115
IgG		IgG	
ASGH	147; 139; 103; 90; 73; 57; 35; 15	A7	147; 103; 96; 73; 57; 35; 15; 10
ASH	147; 139; 103	M20	139; 103
PESGH	139; 10	B20	139; 103
PESH	139; 73; 35	A20	147; 139; 25; 10
		C20	139; 103

Las proteínas más observadas entre las preparaciones antigénicas con reactividad específica para sueros positivos fueron de 96 y 10 kDa con una frecuencia relativa de 0,6; además del isotipo de 147 kDa, presente en dos de las cuatro preparaciones antigénicas, con una frecuencia entre los grupos de 0,4. Los isotipos reactivos más ubicuos identificados fueron de 164, 139 y 103 kDa con frecuencias de 0,8, 1 y 0,8 respectivamente, sin embargo, estos también se presentan en sueros negativos (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias relativas y totales de los isotipos polipeptídicos reconocidos por anticuerpos IgM e IgG de sueros de ratones infectados con *Schistosoma mansoni* con distinta carga parasitaria y tiempos de infección.

Tamaño (kDa)	Grupo de Infección		Preparación Antigénica	Control (-)	
	Relativa*	Total**	Total***	Relativa	Total
175	0,20	0,11	0,25	0,5	0,33
164	0,80	0,44	0,25	0,5	0,33
147	0,40	0,22	0,5	0	0,00
139	1,00	0,56	1	0,5	0,33
127	0,40	0,22	0,25	0,5	0,33
115	0,20	0,11	0,25	0,5	0,33
107	0,20	0,11	0,25	0	0,00
103	0,80	0,44	0,5	0,5	0,33
96	0,60	0,33	0,25	0	0,00
73	0,20	0,11	0,5	0	0,00
57	0,20	0,11	0,25	0	0,00
35	0,20	0,11	0,5	0	0,00
15	0,20	0,11	0,25	0	0,00
10	0,60	0,33	0,25	0	0,00

*Veces presente entre grupos de infección reactivos.

**Veces presente entre grupos de infección totales

***Todas las preparaciones antigénicas presentaron reactividad.

Análisis histológico

Este se realizó a través de la descripción de las características histopatológicas del hígado de ratones infectados en comparación con controles sanos, relacionado además, con las condiciones de peso de hígado y bazo en distinto tiempo de infección y cualidades histopatológicas como el tamaño de granuloma y conteo diferencial de morfotipos celulares en el mismo. Se realizó además una caracterización inmunohistoquímica del tejido para la localización de citoquinas proinflamatorias en tejido y una cuantificación de las mismas por ELISA.

Histopatología del hígado

La caracterización de la celularidad en los granulomas se realizó clasificando las células de respuesta en 4 morfotipos: fibroblastos (Fb), células gigantes multinucleadas (GM), células epitelioides y/o macrófagos (Ep/M) y segmentados (Sg) (Figura 10).

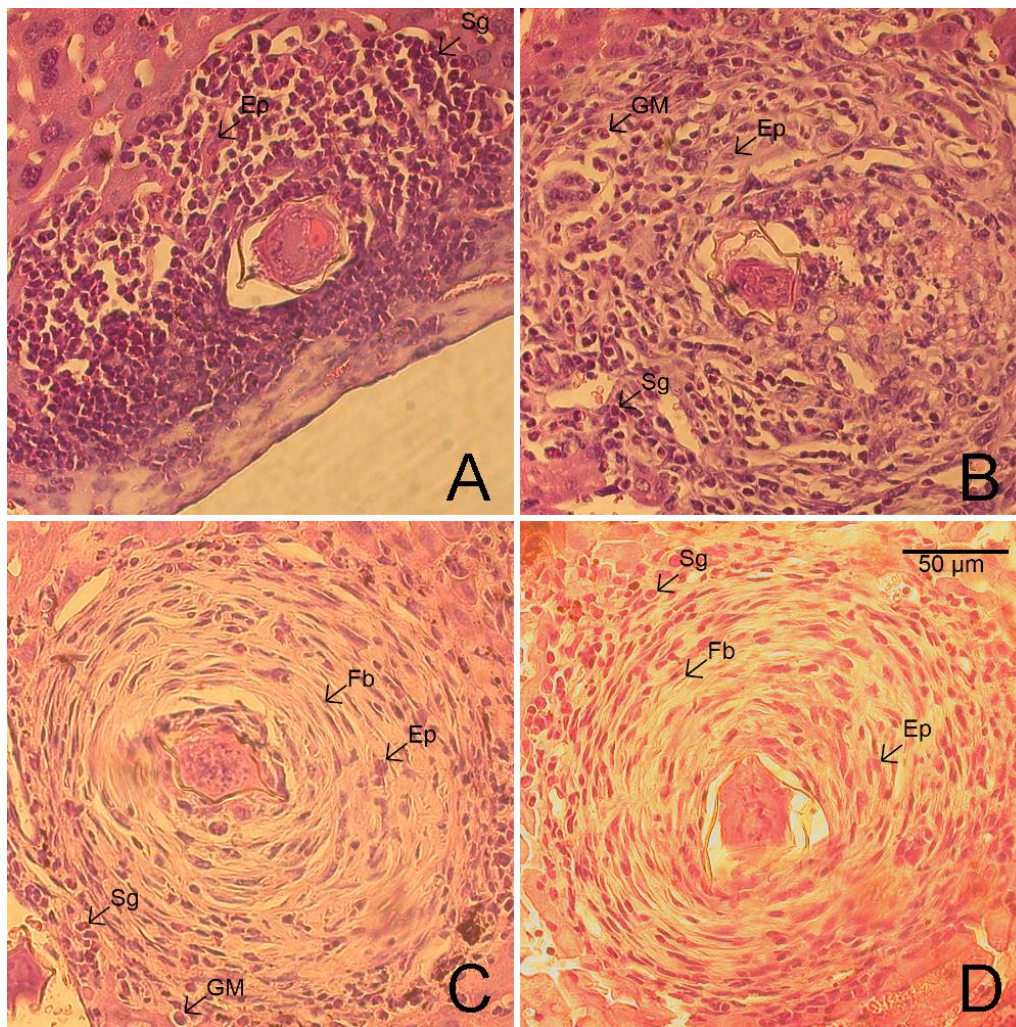


Figura 10. Respuesta inflamatoria y granulomatosa frente a huevos de *Schistosoma mansoni* en ratones Balb/c con 7 y 20 semanas de infección. A y B: 7 semanas de infección, predominio de segmentados y células apitelioides. C y D: 20 semanas de infección, predominio de fibroblastos.

La respuesta inflamatoria en 7 semanas de infección está caracterizada en un principio por células segmentadas (Sg) de tipo neutrófilos que se disponen en la periferia inmediata del huevo, promoviendo el aumento de la concentración de macrófagos y células apitelioides (Ep/M) sobre el cuerpo extraño. En granulomas con distintas etapas de desarrollo, la disposición cambia, observándose predominio de células amorfas y desordenadas epitelioides (Ep) en la adyacencia inmediata del huevo, intercaladas hacia la sección media y externa del granuloma con células segmentadas (Sg) y gigantes multinucleadas (GM). En 20 semanas de infección existe un predominio celular de fibroblastos (Fb), los cuales pueden observarse en un principio en el área más interna del granuloma, intercalándose en la sección media con células epitelioides (Ep/M) y disminuyéndose casi en su totalidad en las secciones más externas, dejando paso a una cantidad relativamente mínima de células de tipo segmentados (Sg) y gigantes multinucleadas (GM). Otras formaciones granulomatosas de 20 semanas de infección se caracterizan por presentar, casi en su totalidad, fibroblastos (Fb) desde la sección interna hasta la más externa, solo observándose una cantidad mínima de células epitelioides (Ep/M) en la sección media.

El conteo diferencial de los morfotipos celulares para granulomas de 7 y 20 semanas de infección presentó diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,0001$ para análisis de Kruskal-Wallis). El análisis de comparaciones múltiples de Dunn mostró el predominio celular dentro de cada grupo de tiempo de infección. En 7 semanas, existen diferencias significativas en el conteo celular entre Fb vs. Ep ($P = 0,0325$) y entre Sg vs. GM ($P = 0,016$); en 20 semanas solo hay diferencias significativas entre Fb vs. GM ($P = 0,0009$), aunque se observa tendencia al aumento considerable de Fb en voga de Sg. ($P = 0,0559$). El único morfotipo celular que presentó diferencias significativas en el conteo entre tiempos de infección fue Fb ($P = 0,042$), el cual aumenta considerablemente en 20 semanas (Figura 11).

