

## ***Trichinella spiralis*: relación de la infección con el sistema inmunitario de mucosas**

María Virginia Gentilini, Stella Maris Venturiello

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Los mecanismos inmunológicos de protección del huésped contra el nematodo *Trichinella spiralis* están dirigidos contra los vermes adultos y contra las larvas recién nacidas o migrantes.

El ataque inmunológico contra el verme adulto se manifiesta por un rechazo acelerado del intestino (1) mediado por linfocitos T y mastocitos (2). Este fenómeno coincide con la máxima respuesta inflamatoria intestinal caracterizada por citocinas proinflamatorias, aumento en el recambio de enterocitos, células caliciformes, eosinófilos y células de Paneth (3).

Las larvas recién nacidas o migrantes son destruidas en presencia de células activadas por anticuerpos específicos mediante el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (4).

Considerando:

- 1) que el primer estímulo antigénico en la triquinelosis es en la mucosa intestinal;
- 2) que el sistema inmune de las mucosas es un sistema integrado en el cual la inmunización en un sitio confiere inmunidad en otro (5);
- 3) que las larvas recién nacidas o migrantes durante su migración atraviesan el pulmón (6) y que dicho órgano es sugerido por algunos autores como sitio de retención y destrucción parasitaria (7), y
- 4) que las larvas recién nacidas o migrantes son destruidas mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos sin que se conozca el sitio del organismo en donde ocurre este fenómeno, nuestro objetivo fue determinar en ratas Wistar infectadas si el pulmón puede actuar como órgano de retención y destrucción parasitaria.

Para esto se caracterizó la respuesta inmunológica en el pulmón durante la fase intestinal (0-13 días después de la infección) de la infección con *T. spiralis*.

### **Estudios histológicos e inmunohistoquímicos**

Nuestros resultados demostraron el rápido desarrollo de una respuesta inflamatoria pulmonar simultánea al proceso inflamatorio intestinal, caracterizada por infiltrados de mastocitos y eosinófilos, hiperplasia de linfocitos T del lavado broncoalveolar y de las células caliciformes con producción de moco. El fenotipo celular presentado

es de tipo Th2 con incremento en las poblaciones celulares IgE<sup>+</sup>, LT CD4<sup>+</sup> (IgE<sup>+</sup>: 197±19 vs. 88±11; LT CD4<sup>+</sup>: 307±32 vs. 195±11 del número de células/15 campos, animales infectados vs. control).

### **Cinética de aparición de citocinas, quimiocinas en extractos pulmonares mediante ELISA e inmunoelectrotransferencia**

Se observaron niveles elevados de TNF $\alpha$  1 a 2 días después de la infección (485±58- 370±54 vs. 140±43 pg/ml); de INF $\gamma$ , 1 a 6 días después de la infección (162±12- 233±35 vs. 80±7 pg/ml); de IL-10, 3 a 6 días después de la infección (142±12- 124±10 vs. 68±4 pg/ml); de TGF- $\beta$ , 6 a 13 días después de la infección (10457±1512, 13276±1517 vs. 7662±1001 pg/ml); IL-4, elevada desde el 1 día después de la infección, se encontró significativamente elevada al 6 y 13 días después de la infección (111±25, 239±86 vs. 11±7 pg/ml); IL-13 1-6 días después de la infección (16±2- 9±3 RP, relación de densidades ópticas teniendo en cuenta la presencia de  $\beta$  actina); IL-5 e IL-12 permanecieron ligeramente elevadas durante el período estudiado.

La CCL11, quimiocina involucrada en la migración de eosinófilos (8), se encontró elevada 1 a 13 días después de la infección (1809±148- 1727±285 vs. 286±25 pg/m) y la CCL28, quimiocina involucrada en el tráfico de células inmunes (9), se halló elevada 1 a 2 días después de la infección (13±0- 15±4 RP).

### **Cinética de aparición de inmunoglobulinas totales y anticuerpos anti-productos de excreción-secreción (anti-PES-LM) en extractos pulmonares mediante ELISA**

Se halló IgA e IgE total desde el 1 día después de la infección y durante el período estudiado, IgG1 e IgG2a total desde el 3 día después de la infección, con niveles significativamente elevados el día 13 después de la infección (IgA total: 1628±165 vs. 562±85  $\mu$ g/ml; IgE total: 5810±1604 vs. 6.8±3.44 ng/ml; IgG1: 17.48±0.33 vs. 1.90±0.04 ng/ml; IgG2a: 18.23±0.64 vs. 2.40±0.13 ng/ml). Se detectó presencia de IgA e IgE anti-PES-LM en todos los días estudiados; IgG1 a partir del 3 día después de la infección e IgG2a del 1 al 3 día después de la infección; IgE e IgG1 específicas presentaron una significativa disminución al 6 día después de la infección.

