

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL,  
ECOLOGÍA, PARASITOLOGÍA,  
EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



TESIS DOCTORAL

Nuevas herramientas para el estudio de la  
esquistosomosis: valoración de nuevos fármacos y  
estudio de la susceptibilidad a la infección

Luis Pérez del Villar Moro

2012

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, ECOLOGÍA,  
PARASITOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



Nuevas herramientas para el estudio de la esquistosomosis:  
valoración de nuevos fármacos y estudio de la susceptibilidad a la  
infección

Luis Pérez del Villar Moro

diciembre de 2012

# Certificación:

*Dr. Antonio Muro Álvarez Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca y Dr. Jesús Pérez Losada Investigador Principal del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca-CSIC.*

*Certifican:*

*Que el trabajo “Nuevas herramientas para el estudio de la esquistosomosis: valoración de nuevos fármacos y estudio de la susceptibilidad a la infección” que presenta el Licenciado en Farmacia D. Luis Pérez del Villar Moro para optar al Título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Animal, Ecología, Parasitología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para optar al Título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca. El presente trabajo ha sido financiado por una beca de Formación de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León (Orden EDU/330/2008).*

*Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 17 de diciembre del 2013*

*Dr. Antonio Muro Álvarez*

*Dr. Jesús Pérez Losada*

# *¡Gracias!*

*A mis directores, Antonio Muro Álvarez y Jesús Pérez Losada por vuestra implicación personal, por motivarme y por confiar en mí. A mis compañeros, Edward, Julio, Sonia y Pedro por vuestro apoyo y comprensión, a Belén por su vitalidad. Gracias de corazón a los integrantes del Laboratorio 7; a Andrés por los buenos momentos compartidos. A Mon y a Virginia porque ha sido un placer trabajar con vosotros. Estoy especialmente agradecido a Javier Burquillo porque esta tesis no hubiera salido adelante sin su ayuda, eres todo un ejemplo.*

*A mi familia porque os lo debo todo; a mi madre por estar siempre a mi lado y por ayudarme a mejorar día a día, a mi padre por transmitirme su espíritu de lucha y por supuesto gracias a mi hermana Candelas y a Luismi, sois geniales. A mis amigos, especialmente a Javier Carreras por aconsejarme en los momentos más delicados. A Rogelio y a Isidro, gracias por las veces que me habéis puesto las pilas, a Juan Delgado por introducirme en el maravilloso mundo de R. Gracias a Puri y al Departamento de Estadística que con su Máster de Análisis de Datos Multivariante me han ayudado muchísimo en el desarrollo de este trabajo.*

*Han sido cuatro años cargados de emociones, buenos momentos e intensas experiencias; gracias a tí, Irene, por tu sonrisa, por vivirlos conmigo y por ilusionarme cada día.*



*Dedico este trabajo  
al Servicio de Oncología Médica  
del Hospital Universitario de Salamanca*

# Índice general

<b>Índice general</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
1.1. Infecciones por trematodos . . . . .	9
1.2. Enfermedades difícilmente transmisibles: Esquistosomosis . . . . .	22
1.3. <i>Schistosoma</i> and Schistosomiasis . . . . .	32
<b>2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
2.1. Objetivos generales . . . . .	47
2.2. Objetivos específicos . . . . .	48
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
4.1. Identificación de Quantitative Trait Loci (QTLs) implicados en la respuesta inmune del ratón en condiciones basales: Rastreo genético y aproximación multivariante . . . . .	51
4.2. <i>Schistosoma mansoni</i> infection in SPRET/Ei mice: a multivariate approach . . . . .	71
4.3. Identifying phenotypes involved in the susceptibility to <i>Schistosoma mansoni</i> infection in F1B6CBA mice . . . . .	89
4.4. Systematic review and meta-analysis of Artemisinin based therapies for the treatment and prevention of schistosomiasis . . . . .	107
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
<b>A ANEXO METODOLÓGICO</b>	<b>124</b>
A.1. Material parasitario y animales de experimentación . . . . .	125
A.1.1. Obtención de cercarias a partir de caracoles infectados . . . . .	125
A.1.2. Infección del hospedador definitivo . . . . .	125
A.1.3. Recogida de sangre periférica y suero en el animal de experimentación . . . . .	126
A.1.4. Necropsia, recuperación de formas adultas y conteo de huevos . . . . .	127
A.2. Técnicas hematológicas (Hemavet®) . . . . .	129

A.3.	Técnicas inmunológicas, respuesta inmune humoral . . . . .	130
A.3.1.	Preparación del antígeno somático de <i>S. mansoni</i> . . . . .	130
A.3.2.	ELISA indirecto para la detección de anticuerpos . . . . .	130
A.4.	Técnicas inmunológicas, respuesta inmune celular . . . . .	132
A.4.1.	Citometría de flujo . . . . .	132
A.5.	Técnicas estadísticas aplicadas a datos biológicos . . . . .	136
A.5.1.	Análisis estadísticos de la matriz de datos genéticos . . . . .	136
A.5.2.	Análisis estadístico de la matriz de datos fenotípicos . . . . .	136
A.5.3.	Estadística aplicada a análisis de ligamiento . . . . .	138
A.6.	Técnicas estadísticas empleadas en el meta-análisis . . . . .	140
A.6.1.	Medidas del tamaño del efecto . . . . .	140
A.6.2.	Análisis de la heterogeneidad de los estudios a combinar . . . . .	140
A.6.3.	Modelos de meta-análisis . . . . .	141
A.6.4.	Análisis del sesgo de publicación . . . . .	143
A.7.	Bibliografía empleada en el Anexo metodológico . . . . .	144

## Capítulo 1

# INTRODUCCIÓN

La esquistosomosis es una enfermedad endémica de los países situados en la franja del trópico y representa una de las parasitosis más importantes a nivel mundial. El artículo “*Infecciones por Trematodos*” describe la esquistosomosis desde el punto de vista biológico y clínico encuadrada dentro de las trematodosis que afecta al ser humano (fasciolosis, paragonimosis, opistorquiosis, clonorquiosis y un grupo de enfermedades de menor importancia clínica que se incluyen dentro de las trematodosis intestinales).

El aumento del turismo internacional, el incremento de la inmigración y los programas de cooperación internacional son los responsables de los diagnósticos de esta enfermedad en consultas especializadas europeas. El capítulo “*Enfermedades difícilmente transmisibles: Esquistosomosis*” incluido en el libro *Manual de Enfermedades Importadas* está enfocado a describir la enfermedad desde un punto de vista clínico y terapéutico con el objetivo de servir de apoyo al personal sanitario.

El diagnóstico de la esquistosomosis humana está basado en datos clínicos y epidemiológicos. Sin embargo, estos datos son insuficientes para realizar un diagnóstico inequívoco de esta parasitosis. El capítulo del libro *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens* titulado: “*Schistosoma and Schistosomiasis*” hace una actualización de la inmunología, patogenia, clínica y diagnóstico de esta enfermedad, dedicando un apartado a describir los conocimientos existentes sobre susceptibilidad y resistencia a la esquistosomosis.

## **1.1. Infecciones por trematodos**

**Título de la obra: MEDICINE. Enfermedades infecciosas (VI)**

**ISSN: 0304-5412**

**Editorial: Elsevier**

**Capítulo: Infecciones por trematodos**

**Autores: A. Muro, L. Pérez del Villar, V. Velasco y J. L Pérez Arellano**

# Infecciones por trematodos

A. Muro<sup>a</sup>, L. Pérez del Villar<sup>a</sup>, V. Velasco<sup>a</sup>  
y J.L. Pérez-Arellano<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. CIETUS. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

<sup>b</sup>Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas. Las Palmas. Gran Canaria. España.

<sup>c</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Servicio de Medicina Interna. Hospital Insular de Las Palmas. Las Palmas. Gran Canaria. España.