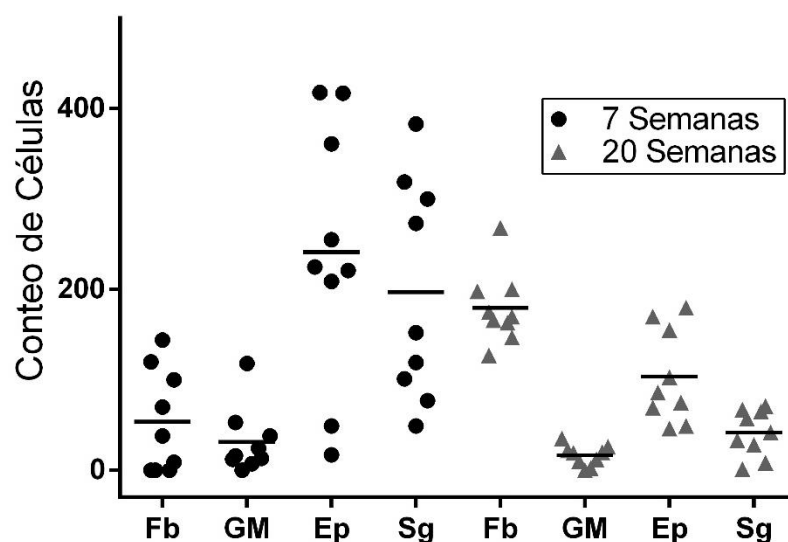


Figura 11. Conteo de morfotipos celulares de respuesta inflamatoria para cada tiempo de infección.

Área de respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria frente al huevo de *S. mansoni* presentó un área promedio de 53.546,33 μm^2 en 7 semanas de infección y 36.260,42 μm^2 en 20 semanas. Además de ser mayor en promedio, también es más variable el tamaño del granuloma en 7 semanas de infección (Desv. Estándar= 33.363,11 μm^2 , contra 16158,87 μm^2), lo cual se observa en los áreas máximas y mínimas medidas con una mínima de 8184,08 μm^2 y máxima de 134491,38 μm^2 en 7 semanas, en contraste con una mínima de 18561,41 μm^2 y máxima de 81350,77 μm^2 en 20 semanas de infección. Una prueba de T para datos no pareados mostró diferencias significativas en el área de respuesta tanto total ($P=0,0109$) como neta ($P=0,0052$) (Tabla 4).

Pesos de hígado y bazo

En promedio, los mayores pesos de hígado se dieron en ratones con infecciones de 20 semanas, con un máximo de 1,95 gr en hígado en infección de carga alta, seguido de 1,88 gr en carga media y 1,44 gr en carga baja, siempre mayor significativamente que el promedio del grupo control del mismo tiempo ($P=0,0417$ para carga baja; $P=0,0139$ para carga media;

P=0,0140 para carga alta por prueba de Mann-Whitney), situación similar en el caso del bazo, el cual presenta un peso máximo de 0,29 gr en carga alta, y siempre presentando diferencias significativas con respecto al control del mismo tiempo, para todas las cargas (P=0,0154 carga baja; P=0,0056 carga media; P=0,0050 para carga alta por prueba de Mann-Whitney) (Tabla 5).

Tabla 4. Estadística descriptiva del tamaño de la respuesta inflamatoria y granulomatosa en ratones de 7 y 20 semanas de infección.

Tiempo de Infección	Área del Granuloma (μm^2)*			
	Promedio	Desv. Estándar	Mínima	Máxima
7 semanas	56612,39	35857,87	8184,08	139913,59
20 semanas	38366,20	16426,77	20210,27	84361,80
Tiempo de Infección	Área de la Respuesta Inflamatoria (μm^2)**			
	Promedio	Desv. Estándar	Mínima	Máxima
7 semanas	53546,33	33363,11	8184,08	134491,38
20 semanas	36260,42	16158,87	18561,41	81350,77

*Área de respuesta incluyendo el huevo.

** Área de respuesta sin incluir el huevo.

En 7 semanas de infección, el peso promedio de hígado más alto se presenta en el grupo de carga media (1,56 gr), seguido del grupo de carga alta (1,4 gr), ambos presentando diferencias significativas con respecto al grupo control del mismo tiempo (1,03 gr) (P=0,013 en carga media y P=0,0314 en carga alta por prueba de Mann-Whitney). En cargas bajas, aunque en promedio hay aumento de tamaño (1,38 gr) las diferencias no son significativas con respecto al control. El promedio de peso más alto en el bazo se observa en el grupo de carga alta (0,26 gr) mostrando diferencias significativas en relación al control (0,1 gr) (Tabla 4). En ratones con 3 semanas de infección no se obtuvieron resultados estadísticamente representativos en cuanto a la respuesta inflamatoria, sin embargo, se pudieron realizar observaciones interesantes en cuanto al desarrollo de la patología hepática. En cortes de ratón con una infección de carga alta de 3 semanas se evidenció la presencia de esquistosómulos en la vena porta hepática y atrapado en el tejido, rodeado de una intensa respuesta inflamatoria constituida por segmentados neutrófilos. De la misma manera se realizaron observaciones interesantes en cortes de ratón con infección de carga alta de 7 semanas, en

donde se notó la presencia de esquistosómulos adultos en áreas circulatorias del tejido hepático. En este caso no se observa respuesta inflamatoria frente a estos estadios del parásito (Figura 11).

Tabla 5. Peso de hígado y bazo en ratones Balb/c con diferente carga parasitaria y tiempos de infección.

	Grupo de Infección	Promedio (gr)	Desv. Estándar		Grupo de Infección	Promedio (gr)	Desv. Estándar
Hígado	B3	1,39	0,15	Bazo	B3	0,12	0,04
	B7	1,38	0,3		B7	0,14	0,05
	B20*	1,44*	0,29		B20*	0,14*	0,07
	M3	1,21	0,25		M3	0,12	0,04
	M7*	1,56*	0,17		M7	0,14	0,05
	M20*	1,88*	0,3		M20*	0,18*	0,06
	A3	0,9	0,22		A3	0,10	0,1*10 ¹⁶
	A7*	1,4*	0,27		A7*	0,26*	0,12
	A20*	1,95*	0,34		A20*	0,29*	0,13
	C3	1,27	0,21		C3	0,09	0,01
	C7	1,03	0,15		C7	0,1	0,1*10 ¹⁶
	C20	1,12	0,32		C20	0,09	0,008

*Presenta diferencias significativas con respecto a controles sanos del mismo tiempo de infección.