### Secreción de inmunoglobulinas totales y anti-PES-LM mediante ELISPOT

Se detectaron células secretoras de todos los isotipos durante el período estudiado con sólo un aumento de las células secretoras de IgE e IgG1 al 13 día después de la infección, células secretoras de IgA, IgE e IgG2a específicas a partir del día 2 después de la infección y de IgG1 el día 13 después de la infección.

### Presencia y niveles de anticuerpos anti-superficie de larvas recién nacidas o migrantes en sueros mediante IFI

En sueros, se detectó al 6 día después de la infección IgE e IgG2a anti- larvas recién nacidas o migrantes con título de 4 en el 63% y 13% de los sueros analizados; al día 13 después de la infección en todos los isotipos estudiados: IgE en el 100% de los sueros con título de 128; IgG1, IgG2a en el 86% de los sueros e IgA en el 71% con títulos de 64.

### Estudio del pulmón como órgano de retención y destrucción parasitaria

Para determinar si el pulmón actúa como un órgano de retención parasitaria, se evaluó mediante microscopía óptica la presencia del parásito en cortes de tejido pulmonar y en suspensiones pulmonares a los 6 y 13 días después de la infección. Se hallaron larvas recién nacidas o migrantes en parénquima y alvéolos y se recuperaron de pulmones en ambos después de la infección.

En el estudio del pulmón como órgano de destrucción parasitaria, se evaluó la capacidad citotóxica de células provenientes de lavado broncoalveolar y de parénquima frente a larvas recién nacidas o migrantes. Se realizaron ensayos de citotoxicidad celular en presencia y ausencia de suero citotóxico de referencia con medición

del porcentaje de mortalidad de las larvas recién nacidas o migrantes. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Los resultados demostraron que las células pulmonares son capaces de mediar la muerte de las larvas recién nacidas o migrantes. Las células provenientes del lavado broncoalveolar, mediante citotoxicidad directa mientras que las células de parénquima en presencia de anticuerpos específicos. Las células del lavado broncoalveolar mostraron una gran capacidad citotóxica *in vitro* ya que fueron capaces de destruir al parásito a las 4 horas.

El estudio de la actividad biológica de las células del parénquima y de los sueros provenientes de animales infectados, el mismo día después de la infección, mostraron porcentajes de mortalidad de larvas recién nacidas o migrantes superiores al alcanzado con los sueros de ratas no infectadas (porcentaje de mortalidad al 6 día después de la infección:  $19 \pm 2$  vs.  $7 \pm 2$  y 13 días después de la infección:  $41 \pm 6$  vs.  $18 \pm 2$ , presencia vs. ausencia de anticuerpos).

Los resultados demuestran que el pulmón puede actuar como un órgano de retención y destrucción parasitaria y sugieren que las larvas recién nacidas o migrantes al salir del intestino y en su vehículo hacia el músculo estriado, con opsonización o no por anticuerpos específicos, se encuentran con un pulmón sensibilizado que permitiría sólo el pasaje de aquellas larvas recién nacidas o migrantes que puedan evadir el ataque (10).

Nuestros resultados indican, además, que durante la infección intestinal con *T. spiralis* existen dos señales responsables de la sensibilización del pulmón:

- Una primera, causada por el estímulo antigénico en la mucosa intestinal, relacionada con el

**Tabla 1.** Actividad citotóxica de células pulmonares frente a larvas recién nacidas o migrantes durante la fase intestinal de la infección por *Trichinella spiralis*.

Días después de la infección	Suero citotóxico de referencia	% de Mortalidad de LRN		
		Células de BAL 4 horas	24 horas	Células de parénquima 24 horas
6	Ausencia	13,1±1,6	25,4±3,6	7±2
	Presencia	15,6±2,5	26,4±3,6	50±7
13	Ausencia	21,0±1,5	22,2±1,1	18±2
	Presencia	22,0±2,1	30,1±3,7	47±4
Control	Ausencia	1,1±0,7	6,5±1,3	6±3
	Presencia	10,8±0,3	23,5±2,4	30±3

LRN: larvas recién nacidas o migrantes; BAL: broncho-alveolar lavage

sistema inmune asociado a las mucosas. Durante esta etapa se observa producción y secreción de IgE, IgA total y anti-PES-LM, citocinas inflamatorias, quimiocinas CCL11 y CCL28 y presencia de infiltrados celulares.