## Introducción

Teniendo en cuenta la importancia de las diferentes trematodosis, estructuramos esta actualización en tres grandes apartados. En el primero se abordará el estudio de la esquistosomosis, trematodosis más prevalente en todo el mundo. En el segundo bloque revisaremos la fasciolosis, trematodosis importante en nuestro medio. En tercer lugar describiremos otras trematodosis de menor importancia: hepáticas (clonorchiosis y opistorquiosis), pulmonares (paragonimosis) e intestinales (tabla 1).

## Esquistosomosis

También conocida como esquistosomiasis o bilharziasis, se define como la enfermedad causada por trematodos pertenecientes al género *Schistosoma* transmitida por penetración a través de la piel de cercarias emitidas por moluscos terrestres.

## Taxonomía, biología y estructura

El género *Schistosoma* pertenece a la familia *Schistosomatidae*, orden *Strigeiforme*, subclase *Digenea*, clase *Trematoda* y phylum *Platyhelminthes* del reino *Animalia*. Las 21 especies de esquistosomas descritas hasta el momento se clasifican en cuatro grupos atendiendo a su distribución geográfica, a la morfología de la fase de huevo y al tipo de hospedador intermedio. Sin embargo, la taxonomía y la filogenia de *Schistosoma* spp. está en revisión continua debido al gran número de estudios moleculares que se están llevando a cabo. Las cinco especies principales en el hombre son: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* y *S. mekongi*, aunque también se han descrito infecciones humanas por *S. malayensis*, *S. mattheei* y *S. guineensis*<sup>1</sup>. Otras especies del género *Schis-*

### PUNTOS CLAVE

**Esquistosomosis.** La esquistosomosis humana es una trematodosis adquirida por contacto con agua dulce contaminada con cercarias pertenecientes a cinco especies principales: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi*. Afecta a más de 250 millones las personas, siendo esencial en su patogenia los mecanismos inmunológicos y de evasión parasitaria. Los principales datos que indican la posibilidad de una esquistosomosis crónica es la presencia de eosinofilia y de microhematuria en las infecciones ocasionadas por *S. haematobium*. El diagnóstico parasitológico mediante el examen de muestras de heces o de orina es el método más utilizado para el diagnóstico de la esquistosomosis, ya que permite identificar las diferentes especies de esquistosomas, visualizando su morfología característica de la fase de huevo. El praziquantel es el fármaco de elección para su tratamiento.

**Fasciolosis.** La fasciolosis se adquiere por ingestión de plantas acuáticas (berros, marujas, etc.) en los que están depositadas metacercarias infectivas que se desenquistan en el aparato digestivo, atraviesan la pared intestinal y migran a través del parénquima hepático para llegar a los conductos biliares donde producen el daño. El fármaco de elección para su tratamiento es triclabendazol.

**Clonorchiosis y opistorquiosis.** Son trematodosis hepáticas con ciclos biológicos similares en las que el mecanismo de transmisión es el consumo de pescado crudo, salado, ahumado y adobado que contenga metacercarias enquistadas.

**Paragonimosis.** Es una enfermedad producida por trematodos de localización pulmonar pertenecientes al género *Paragonimus*, del que existen más de 50 especies descritas.

**Trematodosis intestinales.** Constituyen un grupo de enfermedades de menor importancia cuyo rasgo común es la presencia de dos hospedadores intermediarios en sus ciclos biológicos.

*tosoma* no parasitan al ser humano pero tienen un gran interés veterinario como *S. mattheei* y *S. bovis*.

La esquistosomosis se adquiere por contacto con agua dulce contaminada con larvas del parásito denomi-

TABLA 1

## Trematodosis intestinales

Trematodosis	Especies	Mecanismo de transmisión	Distribución geográfica
Braquilaiimidosis	<i>Brachyaima</i> spp.	Consumo de moluscos	Australia
Diplostomidosis	<i>Neodiplostomun soulensis</i>	Consumo de anfibios y reptiles	Corea
Equinostomosis	<i>Echinostoma</i> spp. (al menos 16 especies)	Consumo de caracoles, almejas y peces crudos o poco cocinados	Sudeste asiático
Fasciolopsiosis	<i>Fasciolopsis buski</i>	consumo de plantas acuáticas	Asia, subcontinente indio
Gastrodiscoidosis	<i>Gastrodiscoides hominis</i>	Consumo de plantas acuáticas	India, Vietnam, Filipinas, Tailandia, China y Rusia
Gymnopalidosis	<i>Gymnophalloides seoi</i>	Consumo de ostras y vegetales	Korea
Heterofiosis	<i>Heterophyes heterophyes</i>	Consumo de pescado crudo	Egipto, Lejano y Medio Oriente
Lecitodendriosis	<i>Prosthodendriim molendampi</i> <i>Phlaneropsolus bonnie</i>	Ingestión de artrópodos	Indonesia, Tailandia, Laos
Metagonimosis	<i>Metagonimus yokogawai</i>	Consumo de pescado crudo	Lejano Oriente
Micropalidosis	<i>Spelotrema brevicaca</i>	Consumo de cangrejos y gambas	Filipinas
Nanofietosis	<i>Nanophyetus salmincola</i>	Consumo de pescado crudo	Rusia, EE. UU.
Paramfistomatidosis	<i>Watsonius watsonius</i> <i>Fischoederius elongates</i>	Consumo de plantas acuáticas	África, China
Plagiorquidosis	<i>Plagiorchis muris</i>	Consumo de insectos y moluscos	Filipinas, Indonesia, Japón, Tailandia, Japón
Estrigeidosis	<i>Cotylurus jamponicus</i>	Desconocido	China

nadas cercarias, las cuales son emitidas por diferentes especies de caracoles (hospedadores intermediarios), que penetran activamente por la piel del individuo afectado. Los moluscos intermediarios pertenecen a diversos géneros *Biomphalaria* para *S. mansoni*, *Bulinus* para *S. haematobium* y *S. intercalatum*, *Oncomelania* para *S. japonicum* y *Neotricula* para *S. mekongi*<sup>2</sup>. Tras su penetración, la cercaria pierde la cola transformándose en esquistosómula, la cual inicia su migración. En su recorrido accede al corazón por vía venosa, atraviesa el filtro pulmonar y llega a diferentes lechos vasculares donde termina su maduración. Los vermes adultos de *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* y *S. intercalatum* se localizan en los vasos mesentéricos, mientras que los de *S. haematobium* acceden al plexo perivesical urinario. En cada una de las localizaciones tiene lugar la diferenciación sexual y el acoplamiento de machos y hembras que da lugar a la fecundación y oviposición. Los huevos se eliminan en la orina (*S. haematobium*) o las heces (otras especies) del individuo infectado tras un período que oscila entre 35 y 70 días. Estos huevos son de morfología no operculada, con una “espiná” que difiere en su posición, dependiendo de la especie de *Schistosoma* (ver el apartado de diagnóstico). Cuando los huevos entran en contacto con agua dulce se producen los miracidios que penetran en los caracoles de diversos géneros para finalmente transformarse y multiplicarse en su interior hasta convertirse en cercarias infectivas. Una pequeña parte de los huevos se queda atrapada en diferentes tejidos, formando los granulomas que son la causa de los daños originados en la fase crónica de la enfermedad. Se muestra una representación de la cronobiología del ciclo de los esquistosomas en la figura 1.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto a *Schistosoma Genome Network* comenzaron en 1994 el proyecto de secuenciación del genoma de *Schistosoma mansoni*. Finalmente, en 2009 se describe la secuencia completa<sup>3</sup>. El tamaño es de 363Mb con 11.809 genes, un tamaño superior a la

mayoría de los patógenos secuenciados hasta el momento. Tiene 8 pares de cromosomas, 7 autosomas y un cromosoma sexual. Además presenta un gran contenido en secuencias repetitivas (al menos el 40%), importantes desde el punto de vista evolutivo, filogenético y de relación con el hospedador. En paralelo y en el mismo año el *Chinese Human Genome Centre* publica la secuenciación del genoma de *Schistosoma japonicum*<sup>4</sup>, con un tamaño de 397 Mb, en el que se han identificado 13.469 genes. El genoma de *S. japonicum* mantiene un gran número de secuencias homólogas con el genoma de *S. mansoni*.