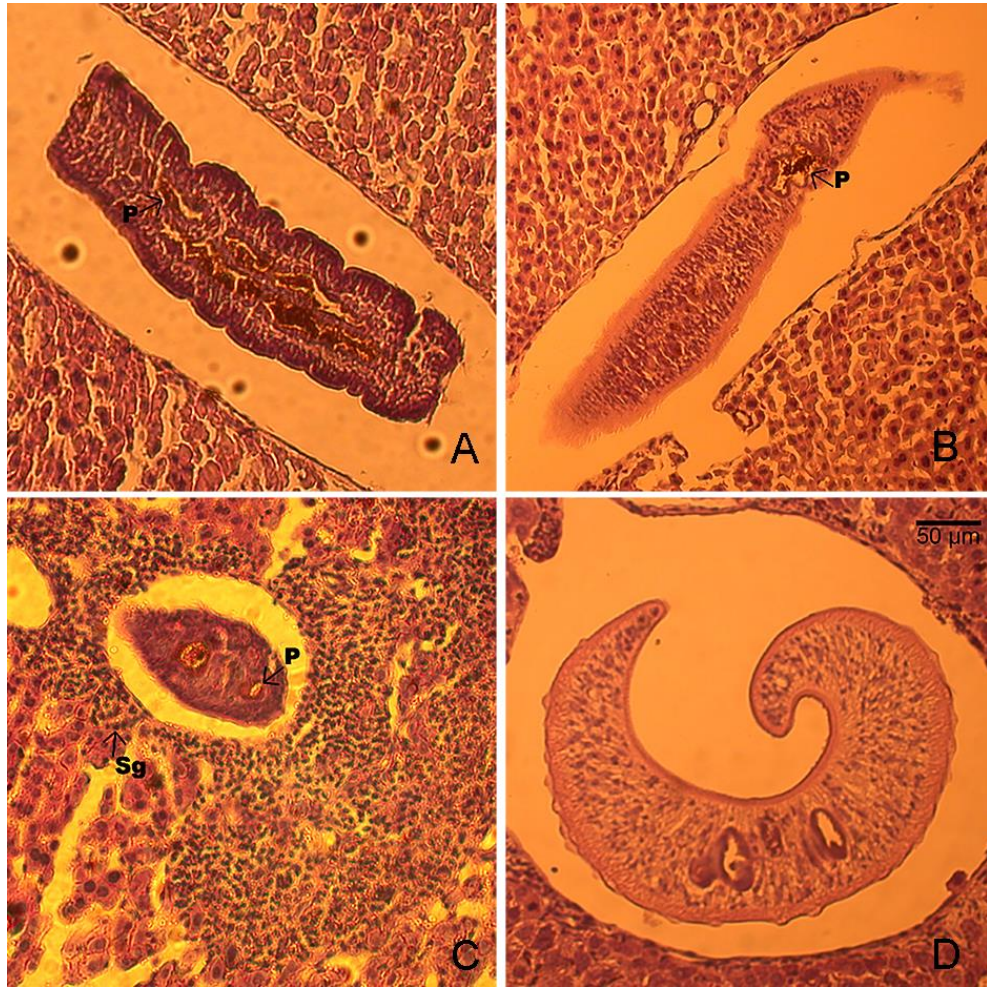


Figura 12. Esquistosómulos y vermes adultos en torrente circulatorio y tejido hepático en ratones Balb/c con infección de carga alta de 3 y 7 semanas. A: A: Esquistosómulo en ramal de vena porta hepática, 3 semanas 10X. B: Esquistosómulo en ramal de vena porta hepática, 3 semanas 10X. C: Sección de esquistosómulo juvenil en tejido hepático con respuesta inflamatoria asociada, 3 semanas 20X. D: Esquistosómulo adulto en torrente circulatorio, 7 semanas 20X.

Detección de marcadores de fibrosis hepática

Se realizaron pruebas inmunohistoquímicas para la detección localizada de tres marcadores de inflamación (TNF- α , IL-10 y VEGF) en cortes de tejido de hígado.

Pruebas inmunohistoquímicas

En ratones con 3 semanas de infección solo se observó reacción de marcaje con IL-10 sobre hepatocitos normales, y VEGF leve sobre el mismo tipo celular en animales infectados con carga alta. En ratones con 7 semanas de infección, con presencia de respuesta inflamatoria en tejido, se observó reacción de marcaje para todas las citoquinas estudiadas, especialmente en ratones con cargas medias y altas con IL-10, evidenciando respuesta mayoritariamente en células segmentadas y epitelioides. El marcaje por TNF- α se presentó mayoritariamente en células segmentadas y epitelioides en infecciones con carga media, mientras que en cargas altas el marcaje fue mínimo y sobre células normales, epitelioides y segmentadas. VEGF presentó un marcaje mínimo y principalmente sobre células normales adyacentes a células de respuesta inflamatoria, aparte de presentar un marcaje particular sobre los huevos infiltrados en el tejido.

En ratones con 20 semanas de infección, el mayor marcaje se observó con TNF- α , principalmente sobre células de tipo fibroblastos y segmentados, y en menor medida sobre células epitelioides; esto en el caso de infección con carga alta, ya que, en cuanto a la infección con carga baja, donde se observa menor respuesta inflamatoria, el marcaje de TNF- α se aprecia disperso y en hepatocitos normales. VEGF presentó marcaje importante y de forma particular sobre los huevos presentes en el tejido en infecciones de todas las cargas parasitarias; en cargas bajas se aprecia marcaje sobre fibroblastos y, en menor medida, sobre células segmentadas. No hay presencia de marcaje de por IL-10 para ninguna de las cargas parasitarias en 20 semanas de infección. En la figura 13 se presentan fotografías representativas de los marcajes para diferentes tiempos de infección.

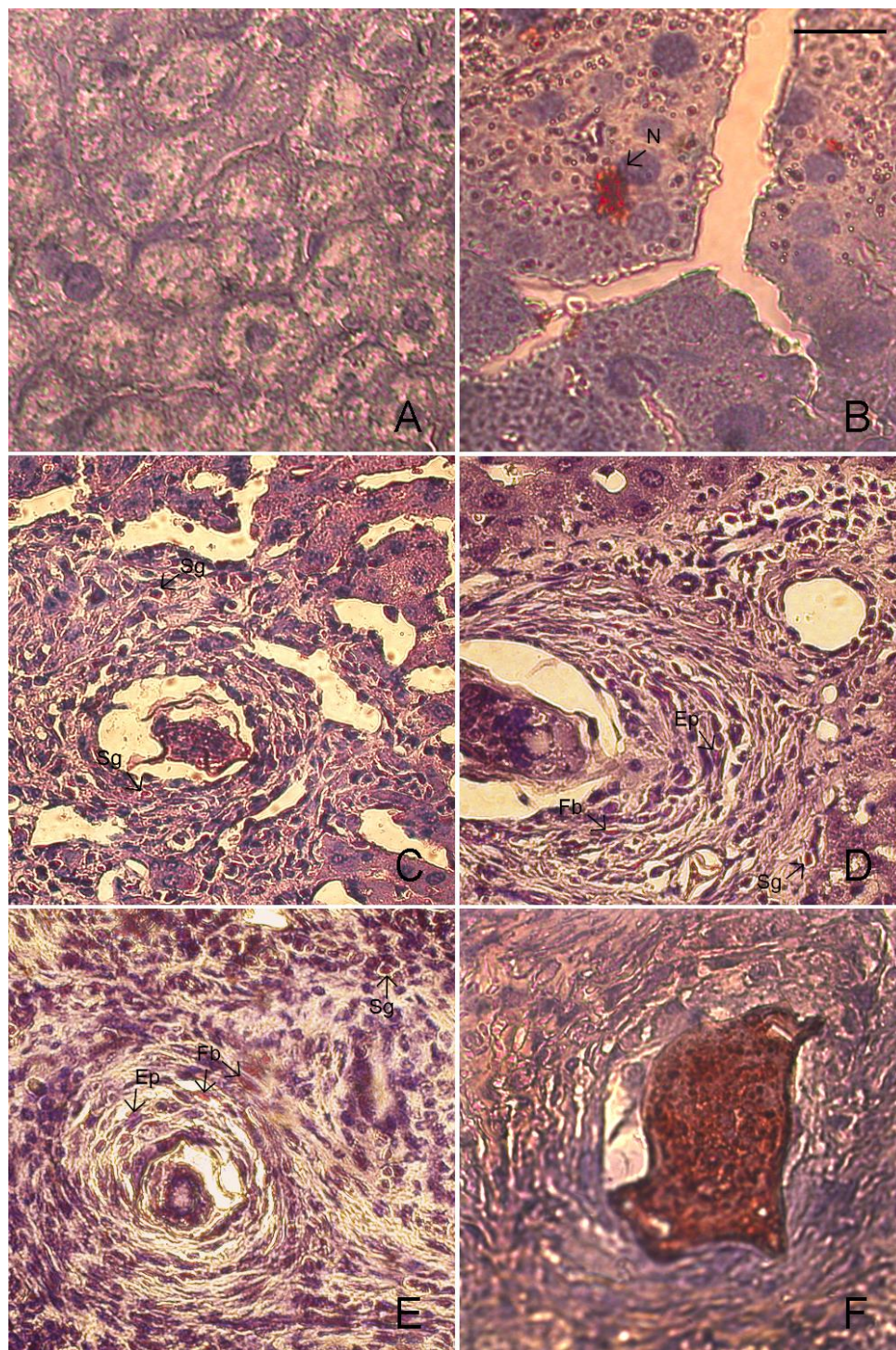


Figura 13. Marcaje inmunohistoquímico sobre cortes de hígado con distintos tiempos de infección. Se muestran imágenes representativas del registro fotográfico para IL-10, TNF- α y VEGF. A: Grupo control. Sin marcaje. B: Marcaje VEGF, 3 semanas. C: Marcaje IL-10, 7 semanas. D: Marcaje TNF- α , 7 semanas. E: Marcaje TNF- α , 20 semanas. F: Marcaje VEGF, 20 semanas.