- Una segunda, producida por el estímulo antigénico *in situ* debido al pasaje de la larva recién nacida o migrante por el pulmón. Esta etapa presenta un perfil de tipo Th2 y se caracteriza por máximo infiltrado de eosinófilos, predominio de CCL11 e IL-4, altos niveles de IgE>IgG1>IgG2a>IgA total, producción y secreción de anti-PES-LM y actividad efectora de células pulmonares.

Así, durante una infección por *T. spiralis* ocurren mecanismos efectora dirigidos hacia los vermes adultos en el intestino y hacia las larvas recién nacidas o migrantes en el pulmón. Estas observaciones constituyen las bases para el desarrollo de estrategias de inmunoprotección.

#### Referencias

1. Ierna MX, Scales HE, Saunders KL, Lawrence CE. Mast cell production of IL-4 and TNF may be required for protective and pathological responses in gastrointestinal helminth infection. *Mucosal Immunol.* 2008;1:147-55.
2. Suzuki T, Sasaki T, Takagi H, Sato K, Ueda K. The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, *Trichinella spiralis*, expulsion in rats. *Parasitol Res.* 2008;103:1289-95.
3. Kamal M, Dehlawi MS, Brunet LR, Wakelin D, Paneth and intermediate cell hyperplasia induced in mice by helminth infections. *Parasitology.* 2002;125:275-81.
4. Kazura JW. Host defense mechanisms against nematode parasites: destruction of newborn *Trichinella spiralis* larvae by human antibodies and granulocytes. *J Infect Dis* 1981;143:712-8.
5. Anjuere F, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines development. *Med Sci (Paris).* 2007;23:371-8.
6. Harley JP, Gallicchio V. *Trichinella spiralis*: migration of larvae in the rat. *Exp Parasitol.* 1971;30:11-21.
7. Bruschi F, Solfanelli S, Binaghi RA. *Trichinella spiralis*: modifications of the cuticle of the newborn larva during passage through the lung. *Exp Parasitol.* 1992;75:1-9.
8. Dixon H, Blanchard C, Schoolmeester ML, Yuill NC, Christie JW, Rothenberg ME, *et al.* The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection. *Eur J Immunol.* 2006;36:1753-63.
9. Scanlon KM, Hawksworth RJ, Lane SJ, Mahon BP. IL-17A Induces CCL28, supporting the chemotaxis of IgE-secreting B cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;156:51-61.
10. Bruschi F. The immune response to the parasitic nematode *Trichinella* and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2002;2:269-80.



## ***Leishmania*-macrophage interaction: a signaling story**

Martin Olivier

McGill University and the Research Institute, McGill University Health Centre, Montreal, Canada

Apart from the impact of *Leishmania* spp. on world health, leishmaniasis represents an elegant infection model that can teach us a lot about host-parasite interactions and immune evasion.

This parasite has the ability to enter host macrophages (MØs) safely and replicate inside the very same phagocytes that were recruited to destroy it. The inability of MØs to kill the parasite and activate cells of the adaptive immune system is a product of the parasite's long-reported capacity to alter several key signalling pathways in the host. Many signalling alterations are seen early in the course of infection suggesting they start upon the initial contact between the parasite and the MØ. These rapid alterations of signalling pathways serve at least two main functions: firstly, inhibition of MØ killing mechanisms that are triggered upon phagocytosis of foreign particles (e.g., production

of reactive oxygen species) and secondly, inhibition of leishmanicidal functions that can be triggered in response to MØ activation in infected tissues in response to stimuli such as lipopolysaccharides (LPS) or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (e.g., nitric oxide production).

Very recent work from our laboratory showed that *Leishmania* gp63 was able to enhance PTP-1B activation by cleaving it. PTP-1B activity seems to inhibit MØ activation and help in parasite survival as seen in the delayed onset of footpad swelling and reduced parasite burden in PTP-1B<sup>-/-</sup> mice infected with *Leishmania major*. We further showed that gp63 of *Leishmania* was able to enhance TC-PTP activation by cleaving it in host MØs. This gp63-mediated TC-PTP cleavage along with the cleavage of PTP-PEST were very recently reported, by our group and M. L. Tremblay's group,