Respecto a las numerosas moléculas que poseen estos parásitos en los diferentes órganos y sistemas, resultan de gran interés las que están relacionadas con la interacción parásito-hospedador<sup>5</sup>. Estas moléculas son accesibles a los mecanismos efectores del sistema inmune del hospedador, y por tanto podrían ser de gran interés como principales dianas para desarrollar fármacos y vacunas efectivas contra estos helmintos. Se diferencian tres grandes grupos:

1. Proteínas de superficie propias del parásito como proteínas estructurales, transportadoras de nutrientes, con actividad enzimática o con receptores para ligandos del hospedador.

2. Proteínas de superficie propias del hospedador. El parásito se rodea de moléculas propias del hospedador con el objetivo de evadir su respuesta inmune. Se han identificado inmunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG3 y proteínas del complemento como C3 adheridas a la superficie parasitaria en *S. mansoni*, también se ha confirmado la presencia de anticuerpos y de proteínas del complemento en *S. japonicum*.

3. Proteínas de excreción secreción con predominio de proteasas y de proteínas con fuerte carácter inmunomodulador que se relacionan con funciones propias del parásito como la penetración en la piel<sup>6</sup> o con la respuesta granulomatosa generada por la fase de huevo del parásito en los tejidos.

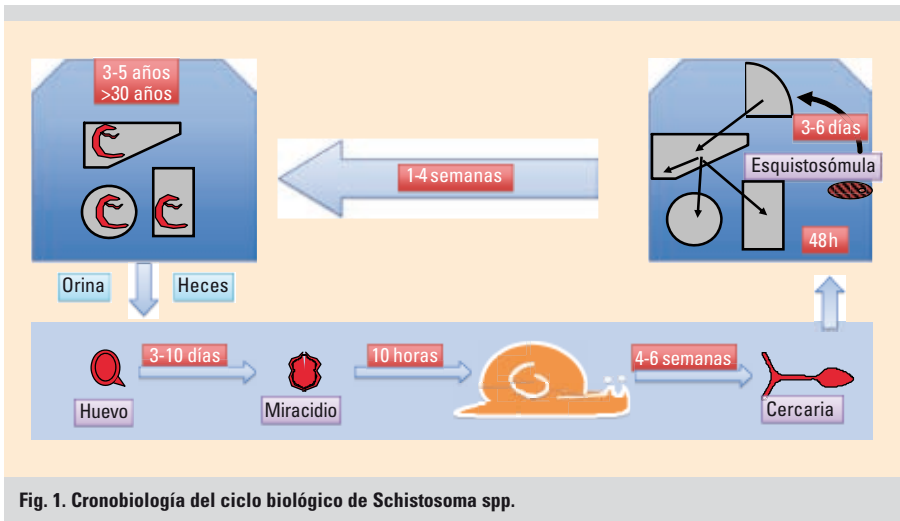


Fig. 1. Cronobiología del ciclo biológico de *Schistosoma* spp.

### Epidemiología

Aunque la OMS anunció en octubre de 2001 que la estimación epidemiológica de la esquistosomosis debía ser recalculada, los datos sobre esta enfermedad reflejan 779 millones de personas en riesgo que viven en 76 países endémicos. En la figura 2 se muestran las áreas geográficas afectadas por los esquistosomas humanos, indicando el nivel de transmisión. Es importante resaltar que en el continente americano sólo se han descrito infecciones por *S. mansoni*, en África conviven *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* y en Asia se producen infecciones por *S. japonicum* y *S. mekongi*. Además, los datos indican que 250 millones de personas infectadas (80% en África subsahariana), 120 millones con sintomatología, 20

millones con enfermedad grave y una mortalidad anual de 280.000. Algunos autores señalan el gran impacto de la morbilidad causada por la esquistosomosis, reflejada en la incapacidad ponderada por año de vida (DALY) que se estima en 1, 53 millones<sup>7</sup>. Existen una serie de condiciones necesarias para una adecuada transmisión. En primer lugar, la contaminación de aguas con huevos viables depositados por el hospedador definitivo (humanos o animales domésticos en el caso de *S. japonicum*). La falta de baños y letrinas facilitan el desarrollo y mantenimiento de la infección. En segundo lugar, hay que considerar las condiciones favorables para el desarrollo adecuado de los hospedadores intermediarios (caracoles). Estos hospedadores son resistentes a la sequía y a los cambios climáticos, incluso a la contaminación. La construcción de embalses como la presa de Diama en Senegal, la de Akosombo en Ghana o la de las tres gargantas del río Yangtsé en China han permitido la dispersión de los caracoles y por tanto la aparición de la infección en lugares en los que no existía. Por último, hay que considerar la exposición de las personas a colecciones acuáticas con cercarias. Así, niños que están en contacto con aguas infectadas son los más propensos a adquirir la enfermedad. En los adultos, actividades diarias como el lavado de ropas y utensilios, los trabajadores de granjas con sistemas de irrigación y los pescadores son las poblaciones más expuestas a adquirir la infección. Hay que tener en cuenta que la transmisión de la esquistosomosis es de carácter local. Existen trabajos que han demostrado diferentes niveles de infección en diversas zonas del mismo lago o entre localidades vecinas.

La ausencia de casos autóctonos de esta helmintosis ha hecho que esta enfermedad fuera calificada en nuestro medio de “exótica”, pero en la actualidad el auge del turismo internacional, el incremento del fenómeno migratorio y los programas de cooperación internacional han llevado al diagnóstico cada vez más frecuente en consultas especializadas. Los pacientes diagnosticados en los países desarrollados pertenecen a alguno de los siguientes tres grupos:

1. Viajeros a zonas rurales y peri-rurales de áreas endémicas, sobre todo aquellos que realizan turismo de aventura. La base de datos del GeoSentinel refiere la es-

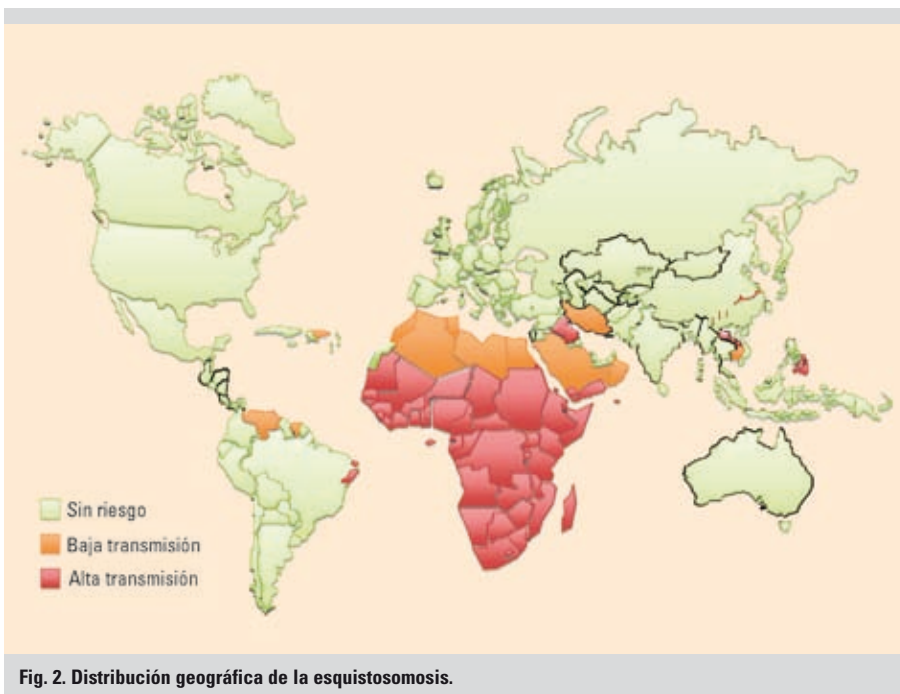


Fig. 2. Distribución geográfica de la esquistosomosis.



quistosomosis como causa de morbilidad en el 4% de los viajeros que regresan del África subsahariana<sup>8</sup>. Un estudio realizado en el lago Malawi determina que viajeros que se han bañado durante 10 días tienen una probabilidad del 90% de adquirir la infección. Recientemente se ha detectado un brote de esquistosomosis en viajeros que realizaban un safari en Tanzania y se habían bañado en un lago natural cerca de un hotel de lujo<sup>9</sup>.