DISCUSIÓN

La búsqueda de alternativas diagnósticas para la detección de infección por *Schistosoma mansoni* es de importancia primordial en condiciones epidemiológicas particulares como lo son las áreas de baja transmisión, donde la disminución de la carga parasitaria en las zonas endémicas disminuye significativamente la sensibilidad de las pruebas habituales (Cavalcanti *et al.*, 2013), por lo que la evaluación de la respuesta IgM e IgG con distintas preparaciones antigénicas utilizando la prueba de ELISA en modelos murinos resultó en este estudio con resultados que aparentan ser relevantes, teniendo en cuenta que se demostró una simulación apropiada de la condición endémica con resultados positivos en función de la capacidad de detección de las pruebas serológicas evaluadas en comparación con las pruebas estándar de referencia.

Evaluación serológica

La técnica de coprología directa demostró una variación significativa en la detección de la infección entre los distintos grupos de ratones evaluados, lo que indica una relación entre la carga parasitaria y el tiempo de infección con la capacidad de detección de la parasitosis por coprología directa, por lo que se observa positividad nula en 3 semanas de infección, donde no se detectaron huevos bajo ninguna carga parasitaria y aumenta a medida que la carga parasitaria es mayor, especialmente en 7 semanas.

En cargas medias y bajas con 7 y 20 semanas de infección, aunque el conteo de huevos aumenta, no fue suficiente para detectar la infección en la mayoría de los individuos. Solo en el grupo de 7 semanas con carga alta, se obtuvo un conteo de huevos considerablemente mayor que permitió detectar la infección en 90% de los ratones evaluados. Dado que la completa maduración de los esquistosómulos y la consecuente oviposición en el hospedador tiene lugar luego de 4-6 semanas de la infección primaria originada por la entrada de la cercaria (Abdul-Ghani & Hassan, 2010; Gryseels *et al.*, 2006), una infección de 3 semanas en ratones puede considerarse una infección prepatente, en las cuales se ha demostrado la ineficacia de las pruebas coprológicas en humanos en períodos menores a 60 días luego del contacto con aguas infectadas (de Jesus *et al.*, 2002).

Existe una variación evidente en cuanto a los porcentajes de positividad por esta prueba en 7 y 20 semanas de infección dependiendo de la carga parasitaria, especialmente entre lo observado en carga alta con respecto a cargas medias y bajas en 7 semanas de infección, en donde la coprología directa solo fue capaz de detectar la infección en 20% de los casos frente a 30% de detección en infecciones de 20 semanas; lo que se corresponde directamente con la carga parasitaria y ha demostrado ser una variable importante en cuanto a la sensibilidad de técnicas coprológicas en áreas de baja transmisión, en donde los individuos infectados se caracterizan por presentar un conteo mínimo de huevos debido a una infección con baja carga (Noya *et al.*, 2002); por otra parte, se tiene evidencia que las técnicas coprológicas pueden variar considerablemente dependiendo del momento de realización del experimento incluso sobre el mismo individuo y cantidad de muestra, especialmente en condiciones específicas como las evaluadas en este estudio (Engels *et al.*, 1996; Kongs *et al.*, 2001).

En los grupos de carga alta, hubo un valor máximo de 90% en la detección a 7 semanas de infección en contraste a una detección totalmente negativa en 20 semanas (Figura 2); esto evidencia una disminución de la ovoposición de los gusanos en ratones infectados con tiempos de infección largos, lo cual ha sido observado en estudios en ratones Balb/c con diferentes cargas parasitarias, donde el conteo de huevos en heces llega a un pico máximo en 8 semanas de infección y disminuye luego progresivamente (Cheever *et al.*, 1994), además de ser confirmado por experimentos de fecundidad *in vitro* de gusanos obtenidos de ratones con diferentes tiempos de infección, con lo que se demostró que la ovoposición diaria en gusanos es máxima con 8 semanas de infección y disminuye hasta un mínimo luego de 12 semanas (Ridi *et al.*, 1997).

Por otra parte, con la prueba de PPCO se pudo detectar la infección en mayor medida que la prueba coprológica en todos los grupos a excepción del grupo A7, donde la positividad por coprología fue mayor. Es notable la disminución de la efectividad de esta prueba en etapas tempranas de la infección (3 semanas), donde el máximo de positividad de la misma es de 50% en el grupo de carga media. Teniendo en cuenta que esta prueba se fundamenta en el contacto del suero del individuo infectado con huevos viables del parásito y la formación de una reacción de precipitación alrededor de estos últimos, hace falta el desarrollo de la

respuesta inmune frente a los huevos, lo cual es consecuencia de que aún no se ha desarrollado respuesta inmune frente a los antígenos del huevo (Weerakoon *et al.*, 2015).

Llama la atención la poca información referente al uso de la PPCO en modelos experimentales, lo cual se deba probablemente a que su sensibilidad es menor respecto a la reportada sobre humanos (Rodriguez-Molina *et al.*, 1962), la cual incluso en áreas de baja transmisión llega a ser mayor al 96% (Noya *et al.*, 2002). Sin embargo, en primera instancia, su evaluación comparativa entre humanos, monos, ratones y conejos infectados, no presentó diferencias en cuanto a la observación de la reacción de precipitina, la cual se reportó principalmente en forma globular en humanos, y en forma de largas cadenas en monos (Oliver-Gonzalez, 1954; Oliver-González *et al.*, 1955). Nuestras observaciones demuestran que la reacción de precipitación se da en ratones Balb/c y puede ser usada para la evaluación diagnóstica de métodos no estandarizados y con propósitos académicos y didácticos. Sin embargo, los porcentajes de positividad reportados en este estudio son menores a los reportados para humanos en áreas endémicas, por lo que sería de interés una mejor evaluación de la técnica que permita determinar los factores que pudieran influir en la variación de la prueba con respecto a lo observado en humanos. Resalta el hecho de que, por ejemplo, gran parte de los huevos positivos presenta una reacción de tipo granular, que pudiera pasar desapercibida al ojo poco entrenado para la evaluación de la prueba. Sin embargo, los resultados obtenidos, aunque en menor grado que lo observado clásicamente en humanos, mostraron reacciones globulares y en cadena que no dan lugar a ambigüedades en cuanto a la positividad de la reacción de precipitina.

Respuesta IgM e IgG por ELISA

Las pruebas de ELISA con distintas preparaciones antigénicas presentaron una detección mínima en tiempos cortos de infección (3 semanas), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por test de PPCO y está relacionado con el nivel de maduración del parásito en el hospedador; teniendo en cuenta que todas las preparaciones antigénicas utilizadas requieren de estadios desarrollados del parásito y huevos, los cuales no se desarrollan en ratones sino luego de 5 semanas de infección (Abdul-Ghani & Hassan, 2010). Parece interesante destacar que la mayor respuesta sobre sueros de 3 semanas de infección (20% de positividad) se haya dado a través de la determinación de IgG con productos de

excreción-secreción de gusanos y huevos, en infecciones de carga alta, teniendo en cuenta que durante el estudio se confirmó la presencia de vermes juveniles en el tejido hepático de ratones con este tiempo de infección y tomando en consideración estudios previos que plantean la importancia de estas preparaciones antigénicas en la detección de infección activa (Wang *et al.*, 2013), aunque no hayan sido probadas específicamente en etapas prepatentes.

Es conocido el proceso de inmunomodulación promovido por antígenos de estadios tempranos del parásito en hospedadores infectados en etapas de infección prepatente (de Oliveira Fraga *et al.*, 2010; Ferragine *et al.*, 2013) sin embargo, estudios con antígenos cercariales que buscan detectar los anticuerpos de desarrollo temprano para el diagnóstico de infección temprana, no han sido satisfactorios en cuanto a la sensibilidad con respecto a preparaciones antigénicas clásicas de huevo (Smith *et al.*, 2012), estudios de detección de anticuerpos de cisteína proteínasa anti-*Schistosoma* por ELISA parecen mostrar efectividad en pruebas en humanos (Abdul-Fattah *et al.*, 2000), lo que apunta a que los métodos de detección de ADN en sangre pueden ser la alternativa más eficiente para el diagnóstico en esta fase de la infección (Hussein *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011).