2. Expatriados por motivos laborales o de otra índole en países endémicos.

3. Inmigrantes provenientes de países endémicos. En un estudio realizado en 788 inmigrantes subsaharianos que tenían eosinofilia absoluta, se diagnosticó esquistosomosis en el 17% de los casos<sup>10</sup> y fue la primera causa descrita en inmigrantes subsaharianos que presentaban eosinofilia relativa<sup>11</sup>.

## Patogenia

### Mecanismos de agresión y de defensa

Los mecanismos inmunológicos implicados en la patogenia de la enfermedad son esenciales para comprender las manifestaciones clínicas en las que la intensidad de la infección y los mecanismos de agresión son factores determinantes en el desarrollo de la esquistosomosis. Se pueden distinguir varias fases:

**Fase de penetración cercariana**<sup>12</sup>. Es un proceso complejo que requiere de la presencia de estímulos químicos por parte del hospedador, así como de la liberación de proteasas secretadas por la cercaria. El componente mayoritario de estas proteasas es una serín-proteasa de 30kDa cuya actividad elastasa degrada la elastina de la piel facilitando la penetración de la cercaria. Varios estudios realizados en la piel demuestran que los productos ES cercarianos inducen la formación de edema e infiltración de neutrófilos. Sin embargo, esta reacción inflamatoria no induce protección en el individuo sino que favorece la supervivencia del parásito.

**Fase de migración de la esquistosómula**<sup>13</sup>. Durante las 4-6 semanas siguientes a la infección, la esquistosómula migra por la circulación sanguínea hasta llegar a su sitio de maduración, produciéndose altos niveles de citocinas pro-inflamatorias (principalmente factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ], interleucina 1 y 6 [IL-1, IL-6] e interferón gamma [IFN- $\gamma$ ]) cuya máxima expresión se produce en la decimosexta semana post-infección. Esta situación se asocia a una respuesta *Th1* predominante, responsable de la fiebre de Katayama.

**Fase de formación del granuloma alrededor del huevo**<sup>14</sup>. Esta fase ocurre a partir de la octava semana post-infección. Aunque una gran cantidad de huevos son liberados al exterior, una parte de ellos quedan atrapados en hígado, intestino o vejiga urinaria. Alrededor de ellos se produce un infiltrado celular compuesto por macrófagos, eosinófilos, linfocitos CD4<sup>+</sup> y colágeno que da lugar a una amplia reacción granulomatosa (figura 3). El granuloma destruye el huevo y además secuestra o neutraliza sus antígenos. Sin embargo, daña al hospedador produciendo fibrosis y obstrucción del flujo sanguíneo. Los antígenos derivados de la fase de huevo interactúan con TLR-2 estimulando la producción de IL-10 y por lo tanto la supresión de citocinas propias de respuestas *Th1* como IFN- $\gamma$ ,

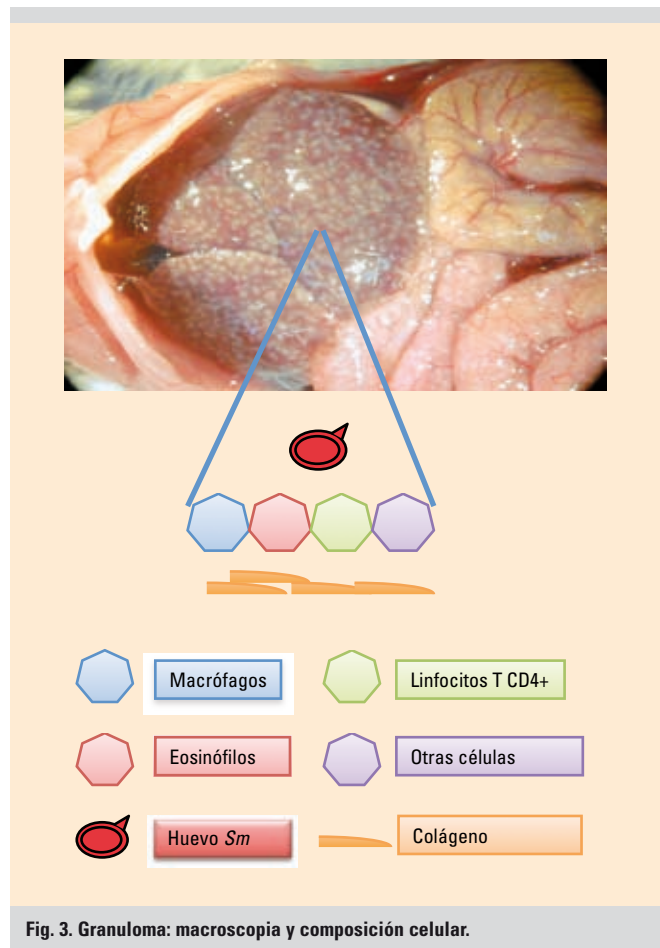


Fig. 3. Granuloma: macroscopia y composición celular.

esto origina una respuesta *Th2* característica de la fase crónica de la esquistosomosis. Estudios realizados con ratones *knockout* deficientes en IL-4 demuestran que esta citocina es la responsable directa del tamaño del granuloma. También se ha observado que tanto la expresión de IL-4 como IL-13 inducen estimulación macrófagica vía arginasa produciendo L-ornitina y prolina que estimula la síntesis de colágeno originando fibrosis. Hasta el momento, la forma grave de esquistosomosis se asociaba desde el punto de vista experimental con una respuesta inmune desviada hacia *Th1* en la que IL-12 es un elemento crítico para el desarrollo de este tipo de respuesta. Sin embargo, la reciente descripción de la respuesta *T-helper-17* ha aportado nuevos datos a la patogenia de la esquistosomosis, de esta manera se ha demostrado la participación de IL-23 e IL-17 en el desarrollo de la forma grave de la enfermedad<sup>15</sup>.

Finalmente, es importante destacar que la respuesta inmune frente a esquistosomas no se desarrolla de forma aislada, ya que una gran proporción de individuos afectados albergan otras infecciones como malaria, hepatitis B o C o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que modifican la respuesta inmune del individuo.

### Mecanismos de evasión

Dentro de los múltiples mecanismos de evasión desarrollados por los esquistosomas señalaremos los más importantes<sup>16</sup>:

1. Los esquistosomas son capaces de evitar la actuación del sistema del complemento o impedir la destrucción por los macrófagos. Así, es conocida la síntesis o adquisición de moléculas reguladoras capaces de inactivar la convertasa de la vía alterna del complemento mediante la adquisición de moléculas DAF del hospedador. También se ha descrito una proteasa con núcleo activo de serina en *S. mansoni* con similitud funcional al factor I del complemento. La evitación macrofágica la realizan mediante el uso de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidada, etc.) cuya principal función es la protección de las superficies exteriores frente a la peroxidación.

2. Los esquistosomas son capaces de adquirir moléculas del hospedador, evitando así el reconocimiento por el sistema inmune. En este proceso, no sólo se incorporan a la cubierta exterior del parásito lípidos del hospedador (p. ej. las lipoproteínas de baja densidad [LDL]) que dificultan la unión a anticuerpos, sino que también adquieren antígenos de histocompatibilidad de clase II, antígenos de grupos sanguíneos o proteínas reguladoras del complemento.

3. Los esquistosomas son capaces de generar respuestas ineficaces para el control de la infección. Se ha comprobado que generan anticuerpos de los isotipos IgG2, IgG4 o IgM que actúan bloqueando la citotoxicidad antiparasitaria mediada por IgE, IgG1 o IgG3.

4. Los esquistosomas son capaces de eliminar antígenos durante las diferentes fases de su ciclo biológico. Una glucoproteína de 38 kDa expresada en la superficie de las esquistosómulas es eliminada al medio cuando se pasa a fase de adulto.

5. Los esquistosomas son capaces de interferir en el procesamiento y presentación antigénica. Así, la prostaglandina D2 producida por el parásito es capaz de inhibir la migración de las células dendríticas impidiendo este proceso<sup>17</sup>.

6. Por último, los esquistosomas son capaces de alterar los mecanismos efectores. El ejemplo más simple es la destrucción directa de las inmunoglobulinas por proteasas liberadas por el parásito.

## Manifestaciones clínicas y exámenes complementarios

Las manifestaciones clínicas de la esquistosomosis se pueden dividir en tres fases: fase de inicio o también denominada dermatitis cercariana o prurito del bañista, fase aguda o síndrome de Katayama y esquistosomosis crónica. Además nos referiremos a dos situaciones clínicas peculiares: la asociación entre esquistosomosis y cáncer, así como la interacción entre la esquistosomosis y otras infecciones bacterianas y víricas.

### Dermatitis cercariana

Se caracteriza por el desarrollo de prurito en las 24 horas siguientes a la penetración de las cercarias a través de la piel. Este cuadro es más llamativo en personas infectadas por esquistosomas aviares. Se debe a la reacción inmunológica provocada por la muerte de la cercaria en la piel. Ocurre entre el 7-36% de los pacientes infectados<sup>18</sup>. Se observa frecuentemente

en viajeros y pasa desapercibida en personas residentes en áreas endémicas.

### Síndrome de Katayama

Se produce entre 2-8 semanas después de la exposición y se debe a la reacción inmunológica desencadenada frente a la fase de migración de la esquistosómula. Se caracteriza principalmente por fiebre, lesiones cutáneas (exantema, urticaria), afectación pulmonar (tos, disnea) y eosinofilia<sup>19</sup>. En general es autolimitada, aunque en algunas ocasiones los síntomas pueden persistir más de 10 semanas presentando diarrea, pérdida de peso, dolor abdominal, hepatoesplenomegalia, etc. El síndrome de Katayama se observa con más frecuencia en viajeros procedentes de áreas endémicas.

### Esquistosomosis crónica

Aparece meses o años después de la infección y se debe a la reacción granulomatosa formada en torno a los huevos atrapados en hígado, bazo, intestino y otras localizaciones más lejanas como pulmones y sistema nervioso. Se presenta con más frecuencia en personas residentes en áreas endémicas de esquistosomosis. Sus principales manifestaciones clínicas se pueden agrupar en tres grupos<sup>20</sup>:

**Manifestaciones habituales.** Los principales datos que indican la posibilidad de una esquistosomosis crónica es la presencia de eosinofilia y de microhematuria (en las infecciones ocasionadas por *S. haematobium*).

**Manifestaciones clásicas frecuentes.** Las más típicas son las urinarias, las hepatoesplénicas y las intestinales. Las manifestaciones urinarias se producen principalmente por la localización de *S. haematobium* en plexos venosos del tracto urinario. Cursan clínicamente con un síndrome miccional irritativo con disuria, polaquiuria, proteinuria y especialmente hematuria terminal. Estadios más tardíos de la enfermedad pueden provocar engrosamiento de la pared de la vejiga, pólipos o masas vesicales. En ocasiones se pueden asociar infecciones bacterianas. Si la enfermedad progresa puede desencadenar fibrosis y calcificación de uréteres y vejiga, produciendo hidrouréter e hidronefrosis (fig. 4 A). Las manifestaciones hepatoesplénicas se producen cuando los huevos de *Schistosoma* (fundamentalmente *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi*) localizados en las venas mesentéricas acceden a la circulación venosa portal, ocasionando una oclusión gradual de las venas intrahepáticas que puede causar fibrosis de Symmers. La consecuencia es el desarrollo de hi-



Fig. 4. Manifestaciones clínicas de las esquistosomosis. A. Esquistosomosis urinaria. B. esquistosomosis hepatoesplénica.

pertensión portal que se manifiesta por ascitis, esplenomegalia (fig. 4 B), desarrollo de varices esofágicas con sangrado digestivo alto y encefalopatía. Teniendo en cuenta la localización de las lesiones, no aparecen datos de insuficiencia hepatocelular. Característicamente los valores séricos de transaminasas y bilirrubina son normales, excepto si existe coinfección por virus hepatotropos primarios. Las manifestaciones intestinales (frecuentes en la infección por *S. intercalatum*) se producen cuando los huevos acceden a la mucosa produciendo hiperplasia, ulceración, formación de microabscesos y poliposis. Clínicamente presenta dolor abdominal y diarrea de tipo inflamatorio con o sin sangre. En ocasiones puede complicarse produciendo una proteinorreica, cuadro oclusivo o suboclusivo, prolapso anal o incluso fístulas anorrectales. Todo esto plantea un diagnóstico diferencial con la enfermedad inflamatoria intestinal.

**Manifestaciones clásicas poco frecuentes.** Se denominan también esquistosomosis ectópicas. Las más frecuentes son las cardiopulmonares, renales, genitales y neurológicas. Las manifestaciones cardiopulmonares derivan del escape de huevos desde las venas vesicales (en el caso de *S. haematobium*) o desde la circulación portal a través del *shunt* porto-cava. La localización de los huevos en los vasos pulmonares genera la fibrosis de los mismos, cuya consecuencia es la hipertensión pulmonar y el desarrollo secundario de insuficiencia cardiaca derecha. Ocasionalmente la esquistosomosis presenta manifestaciones derivadas de la afectación glomerular. En su patogenia influyen dos factores: el depósito de inmunocomplejos y la presencia de *shunt* portosistémicos. Histopatológicamente el patrón más frecuente es la glomerulonefritis mesangial y las manifestaciones más habituales son la proteinuria y microhematuria. Las lesiones genitales son de dos tipos: inflamatorias (en relación a huevos viables) y fibrosas e hipertróficas (en relación a huevos no viables o calcificados). En las mujeres afecta a la vulva, la vagina y el cuello. Son indoloras pero en el caso de ulcerarse, fistularse o sobreinfectarse pueden producir dispareunia y leucorrea. En los hombres las más frecuentes son la prostatitis crónica y la infección de las vesículas seminales. La clínica más habitual es la alteración en la eyaculación y la hematoespermia. Las dos manifestaciones más típicas de la neuroesquistosomosis son el síndrome cerebral y el medular. La localización de los huevos de *Schistosoma* spp. en el territorio cerebral puede presentarse como una crisis comicial y suele progresar hasta una encefalitis focal cerebral (más frecuente en *S. japonicum*). La localización medular de los huevos de esquistosoma es más frecuente que la encefálica y puede producir varias formas de mielitis (más frecuente en *S. mansoni*). Las más características son la mielitis granulomatosa, la mieloradiculitis y la mielitis isquémica o vascular. La más frecuente es la mielitis transversa. Los pacientes presentan de forma prácticamente constante una vejiga neurógena asociada en ocasiones a un nivel sensitivo-motor con debilidad en las extremidades inferiores, incapacidad para la marcha, dolor lumbar y parestesias.