En ratones con infección aguda de 7 semanas, se observa un aumento significativo en la capacidad de detección de las pruebas de ELISA con respecto a lo observado en individuos con 3 semanas de infección, especialmente en cargas parasitarias altas, donde 3 antígenos (ASH, ASGH, PESH) presentaron 100% de positividad, 30% más que las pruebas de referencia. El predominio de la positividad por detección de IgM se mantiene tanto en cargas medias como bajas, siempre sobre el 60% de detección siendo superada en positividad solo en cargas bajas, por la prueba de PPCO (90%). Recientemente, se ha demostrado la sensibilidad de la prueba de ELISA IgM en la evaluación de la prevalencia de la infección en áreas de baja transmisión (Espirito-Santo *et al.*, 2014), lo cual es apoyado por nuestros resultados. Otros estudios han reportado un aumento en la sensibilidad del diagnóstico de la esquistosomiasis aguda en humanos, a través de pruebas de ELISA-IgG, utilizando preparaciones antigénicas de tegumento de esquistosómulo, con 80% de positividad (Grenfell *et al.*, 2013); nuestras pruebas de ELISA-IgM fueron capaces de detectar hasta

100% de infección en los casos evaluados en grupos de carga alta, y hasta 80% entre cargas medias y bajas, con lo que se evidencia el potencial diagnóstico de las componentes crudas de las preparaciones antigénicas utilizadas solas o en combinación.

En animales de grupos de infección crónica la respuesta fue contraria a la observada en grupos de infección aguda, evidenciándose un aumento significativo de la respuesta de tipo IgG con respecto a la de tipo IgM para las mismas preparaciones antigénicas, lo que plantea la utilidad del uso de la detección de diferentes anticuerpos en la diferenciación de infección aguda o crónica, tomando en consideración observaciones sobre la existencia de diferencias en los perfiles de los isotipos y subclases de anticuerpos de acuerdo al tiempo de infección (Shaheen *et al.*, 1996), además de que se ha demostrado que la diferenciación entre isotipos de anticuerpos también contribuye al aumento de la especificidad, disminuyendo los falsos positivos debidos a la reactividad cruzada de la esquistosomiasis con otras parasitosis (Beck *et al.*, 2008).

Los distintos métodos de detección directa de esquistosomiasis han demostrado disminuir sustancialmente su sensibilidad en áreas de baja transmisión, debido principalmente a la disminución de la carga parasitaria en individuos infectados y consecuentemente la disminución de la excreta de huevos en las heces (Cavalcanti *et al.*, 2013; Noya *et al.*, 2002). Es interesante que los resultados de las pruebas evaluadas en este estudio no presentaron variaciones significativas en su respuesta entre los grupos de distinta carga parasitaria, mientras que es evidente la presencia de diferencias considerables en la capacidad de detección de la enfermedad a través de coprología, dependiente de la carga parasitaria. Esto demuestra una simulación eficiente del comportamiento de la esquistosomiasis humana en áreas de baja transmisión a través del modelo murino desarrollado en este estudio y afianza el conocimiento sobre importancia del uso de pruebas serológicas de detección de anticuerpos para el diagnóstico en áreas de baja transmisión.

Las preparaciones antigénicas no presentaron diferencias significativas en cuanto a su capacidad de detectar la enfermedad, pero puede destacarse que ASH y PESH fueron las preparaciones que, en comparación al resto, mantuvieron siempre un porcentaje alto de positividad. Cabe destacar, que estas son preparaciones antigénicas crudas, con una gran cantidad de componentes que pueden o no intervenir en la interacción frente a los anticuerpos

del hospedador (Neves *et al.*, 2015) y que pudieran promover incluso reactividad cruzada con otros helmintos, disminuyendo así la sensibilidad de las pruebas en las que se usan (Alarcón de Noya *et al.*, 2001; Cavalcanti *et al.*, 2013), lo cual no se evaluó en este estudio, sin embargo, los resultados obtenidos en los ratones no infectados dan una idea de un alto grado de especificidad o al menos que las determinaciones son sensibles a cambios en la carga y tiempo de infección del animal infectado.

Se han evaluado moléculas recombinantes específicas de antígenos de *Schistosoma japonicum*, mostrando en combinación una sensibilidad de hasta 100% (Chen *et al.*, 2013), además de que se han identificado proteínas específicas de productos de excreción-secreción de *S. mansoni*, que parecen tener una reactividad específica a corto plazo con potencial utilidad en la detección de infección activa (Wang *et al.*, 2013). Esto demuestra la necesidad de la caracterización y evaluación de moléculas específicas de estas preparaciones crudas que pudieran promover, solitarias o combinadas, un aumento definitivo de la sensibilidad disminuyendo los problemas de especificidad.

Caracterización Antigénica

Se identificaron polipéptidos específicos reactivos con sueros positivos de ratones Balb/c infectados con distinta carga parasitaria y tiempos de infección, en función de la respuesta IgM e IgG. Es notable la variabilidad en el reconocimiento antigénico en función del isotipo de inmunoglobulina, observándose mayor respuesta en IgG. La respuesta IgM, por su parte, aunque presenta alta variabilidad, la mayoría de los antígenos reconocidos se ubicaron en el rango de alto peso molecular (entre 103 y 175 kDa) y no son discriminantes de infección puesto que son reconocidas en su mayoría por controles no infectados; este hecho y los resultados de otros grupos de investigación (Sulahian *et al.*, 2005) hacen pensar que las bandas son de poca utilidad en el diagnóstico de la fase aguda de la infección, puesto que son responsables de reactividad inespecífica.

En cuanto a la capacidad de los antígenos de discriminar la fase de infección, lo más resaltante se observa a través de la respuesta IgG. Los grupos A7 y A20 presentaron una reactividad específica importante con diferencias en cuanto a los isotipos observados en

ambos pool de sueros. El pool de sueros del grupo A7 muestra bandas propias de 73, 57, 35 y 15 kDa, En el grupo A20 solo se observó una banda específica de 25 kDa. Esto parece indicar una diferencia en los perfiles de reactividad de la IgG, frente a etapas de infección, que pudieran evaluarse como específicos para distintos tiempos de infección. Estudios han demostrado la existencia de diferencias en los perfiles de reactividad de antigénica para esquistosomiasis aguda y crónica en humanos, en los cuales se reporta una alta frecuencia de una proteína de 32/31 kDa reactiva para IgG e IgM en fases agudas de la infección, y esta disminuye en etapas crónicas (Cesari *et al.*, 2005; Valli *et al.*, 1999).

En cuanto a las proteínas reconocidas por antígeno, nuestros resultados muestran un mayor reconocimiento de bandas por antígenos solubles de gusano hembra por IgG y producto de excreción-secreción de gusano hembra por IgM, que es contrastante con estudios anteriores con ratones Balb/c, que muestran un mayor reconocimiento de bandas por parte de antígeno soluble de huevo, pero presentan concordancia con varios de los pesos moleculares reportados por este estudio (Barrios *et al.*, 2010).

Histopatología del Hígado

La caracterización histopatológica de los hígados en los ratones evaluados en este trabajo, sirve como base para demostrar la presencia de cambios histopatológicos dependientes de las distintas etapas de la infección por *Schistosoma mansoni*, A fin de plantear satisfactoriamente la relación entre los cambios observados a nivel serológico y el avance de la infección.

El aumento del tamaño de los hígados de ratones infectados con respecto a los controles demuestra el desarrollo de hepatoesplenomegalia ligada a la respuesta inflamatoria hepática descrita anteriormente, lo cual ha sido descrito como una característica distintiva de etapas avanzadas de la infección y es un factor clínico importante en la esquistosomiasis humana (Gryseels *et al.*, 2006).

La presencia de estadios tempranos de vermes de parásito en el tejido hepático en 3 semanas de infección con presencia de respuesta inflamatoria característica, demuestra las propiedades antigénicas y pro-inflamatorias que poseen los gusanos juveniles de *Schistosoma* en etapas tempranas de la infección, incluso en ausencia de los huevos y gusanos adultos, lo

cual ha sido planteado en estudios que infieren sobre la importancia del recambio tegumental del parásito en sus distintos estadios, incluso el juvenil y su interacción y realción con el desarrollo de la respues inmune del hospedador (Hockley & McLaren, 1973; Skelly *et al.*, 2014).

Las descripciones histológicas de los granulomas en 7 semanas de infección observadas en nuestro estudio, son características de la fase aguda de la infección. La presencia de gran cantidad de leucocitos en el hígado demuestra una reacción primaria a la presencia del huevo en el tejido hepático (Zuim *et al.*, 2012), en respuesta a mecanismos inmunomodulatorios como lo son la activación de células de tipo T CD4+ consecuente con una respuesta inmune de linfocitaria tipo Th₁. El aumento significativo de la cantidad de células de tipo fibroblásticas en 20 semanas de infección, por su parte, es típico de infecciones avanzadas, donde la formación de la fibrosis sustituye la aglomeración de células de tipo epitelioide y segmentadas, previo a la eliminación completa del huevo (Bica *et al.*, 2000).