#### Asociación a carcinogénesis

Se ha demostrado que las cistitis crónicas producidas por *S. haematobium* se comportan como lesiones precancerosas

que degeneran con el tiempo en carcinomas de vejiga urinaria de tipo escamoso<sup>21</sup>. Esta asociación no ha sido demostrada con otras especies de esquistosomas en relación con carcinomas de colon o hepatocarcinomas.

#### Interacción con otras infecciones

Las relaciones entre esquistosomosis y otras infecciones pueden concretarse en los siguientes puntos. Se piensa que las campañas de tratamiento masivo parenteral con praziquantel en algunos países como Egipto contribuyeron a la transmisión de la infección del virus de la hepatitis C. La coinfección de esquistosomosis e infección crónica por virus de la hepatitis B y C se manifiesta con una fibrosis más intensa y precoz que en individuos no coinfectados<sup>22</sup>. Por otro lado, es probable que las lesiones de la esquistosomosis genital puedan alterar la barrera muco-cutánea favoreciendo la transmisión de las enfermedades de transmisión sexual, entre las que destaca la infección por el VIH<sup>23</sup>. Por último, se ha descrito una asociación entre abscesos hepáticos piogénicos por *Staphylococcus aureus* y la infección por *Schistosoma*, así como septicemias ocasionadas por enterobacterias y esquistosomosis crónica intestinal.

#### Diagnóstico etiológico

Los principales métodos útiles para el diagnóstico etiológico de la esquistosomosis son de dos tipos: parasitológicos e inmunológicos. Además, en los últimos años se están haciendo esfuerzos para desarrollar técnicas de diagnóstico molecular, aunque en la actualidad aún no se utilizan de forma rutinaria.

#### Técnicas parasitológicas

El diagnóstico parasitológico mediante el examen de muestras de heces o de orina es el método más utilizado para el diagnóstico de la esquistosomosis, ya que permite identificar las diferentes especies de esquistosomas, visualizando su morfología característica de la fase de huevo. Además, permite evaluar la intensidad de la infección. *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* presentan una fase de huevo con morfología ovoide y mayor tamaño (entre 60-176 µm), mientras que la fase de huevo de *S. japonicum* y *S. mekongi* tiene aspecto redondeado y menor tamaño (entre 50-100 µm). Además, *S. haematobium* y *S. intercalatum* tienen una espina terminal prominente, mientras que *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi* tienen una espina lateral, el primero prominente y los otros dos reducida. La técnica más utilizada para la detección de *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi* es el examen de heces mediante la técnica de Kato-Katz examinando microscópicamente una muestra fresca de 50 mg de heces en extensión, pudiéndose llegar a detectar como positivas muestras con un mínimo de 20 huevos por gramo de heces. La infección por *S. haematobium* se diagnostica utilizando métodos de filtración o sedimentación de orina. La búsqueda de huevos de esquistosomas representa un método de diagnóstico específico, de bajo costo y sencillo de realizar, pudiendo utilizarse en laboratorios con estructuras precarias y con personal poco entrenado. Sin embargo, presenta graves inconvenientes en cuanto a su sensibilidad, especialmente cuando la intensidad de la infección es baja, tal como ocurre

en áreas de baja prevalencia o en individuos con infecciones recientes. Además, solo se pueden realizar después de que la producción y eliminación de huevos haya comenzado, lo que tiene lugar a los dos meses de la infección.

En áreas de baja transmisión, donde la sensibilidad obtenida por los métodos clásicos es baja, se utiliza la técnica COPT (test de precipitación circumoval), descrita por Oliver-González en el año 1954<sup>24</sup>. Consiste en incubar huevos de *S. mansoni* con sueros de pacientes, considerándose positiva si existe más del 9% de precipitación alrededor de los huevos maduros.

**Técnicas inmunológicas**

La detección de los antígenos circulantes anódico (CAA) y catódico (CCA), es el método más utilizado en el diagnóstico inmunológico directo. Estos antígenos son glucoproteínas que derivan de vermes adultos. Ambos pueden detectarse en sangre y orina, y el CCA en leche materna, permitiendo el diagnóstico de *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*. Sin embargo, son compartidos por las especies nombradas y por tanto permiten solo el diagnóstico a nivel de género, aunque presentan pocas reacciones cruzadas con otros parásitos. Recientemente se ha comercializado un test para detectar CCA en orina, utilizando tiras de nitrocelulosa (*dipstick*), aunque la sensibilidad de esta prueba ha sido baja<sup>25</sup>.

La infección por esquistosomas es altamente inmunogénica y no es difícil demostrar la presencia de anticuerpos anti-esquistosomas en los sujetos infectados. Se han descrito numerosos métodos, siendo el ELISA el más utilizado. Se han ensayado extractos totales de vermes adultos y huevos (mejor que los antígenos larvarios), fracciones purificadas de dichos extractos o proteínas recombinantes. El uso de antígenos de vermes adultos (los más fáciles de obtener), incluso procedentes de esquistosomas animales como *S. bovis*, han permitido diagnosticar infecciones en seres humanos con *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* en inmigrantes subsaharianos<sup>26</sup>. Además, este método se ha utilizado para confirmar el diagnóstico de pacientes con fiebre de Katayama. Recientemente se ha comercializado un test denominado SEA-ELISA, en el que se utilizan antígenos solubles de huevo. Los métodos de inmunodiagnóstico, tanto directos como indirectos, tienen en general mayor sensibilidad que las técnicas

utilizadas para el diagnóstico parasitológico directo. No obstante, presentan problemas relacionados con la obtención de antígenos y la aparición de falsos positivos. Además, la detección inmunológica de la esquistosomosis se retrasa hasta la aparición de los correspondientes antígenos o anticuerpos, constituyendo una opción limitada para el diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad.

**Técnicas moleculares**

La primera PCR (reacción en cadena de la polimerasa) descrita para el diagnóstico de la esquistosomosis se debe a la amplificación de *S. mansoni* en muestras de suero y heces de pacientes infectados con este parásito. Posteriormente se han ensayado PCR en muestras de orina de pacientes infectados con diferentes especies de esquistosomas, en las que se amplifica un fragmento de 877 pb género-específico y uno de 350 pb específico de *S. mansoni*<sup>27</sup>. Además, en un experimento controlado comparando esta prueba con la técnica de Kato-Katz y con ELISA para detección de anticuerpos específicos, se observa amplificación del ADN parasitario desde la primera semana postinfección. En los últimos años se están desarrollando test rápidos y sencillos basados en métodos oligocromatográficos, así como técnicas de PCR a tiempo real.

**Tratamiento**

El praziquantel es el fármaco de elección para el tratamiento de la esquistosomosis. Se administra por vía oral, es poco tóxico y además de muy bajo coste. Sin embargo, no previene la re-infección y para su administración hay que tener en cuenta la fase de la enfermedad y la especie responsable<sup>28</sup>. En la tabla 2 se muestra un esquema en el que se indican las pautas de tratamiento de esta enfermedad.