Se observó un mayor tamaño del área de respuesta en infecciones de 7 semanas de infección, lo que guarda relación con lo planteado anteriormente, teniendo en cuenta que el predominio de células fibroblásticas en etapas tardías asociado a la ausencia del huevo implican una disminución de la señalización promotora de la respuesta inmune pro-inflamatoria, lo que finalmente disminuye el área del granuloma (Zuim *et al.*, 2012)

Detección de Marcadores de Fibrosis Hepática

El marcaje inmunohistoquímico mostró tendencias interesantes en cuanto a las citoquinas detectadas en el tejido de ratones Balb/c con distinta carga parasitaria y tiempos de infección. El marcaje de IL-10 sobre células hepáticas normales, segmentadas y epitelioides en individuos con 3 y 7 semanas de infección, confirma la actividad de esta citoquina en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria frente a la presencia de esquistosómulos y huevos de *Schistosoma mansoni* en el tejido hepático; su actividad ha sido relacionada con la modulación de la transición de la respuesta inmune entre tipos Th₁ y Th₂ (Stadecker *et al.*, 2004) y la regulación del tamaño del granuloma (Bourke *et al.*, 2013), lo que asocia su presencia principalmente con infección aguda.

El marcaje por TNF- α fue mayormente observable sobre células de tipo fibroblastos y segmentados en individuos con etapas avanzadas de infección, especialmente aquellos con mayor desarrollo de abundantes células fibroblásticas y en menor medida sobre células hepáticas en infecciones de 7 semanas con carga alta, y con carga media sobre células segmentadas y epitelioides. En ratones, el TNF- α se ha planteado como una citoquina regulatoria antifibrótica sinérgicamente con otras de respuesta Th1, que parecen promover la regulación del avance de la fibrosis en el hígado y su concentración parece aumentar en etapas medias y avanzadas de la infección (Hoffmann *et al.*, 1998). En humanos, se ha demostrado una relación entre el desarrollo de fibrosis hepática y el aumento de las concentraciones de TNF- α en la sangre (Booth *et al.*, 2004), lo que identifica a esta citoquina como un marcador de fibrosis avanzada por esquistosomiasis.

La presencia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se ha planteado como propia de procesos inflamatorios relacionados con angiogénesis en tejido. Su estudio en el desarrollo de la patología hepática la esquistosomiasis murina, ha demostrado la presencia del marcaje de VEGF en infecciones agudas de 8 semanas sobre células poco localizadas en el tejido, lo que relaciona el marcaje de este factor de crecimiento con el contacto inicial entre el huevo y gusano de *Schistosoma* (Barrios *et al.*, 2013a); esto es comparable con lo observado en el presente estudio, donde el marcaje por VEGF es mínimo y localizado en células no inflamatorias normales en 3 semanas de infección, y en células aisladas del infiltrado inflamatorio en 7 semanas de infección. Otro estudio ha planteado la importancia de la señalización por VEGF para remodelado vascular estimulado a través de la respuesta inmune inducido por la presencia del huevo de *S. mansoni*, estando así relacionada al desarrollo de la respuesta inflamatoria tardía asociada al desarrollo de fibrosis en el tejido afectado (Chabon *et al.*, 2014).

En individuos con 20 semanas de infección, se observó un marcaje mínimo por VEGF en células de tipo fibroblastos y segmentadas, mientras que el marcaje fue prácticamente nulo en mayores cargas parasitarias. Aunque presentó un marcaje particular sobre huevos en distintas etapas de infección, esto podría tratarse de un marcaje inespecífico asociado con reactividad frente a peroxidasa asociada a los huevos atrapados en el tejido hepático. Sin embargo, llama la atención el hecho de que esto se haya observado solo en marcajes

realizados con VEGF, lo que de la misma forma podría asociarse a algún tipo de reactividad angiogénica temprana asociada con la presencia del huevo promovida por esta proteína, como se ha planteado en estudios anteriores (Shariati *et al.*, 2011).

Este trabajo representa un avance importante en el estudio de las alternativas diagnósticas serológicas necesarias para la detección de la esquistosomiasis en condiciones particulares, como lo son las bajas cargas parasitarias, características de áreas de baja transmisión, en donde los métodos diagnósticos clásicos han demostrado tener poca efectividad al momento de detectar infección activa. A través de este modelo murino fue posible demostrar que con combinaciones antigénicas crudas, es posible detectar hasta en un 100% de los casos anticuerpos IgM e IgG en sueros de individuos infectados con diferentes cargas parasitarias y tiempos de infección a través de una técnica de ELISA convencional. Una mayor profundización en la caracterización de las preparaciones antigénicas o probables combinaciones de las mismas podría ser de gran ayuda para posibles estudios futuros que además puedan determinar la especificidad de estas pruebas, a través de la evaluación de reactividad cruzada, lo cual no se planteó en este estudio, aunque la reactividad negativa por parte de los grupos control no infectados para todas las pruebas evaluadas demuestra la especificidad de las preparaciones evaluadas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En cuanto a la caracterización celular histológica de las lesiones inflamatorias en el hígado de los individuos evaluados se observó diferencias dependientes del tiempo de infección, demostrando la variabilidad de la respuesta inflamatoria hepática de la esquistosomiasis en etapas de infección prepatente, aguda y crónica. En 3 semanas de infección, la histología hepática no muestra cambios, la importancia de la actividad de los vermes juveniles del gusano en el desarrollo de la respuesta inmune y su implicación en el desarrollo de la patología hepática debido a que fue posible su observación en secciones de tejido asociado con una respuesta inflamatoria característica. En 7 semanas de infección, la morfología celular asociada a la respuesta inflamatoria hepática presenta un predominio de células de tipo segmentadas y epitelioides, y un área de respuesta mayor a la observada en granulomas de individuos con 20 semanas de infección. En estos últimos, la morfología es fibrótica y disminuye considerablemente el número de células segmentadas y epitelioides en comparación a lo observado en 7 semanas de infección.

Los pesos de hígado y bazo aumentan significativamente en individuos infectados con respecto a grupos de control sanos, especialmente en el caso de cargas altas, en donde se observa un aumento significativo tanto en 7, como en 20 semanas de infección, mientras que en cargas bajas, solo en infecciones de 20 semanas se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los controles.

Se identificaron marcadores inflamatorios característicos de etapas de infección para los distintos grupos de prueba, resultando con la presencia de IL-10 en grupos de infección prepatente y aguda, principalmente sobre células de tipo segmentadas y epitelioides; IL-10 no presentó marcaje en cortes de 20 semanas de infección, lo cual asocia a esta citoquina con patología poco avanzada. TNF- α presentó un marcaje predominante en cortes de 20 semanas de infección, especialmente sobre células de tipo fibroblastos en granulomas de tendencia mayoritariamente fibrótica, asociando esta citoquina con infecciones en etapas avanzadas. El marcaje por VEGF se observó principalmente en etapas de infección prepatente y aguda, marcando mayoritariamente células hepáticas adyacentes a áreas de respuesta inflamatoria, y fue mínimo en etapas avanzadas de la infección sobre fibroblastos y células segmentadas solo en infecciones de carga media y baja, siendo casi nulo en el marcaje de células en

infecciones de cargas altas; en este último caso con la particularidad de presentar marcaje notable sobre los huevos en el tejido, lo cual podría asociarse a algún tipo de asociación de respuesta angiogénica temprana con la presencia del huevo o deberse a una reacción inespecífica, que de cualquier manera parece interesante para futuros análisis que pretendan caracterizar a mayor profundidad la actividad de VEGF en la respuesta angiogénica asociada a patología inflamatoria por esquistosomiasis.

Tanto la evaluación coprológica como la prueba de PPCO fueron insuficientes para detectar la totalidad de las infecciones en los individuos evaluados. La capacidad de detección de la coprología resultó estar muy asociada con la carga parasitaria y las etapas de la infección, teniendo en cuenta la disminución de su sensibilidad en tiempos cortos y en cargas parasitarias medias y bajas. La prueba de PPCO presentó mejores resultados en comparación con la coprología, siendo además su capacidad de discernimiento independiente de las cargas parasitarias de los individuos evaluados; sin embargo sus resultados fueron muy variables, lo cual puede estar asociado a la baja intensidad de la reacción de precipitina en modelos murinos y plantea una evaluación interesante en trabajos futuros, que permita determinar su verdadera capacidad de detección de infección activa de manera de poder utilizarse como control positivo estándar en futuros estudios de corte diagnóstico.

Se observó un alto porcentaje de positividad por IgM para todas las preparaciones antigénicas en infección aguda (100% por ASH, ASGH y PESH en cargas altas) y una disminución de la misma en infección crónica. Por su parte, la positividad de IgG fue significativamente mayor en infecciones crónicas (100% por PESH en carga baja; por ASH y PESH en carga media; y por PESH y PESGH en cargas altas). Los porcentajes de positividad nunca variaron significativamente dependiendo de los tiempos de infección.

Se demostró el uso potencial de las preparaciones antigénicas solas o combinadas en las condiciones empleadas en este estudio, en combinación con los isotipos de inmunoglobulinas IgM e IgG, teniendo en cuenta que su uso combinado podría ser capaz de diferenciar fases de la infección en una misma prueba.

La caracterización de isotipos reactivos de las distintas preparaciones antigénicas mostró como bandas de 73, 57, 35 y 15 kDa específicas de sueros con cargas altas y 7 semanas de infección y una única banda específica de 25 kDa para sueros con carga alta y 20

semanas de infección. Una banda de 10 kDa se observó tanto en ambos pool de sueros citados anteriormente. Todas estas bandas fueron detectadas usando IgG. El isotipo de 35 kDa se observó tanto en ASGH como en PESH, mientras que los isotipos de 73, 57 y 15 kDa se observaron solo en ASGH. El isotipo de 10 kDa solo se observó en PESGH.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Fattah, MM, el-Gindy, AE, Hegab, MH, el Mohammed, F, Kadry, YA, el-Dessouky, MI, & el-Gohary, F. (2000). Diagnosis of early pre-patent schistosomiasis by cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 30(2), 621-630.
- Abdul-Ghani, RA, & Hassan, AA. (2010). Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies. *Parasitology research*, 107(1), 1-8.
- Alarcón de Noya, B, Balzan, C, Arteaga, C, Cesari, I, & Noya, O. (1999). The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 139-146.
- Alarcón de Noya, B, Colmenares, C, & Noya, O. (2001). Comunidad antigénica y reactividad cruzada: su repercusión en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades parasitarias. Especial referencia a esquistosomiasis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 20(2), 163-171.
- Allam, AF. (2012). *Diagnosis of schistosomiasis in low endemic areas*: INTECH Open Access Publisher.
- Andrade, ZA. (1987). Pathology of human schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 17-23.
- Andrews, P. (1985). Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacology & therapeutics*, 29(1), 129-156.
- Barrios, E, Delgado, V, Araque, W, Pinto, V, Ojeda, O, & Ayala, J. (2010). Respuesta humoral murina y humana contra antígenos solubles de huevo y excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni*, tratados con praziquantel. *Revista Ibero-Latinoam de Parasitol*, 69(2), 178-185.
- Barrios, E, Delgado, V, Araque, W, Quintana, JF, Ojeda, O, & Ayala, J. (2013a). El factor de crecimiento del endotelio vascular hepático en la infección murina por *Schistosoma mansoni*.
- Barrios, EE, Tonino, P, Delgado, V, & Araque, W. (2006). *Schistosoma mansoni*: respuesta celular hepática de ratones Balb/c infectados unisexualmente. *Salus*, 10(3), 5-9.
- Barrios, MG, Barrios, EE, Marquez, ML, Hernández, R, Quintana, JF, & Ojeda, O. (2013b). Efecto de los microorganismos acuáticos (rotífera y ciliata) sobre la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni*, por *Biomphalaria glabrata* en el laboratorio.
- Beck, L, Van-Lüme, DSM, Souza, JR, Domingues, ALC, Favre, T, Abath, FGC, & Montenegro, SML. (2008). Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta tropica*, 108(2-3), 229-233.
- Bica, I, Hamer, DH, & Stadecker, MJ. (2000). HEPATIC SCHISTOSOMIASIS. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(3), 583-604.
- Booth, M, Mwatha, JK, Joseph, S, Jones, FM, Kadzo, H, Ireri, E, . . . Dunne, DW. (2004). Periportal Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection Is Associated with Low IL-10, Low IFN- γ , High TNF- α , or Low RANTES, Depending on Age and Gender. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1295-1303.
- Bottieau, E, Clerinx, J, De Vega, MR, Van den Enden, E, Colebunders, R, Van Esbroeck, M, . . . Van den Ende, J. (2006). Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *Journal of Infection*, 52(5), 339-345.

- Bourke, CD, Nausch, N, Rujeni, N, Appleby, LJ, Mitchell, KM, Midzi, N, . . . Mutapi, F. (2013). Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis. *Journal of Infectious Diseases*, 208(1), 159-169.
- Burke, M, Jones, M, Gobert, G, Li, Y, Ellis, M, & McManus, D. (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology*, 31(4), 163-176.
- Carneiro, TR, Pinheiro, MCC, Oliveira, SMd, Hanemann, ALdP, Queiroz, JAN, & Bezerra, FSM. (2012). Increased detection of schistosomiasis with Kato-Katz and SWAP-IgG-ELISA in a Northeastern Brazil low-intensity transmission area. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(4), 510-513.
- Carvalho, GBF, Silva-Pereira, RAD, Pacífico, LGG, & Fonseca, CT. (2011). Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(7), 837-843.
- Cavalcanti, MG, Silva, LF, Peralta, RHS, Barreto, MGM, & Peralta, JM. (2013). Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29(2), 75-82.
- Cesari, I, Pujol, F, Noya, O, Alarcon de Noya, B, & Ramos, A. (1987). Inmunoensayo enzimatico" ELISA.". *Esquistosomiasis mansoni. Diagnostico y control. Caracas, Venezuela: Centro de Estudios Avanzados, I*, 106, 76-80.
- Cesari, IM, Ballen, DE, Mendoza, L, & Matos, C. (2005). Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(2), 280-286.
- Colley, D, & Secor, W. (2014). Immunology of human schistosomiasis. *Parasite immunology*, 36(8), 347-357.
- Chabon, JJ, Gebreab, L, Kumar, R, Debella, E, Tanaka, T, Koyanagi, D, . . . Tuder, RM. (2014). Role of vascular endothelial growth factor signaling in *Schistosoma*-induced experimental pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation*, 4(2), 289.
- Cheever, AW, Lenzi, JA, Lenzi, HL, & Andrade, ZA. (2002). Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 917-940.
- Cheever, AW, Mosimann, JE, Deb, S, Cheever, EA, & Duvall, RH. (1994). Natural history of *Schistosoma mansoni* infection in mice: egg production, egg passage in the feces, and contribution of host and parasite death to changes in worm numbers. *Am J Trop Med Hyg*, 50(3), 269-280.
- Chen, Q, Wu, C-Y, Feng, Y, Wu, J-H, Yao, X-Y, Xu, D-G, & Wang, Z-J. (2013). Eukaryotic expression of SjE16, SjPPIase and SjRobl genes from *Schistosoma japonicum* egg and evaluation of their role in immunodiagnosis. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 31(3), 170-175.
- de Jesus, AR, Silva, A, Santana, LB, Magalhães, A, de Jesus, AA, de Almeida, RP, . . . Carvalho, EM. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, 185(1), 98-105.
- de Oliveira Fraga, LA, Torrero, MN, Tocheva, AS, Mitre, E, & Davies, SJ. (2010). Induction of Type 2 Responses by Schistosome Worms during Prepatent Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 201(3), 464-472.