**Prevención y control**

En primer lugar son necesarias medidas de educación sanitaria, principalmente evitar el contacto con aguas infectadas. También son necesarias mejoras en las viviendas, en los tratamientos de aguas de consumo y residuales, y en los siste-

TABLA 2  
Tratamiento de las trematodosis

Trematodosis	Tratamiento de elección	Tratamiento alternativo
Esquistosomosis aguda	Praziquantel 20 mg/kg cada 12 horas más dexametasona 20 mg/día durante 3 días Repetir la misma dosis de praziquantel a las 3-4 semanas	Oxamniquina 10 mg/kg cada 12 horas, durante 2 o 3 días
Esquistosomosis crónica	Praziquantel 20 mg/kg cada 12 horas, un día (cada 8 horas para <i>S. japonicum</i> )	Oxamniquina 10 mg/kg cada 12 horas durante 2 o 3 días
Fasciolosis	Triclabendazol 10 mg/kg/día, durante 2 días consecutivos	Bithionol 30-50 mg/día a días alternos, durante un total de 10-15 días
Clonorquiosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Albendazol 10 mg/kg/día durante 7 días
Opistorquiosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Mebendazol 30 mg/kg, durante 30 días
Paragonimosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Triclabendazol 10 mg/kg un día
Fasciolopsiosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Niclosamida 50 mg/kg al día, durante 1 o 2 días
Heterofiosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Niclosamida 50 mg/kg al día (niños), 1g (adultos), dosis única
Metagonimosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Niclosamida 50 mg/kg al día (niños), 1g (adultos), dosis única
Equinostomosis	Praziquantel 75 mg/kg dividido en tres dosis, un día	Albendazol 400 mg/12 horas, durante 3 días consecutivos



mas de irrigación como construcción de presas y pantanos. La aplicación generalizada de tratamientos preventivos ha permitido disminuir la prevalencia de la enfermedad en determinadas zonas. No obstante, con estas actuaciones no ha sido posible erradicar la enfermedad y además se han generado resistencias al praziquantel. Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna vacuna efectiva, ni se ha logrado trasladar a los seres humanos los avances realizados en estudios de vacunas experimentales en modelos animales.

## Fasciolosis

Se define como la enfermedad causada por trematodos pertenecientes al género *Fasciola* (*F. hepatica* y *F. gigantica*) transmitida por ingestión de metacercarias adheridas a plantas acuáticas. En esta actualización estudiaremos principalmente la especie *Fasciola hepatica*.

## Biología, estructura y ciclo biológico

*Fasciola hepatica*<sup>29</sup> en su forma adulta mide entre 18-51 y 4-13 mm y se localiza en las vías biliares del hospedador definitivo. El cuerpo es ancho y aplanado dorso-ventralmente con un proceso cónico cefálico, dos ventosas muy próximas (siendo la ventral más grande que la oral) y un tegumento recubierto de espinas dirigidas hacia atrás. La ventosa oral se continúa con el tubo digestivo, que es primero bifurcado y después se ramifica en ciegos intestinales. El ovario y los dos testículos tienen situación central y son ramificados. En localización anterior a los testículos se encuentra el útero, que forma varias circunvoluciones. La glándula vitelógena está formada por finos folículos, es muy ramificada y de situación periférica. Los conductos de los folículos se unen en canales transversales que drenan en la glándula de Mehlis, la cual se comunica con el ootipo. El poro genital está en posición anterior a la ventosa ventral. Por último, el cirro está bien desarrollado y la bolsa del cirro incluye la próstata y la vesícula seminal.

Los hospedadores definitivos eliminan los huevos del parásito al ambiente. Una fasciola adulta pone entre dos y cinco mil huevos al día que mezclados con la bilis pasan por la vesícula biliar para dirigirse al intestino, desde donde salen al exterior con las heces. Los huevos son elipsoidales, operculados, de color amarillento característico y miden entre 130-150 x 63-90  $\mu\text{m}$ . Una vez en el exterior, en buenas condiciones de temperatura y humedad, continúan su desarrollo embrionario entre 2 y 23 semanas. Los límites de temperatura que permiten su desarrollo oscilan entre 10 y 30° C, siendo indispensable que estén recubiertos de una fina película de agua. Si existen estas condiciones, se desarrolla el miracidio, que es móvil gracias al tegumento ciliado. El miracidio nada activamente y debe encontrar al hospedador intermediario antes de 24 horas, o muere. Penetra en el molusco y pierde los cilios, transformándose en la región periesofágica en esporocisto que tiene dos manchas pigmentarias y carece de intestino. Dentro del esporocisto se desarrollan las redias, formadas por células germinales, que una vez roto el

saco esporocístico van al hepatopáncreas donde se desarrollan las cercarias. Desde la entrada del miracidio hasta la liberación de las primeras cercarias transcurren entre 6 y 7 semanas. Las cercarias poseen una cola propulsora con la que nadan activamente al principio y al poco tiempo pierden la cola y se enquistan, dando lugar a las metacercarias, las cuales se fijan a las plantas acuáticas u otros objetos. Sus glándulas cistógenas segregan una sustancia que las cubre y protege del medio hasta que son ingeridas por el hospedador definitivo.

El hospedador definitivo se infecta por la ingestión de alimentos o agua contaminada con metacercarias. El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar una hora después de la ingestión en el intestino delgado, donde los vermes juveniles denominados adolescarias atraviesan la pared intestinal, pasan a la cavidad peritoneal y desde allí migran por el peritoneo hasta alcanzar el hígado. El parásito migra de modo errático por el parénquima hepático asentándose definitivamente en los conductos biliares, alcanzando la madurez sexual a partir de los 40 días postinfección. Los primeros huevos aparecen en las heces del hospedador a partir de 55-56 días desde la ingestión de las metacercarias. Excepcionalmente, las adolescarias pueden atravesar el peritoneo visceral o pasar a la corriente sanguínea y ser transportadas a otras localizaciones.

## Epidemiología

Los aspectos epidemiológicos más relevantes en la fasciolosis son los siguientes:

1. La distribución geográfica es cosmopolita. La incidencia de casos en seres humanos ha sido puesta de manifiesto en 51 países de cinco continentes, estimándose en más de 17 millones de personas infectadas. Los países más afectados son los andinos (Bolivia, Perú, Chile y Ecuador), Caribe (Cuba), Norte de África (Egipto), Europa Occidental (Portugal, Francia y España) y los del mar Caspio (Irán y países vecinos). La mayor prevalencia ha sido observada en el altiplano boliviano, en comunidades en las que es superior al 72%, con más de 5.000 huevos por gramo de heces. En Egipto se encontró una prevalencia más elevada en mujeres, en relación con el lavado de ropas en canales donde existen muchos limneidos, y con el desarrollo de actividades agrícolas en las plantaciones de arroz. Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta el diagnóstico de esta parasitosis y la no inclusión como enfermedad de declaración obligatoria, probablemente el número de casos es mucho mayor que el publicado<sup>30</sup>.

2. El mecanismo de transmisión consiste en el consumo de metacercarias adheridas a diferentes plantas acuáticas (berros, marujas, lechugas, etc.). La expansión de *F. hepatica* desde su origen europeo a otros continentes está relacionada con la diseminación de su principal hospedador intermediario europeo (*Glaba truncatula*, sinónimo *Lymnaea truncatula*) a través del comercio de ganado, de la extensión de especies de caracoles americanos como *Pseudosuccinea columella* y de la adaptación a otras especies de limneidos autóctonos de las nuevas áreas colonizadas.

3. Ovinos y bovinos son los principales reservorios del parásito, aunque existen animales salvajes que en menor medida también actúan como reservorios.

## Patogenia

### Mecanismos de agresión

Tras la ingestión de las metacercarias, los vermes juveniles liberados atraviesan la pared intestinal para migrar a través del parénquima hepático y llegar a su localización definitiva en los conductos biliares. El daño durante su proceso migratorio se debe a factores mecánicos como la abrasión que causan sus espículas o la succión originada por sus ventosas. Durante este proceso el parénquima hepático sufre una extensa destrucción con intensas lesiones y hemorragias causadas tanto por los vermes inmaduros como por la reacción inflamatoria e inmunológica desencadenada. Además se pueden producir infecciones bacterianas secundarias que pueden originar peritonitis. Los vermes adultos se localizan principalmente en los conductos biliares, pero pueden encontrarse en el conducto cístico, la vesícula biliar, la ampolla de Vater o el colédoco. Los conductos biliares interlobulares se observan dilatados y esclerosados, presentan hiperplasia y obstrucción del flujo biliar.