- de Quesada, JRMR, Lorenzo, AA, & Serrano, SV. (2009). Esquistosomiasis humana: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Jano: Medicina y humanidades*(1746), 14.
- De Souza, RDP, Cardoso, LS, Lopes, GTV, Almeida, MCF, Oliveira, RR, Alcântara, LM, . . . Araujo, MI. (2012). Cytokine and chemokine profile in individuals with different degrees of periportal fibrosis due to *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of parasitology research*, 2012.
- Delgado, V, Barrios, EE, Bujanda, A, & Araque, W. (2001). Surface morphology and characteristics of hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Planorbidae) from two geographic sources. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA-MEXICO-*, 43(3), 114-118.
- El-Tonsy, MM, Hussein, HM, Helal, TE-S, Tawfik, RA, Koriem, KM, & Hussein, HM. (2013). *Schistosoma mansoni* infection: Is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? *Acta tropica*, 128(3), 542-547.
- Elbaz, T, & Esmat, G. (2013). Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *Journal of advanced research*, 4(5), 445-452.
- Engels, D, Chitsulo, L, Montresor, A, & Savioli, L. (2002). The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta tropica*, 82(2), 139-146.
- Engels, D, Sinzinkayo, E, & Gryseels, B. (1996). Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am J Trop Med Hyg*, 54(4), 319-324.
- Espirito-Santo, MCC, Sanchez, MCA, Sanchez, AR, Alvarado-Mora, MV, Castilho, VLP, Gonçalves, EMN, . . . Gryscek, RCB. (2014). Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(12), 2275-2284.
- Ferragine, CE, Walls, CD, & Davies, SJ. (2013). Modulation of Innate Antigen-Presenting Cell Function by Pre-patent Schistosome Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(3), e2136.
- Ferrari, TCA, & Moreira, PRR. (2011). Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. *The Lancet Neurology*, 10(9), 853-864.
- FONACIT. (2008). Código de Bioética. *Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Tercera ed.*
- Gomes, LI, Enk, MJ, & Rabello, A. (2014). Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(1), 3-11.
- Gray, DJ, Ross, AG, Li, Y-S, & McManus, DP. (2011). Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*, 342.
- Grenfell, RFQ, Martins, W, Drummond, SC, Antunes, CMdF, Voietta, I, Otoni, A, . . . Oliveira, E. (2013). Acute schistosomiasis diagnosis: a new tool for the diagnosis of schistosomiasis in a group of travelers recently infected in a new focus of *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(2), 208-213.
- Grenfell, RFQ, Silva-Moraes, V, Taboada, D, de Mattos, ACA, de Castro, AKS, & Coelho, PMZ. (2012). Immunodiagnostic methods: what is their role in areas of low endemicity? *The Scientific World Journal*, 2012.

- Gryseels, B, Polman, K, Clerinx, J, & Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368(9541), 1106-1118.
- Hockley, DJ, & McLaren, DJ. (1973). *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal for Parasitology*, 3(1), 13-20.
- Hoffmann, KF, Caspar, P, Cheever, AW, & Wynn, TA. (1998). IFN- γ , IL-12, and TNF- α Are Required to Maintain Reduced Liver Pathology in Mice Vaccinated with *Schistosoma mansoni* Eggs and IL-12. *The Journal of Immunology*, 161(8), 4201-4210.
- Hofstede, SN, Tami, A, van Liere, GA, Ballén, D, & Incani, RN. (2014). Long-term effect of mass chemotherapy, transmission and risk factors for *Schistosoma mansoni* infection in very low endemic communities of Venezuela. *Acta tropica*, 140, 68-76.
- Hussein, H, El-Tonsy, M, Tawfik, R, & Ahmed, S-E-G. (2012). Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum. *Parasitology research*, 111(1), 475-478.
- Kongs, A, Marks, G, Verlé, P, & Van der Stuyft, P. (2001). The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. *Tropical Medicine & International Health*, 6(3), 163-169.
- Lambertucci, J. (1993). Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35(5), 399-404.
- Lenzi, HL, Kimmel, E, Schechtman, H, Pelajo-Machado, M, Romanha, WS, Pacheco, RG, . . . Lenzi, JA. (1998). Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 141-151.
- McManus, DP, Li, Y, Williams, GM, Bergquist, R, & Gray, DJ. (2013). Challenges in Controlling and Eliminating Schistosomiasis *Challenges in Infectious Diseases* (pp. 265-299): Springer.
- Neves, LX, Sanson, AL, Wilson, RA, & Castro-Borges, W. (2015). What's in SWAP? Abundance of the principal constituents in a soluble extract of *Schistosoma mansoni* revealed by shotgun proteomics. *Parasites & Vectors*, 8(1), 337.
- Noya, BA, Guevara, RR, Colmenares, C, Losada, S, & Noya, O. (2006). Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 29-35.
- Noya, O, Alarcón de Noya, B, Losada, S, Colmenares, C, Guzmán, C, Lorenzo, M, & Bermúdez, H. (2002). Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low transmission: a review of a line of research. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 167-169.
- Ochoa, G, Mujica, A, Barrios, E, Cosenza, M, Capellán, R, & Ayala, J. (2015). 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 . *Kasmera, En Prensa*.
- Oliver-Gonzalez, J. (1954). Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*, 95(1), 86-91.
- Oliver-González, J, Preston, MB, & Benenson, AS. (1955). Species Specificity of the Anti-Egg Precipitin in Schistosome Serums. *J Infect Dis*, 96(1), 95-100.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections. *Wkly Epidemiol Rec*, 81, 145-164.

- Organización Mundial de la Salud. (2015). Esquistosomiasis. Retrieved 05/10/2015, from <http://www.who.int/topics/schistosomiasis/es/>
- Pointier, J-P, & Augustin, D. (1999). Biological control and invading freshwater snails. A case study. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 322(12), 1093-1098.
- Ridi, RE, Ozaki, T, Inaba, T, Ito, M, & Kamiya, H. (1997). *Schistosoma mansoni* oviposition in vitro reflects worm fecundity in vivo: Individual-, parasite age- and host-dependent variations. *International Journal for Parasitology*, 27(4), 381-387.
- Rodriguez-Molina, R, González, JO, & de Sala, AR. (1962). The circumoval precipitin test in *Schistosoma mansoni*: A study of 300 patients. *JAMA*, 182(10), 1001-1004.
- Ross, AG, McManus, DP, Farrar, J, Hunstman, RJ, Gray, DJ, & Li, Y-S. (2012). Neuroschistosomiasis. *Journal of neurology*, 259(1), 22-32.
- Secor, W. (2005). Immunology of human schistosomiasis: off the beaten path. *Parasite immunology*, 27(7-8), 309-316.
- Shaheen, H, Shalaby, K, Farid, Z, Campbell, J, & Kamal, K. (1996). Parasite-Specific Isotype and Subclass Antibody Profiles during Acute Prepatent Human Schistosomiasis. *Experimental Parasitology*, 82(2), 222-224.
- Shariati, F, Pérez-Arellano, JL, Carranza, C, López-Abán, J, Vicente, B, Arefi, M, & Muro, A. (2011). Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. *Experimental Parasitology*, 128(1), 44-49.
- Skelly, PJ, Da'dara, AA, Li, X-H, Castro-Borges, W, & Wilson, RA. (2014). Schistosome feeding and regurgitation.
- Smith, H, Doenhoff, M, Aitken, C, Bailey, W, Ji, M, Dawson, E, . . . van Gool, T. (2012). Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections.
- Spector, T. (1978). Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein. *Analytical biochemistry*, 86(1), 142-146.
- Stadecker, MJ, Asahi, H, Finger, E, Hernandez, HJ, Rutitzky, LI, & Sun, J. (2004). The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201(1), 168-179.
- Steinmann, P, Keiser, J, Bos, R, Tanner, M, & Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet infectious diseases*, 6(7), 411-425.
- Sulahian, A, Garin, YJF, Izri, A, Verret, C, Delaunay, P, van Gool, T, & Derouin, F. (2005). Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of schistosomiasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(4), 548-551.
- Valli, L, Kanamura, HY, Da Silva, RM, Ribeiro-Rodrigues, R, & Dietze, R. (1999). Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am J Trop Med Hyg*, 61(2), 302-307.
- Van Hellemond, JJ, Retra, K, Brouwers, JF, van Balkom, BW, Yazdanbakhsh, M, Shoemaker, CB, & Tielens, AG. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International Journal for Parasitology*, 36(6), 691-699.
- Wang, C, Chen, L, Yin, X, Hua, W, Hou, M, Ji, M, . . . Wu, G. (2011). Application of DNA-based diagnostics in detection of schistosomal DNA in early infection and after drug treatment. *Parasites & Vectors*, 4(1), 164.

- Wang, J, Zhao, F, Yu, C-X, Xiao, D, Song, L-J, Yin, X-R, . . . Zhang, H-f. (2013). Identification of proteins inducing short-lived antibody responses from excreted/secretory products of *Schistosoma japonicum* adult worms by immunoproteomic analysis. *Journal of proteomics*, 87, 53-67.
- Wang, W, Wang, L, & Liang, Y-S. (2012). Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology research*, 111(5), 1871-1877.
- Weerakoon, KG, Gobert, GN, Cai, P, & McManus, DP. (2015). Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical microbiology reviews*, 28(4), 939-967.
- Wilson, MS, Mentink-Kane, MM, Pesce, JT, Ramalingam, TR, Thompson, R, & Wynn, TA. (2007). Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology*, 85(2), 148-154.
- Wynn, TA, Thompson, RW, Cheever, AW, & Mentink-Kane, MM. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201(1), 156-167.
- Zuim, NRB, Allegretti, SM, Linhares, AX, Magalhaes, LA, & Zanotti-Magalhaes, EM. (2012). A study of the granulomatous responses induced by different strains of *Schistosoma mansoni*. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012.