### Mecanismos de defensa

Se han caracterizado las siguientes respuestas inmunológicas en relación con las diferentes fases de la infección: a) altos niveles de IgE, IgG1 e IgG4 y bajos de IgA, IgG2a e IgG3 en fase aguda; b) incremento en los niveles de IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en fase aguda, en fase crónica siguen elevados los niveles de IL-10 y TNF- $\alpha$  pero disminuyen los de IFN- $\gamma$  y c) la cooperación entre células B, *Th1*, *Th2* y macrófagos aumentan la capacidad inmune del hospedador en la fase aguda de la enfermedad; por el contrario, en la fase crónica aumentan los mecanismos de evasión parasitaria, con reducción de respuestas *Th1* y predominio de *Th2*.

### Mecanismos de evasión

*F. hepatica* ha desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedador. La ubicación final de los gusanos adultos en los conductos biliares se puede interpretar como una estrategia de evasión parasitaria, ya que son sitios inmunológicamente inaccesibles. Sus antígenos y huevos son excretados con la bilis, lo que también los protege de una eventual respuesta. El tegumento desempeña un papel vital en la evasión del parásito y está formado principalmente por el glucocálix. Este cambia su composición química durante las etapas de maduración y migración del gusano. En la adolescencia, el cambio ocurre aproximadamente cada 3 horas. Esto lleva a que las células efectoras ligadas a anticuerpos, como los eosinófilos y neutrófilos no tengan suficiente contacto con el parásito, y por lo tanto no puedan atacarlo. Las formas juveniles son altamente resistentes a ser destruidas por el complemento. Esto puede deberse a la presencia de residuos terminales de ácido siálico en las glucoproteínas de superficie, los cuales inactivan la vía alterna del complemento. También *F. hepatica* posee mecanismos para neutralizar el óxido nítrico y

los radicales libres de oxígeno, enzimas como súper-óxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa (GST) están implicadas. Además se ha demostrado que *Fasciola* produce moléculas que suprimen o modulan las respuestas inmunológicas del hospedador. Catepsinas y otras proteinasas que son secretadas durante el desarrollo del parásito pueden modular esta respuesta. Se ha demostrado que catepsinas L y B rompen inmunoglobulinas, lo que evita la respuesta de las células efectoras mediada por anticuerpos. Recientemente se ha descrito que productos excretores-secretados del parásito son capaces de inducir apoptosis en eosinófilos mediante vías tirosincinasa o caspasas<sup>31</sup>.

## Manifestaciones clínicas y exámenes complementarios

Exponemos a continuación sus principales características. El periodo de incubación de la fasciolosis no se ha determinado con precisión, aunque puede durar desde días a varios meses e incluso años. Solo en raras ocasiones se encuentran fasciolas en zonas ectópicas de diversos órganos. Ocasionalmente, en caso de ingesta de vísceras, los gusanos adultos se adhieren directamente a la faringe provocando el denominado Halzoun. La fase aguda o invasiva se debe principalmente a la migración de los vermes por el peritoneo y por el parénquima hepático, causando destrucción mecánica, reacciones alérgicas y tóxicas que duran entre dos y cuatro meses. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son fiebre, dolor abdominal generalmente localizado en el hipocondrio derecho, trastornos gastrointestinales con pérdida del apetito, flatulencia, náuseas, diarrea y a veces estreñimiento, asociados a urticaria y síntomas respiratorios como tos, disnea y dolor torácico. En la exploración física se puede observar hepatomegalia, ascitis e ictericia. Los datos analíticos revelan leucocitosis, eosinofilia, anemia y aumento de la actividad sérica de enzimas hepáticas. La fase crónica u obstructiva se puede desarrollar en meses o años después de la infección. En ella los vermes adultos se alojan en los conductos biliares provocando inflamación e hiperplasia del epitelio y engrosamiento y dilatación de los conductos biliares y la vesícula biliar, causando colangitis, colecistitis y generalmente obstrucción de los conductos biliares. Se puede observar hepatoesplenomegalia y ascitis. Los datos analíticos muestran leucocitosis, eosinofilia, anemia leve, aumento de la actividad de las enzimas hepáticas, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia.

## Diagnóstico

Los principales métodos útiles para el diagnóstico etiológico de la fasciolosis son de dos tipos: parasitológicos e inmunológicos.

### Técnicas parasitológicas

El método más utilizado para el diagnóstico de la fasciolosis es la detección de huevos de *F. hepatica* en las heces del hospedador mediante examen coproparasitario, utilizando métodos de

concentración-sedimentación. Esta técnica tiene la ventaja de ser rápida y barata; sin embargo, solo sirve para el diagnóstico de la enfermedad en fase crónica, ya que *Fasciola* no alcanza la madurez sexual hasta la octava semana después de la infección, y por tanto la formación y expulsión de huevos no se dará hasta ese momento. Además pueden aparecer falsos positivos en caso de ingestión de un hígado con fasciolas adultas.

### Técnicas inmunológicas

La detección de anticuerpos específicos es muy utilizada para el diagnóstico de la fasciolosis. Aunque no existen test comerciales, se usa la técnica de ELISA o FAST-ELISA empleando antígenos excretores-secretorios del parásito<sup>32</sup>. La ventaja radica en su diagnóstico en fases tempranas. Recientemente se están iniciando ensayos de detección de coproantígenos en heces utilizando un anticuerpo monoclonal denominado MM3<sup>33</sup>. Los resultados iniciales son prometedores, aunque se necesitan aún estudios a mayor escala.

### Tratamiento y control

El triclabendazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la fasciolosis. Las pautas de administración así como los fármacos alternativos se describen en la tabla 2. El control de la fasciolosis se basa principalmente en evitar la ingestión de plantas acuáticas (berros, marujas, etc.) recogidas en zonas endémicas de fasciolosis y en efectuar tratamientos eficaces en ganado infectado con el parásito. Por último, se siguen realizando grandes esfuerzos para lograr una vacuna efectiva contra esta enfermedad. De esta manera se han descrito diferentes moléculas candidatas a vacunas (catepsinas, GST, FABP<sup>34</sup>, etc.). Por el momento no disponemos de una vacuna comercial eficaz.

## Otras trematodosis

### Clonorchiosis y opistorquiosis

Son trematodosis hepáticas producidas principalmente por *Clonorchis sinensis*<sup>35</sup>, *Opisthorchis viverrini* y *Opisthorchis felineus*. También se han descrito infecciones producidas por *Opisthorchis guayaquilensis* y *Metorchis conjunctus*. Describamos las principales características biológicas y epidemiológicas, algunas son compartidas mientras que otras presentan diferencias entre las especies descritas. Sus ciclos biológicos son similares. Los vermes adultos se encuentran alojados en los conductos biliares. A las 3-4 semanas, los huevos formados salen al exterior con las heces y se depositan en colecciones acuáticas donde son ingeridos por diferentes especies de caracoles (primer hospedador intermediario). Dentro de los caracoles se desarrollan diferentes fases, desde miracidios pasando por esporocistos y redias para terminar liberando un gran número de cercarias. Estas penetran por la piel de diferentes especies de peces (segundo hospedador intermediario), enquistándose en su musculatura en forma de metacercaria. Cuando los hospedadores definitivos entre los que se encuentran las personas, perros, gatos y otros mamíferos marinos ingieren peces crudos o poco cocinados, adquieren las

metacercarias. Estas se desenquistan en el duodeno, liberándose las fases juveniles que pasan a través de la ampolla de Vater a los conductos biliares, donde maduran y se convierten en vermes adultos.

Aunque la morfología de la fase de huevo es similar en las diferentes especies (huevos operculados de 30 x 12 µm de tamaño), los vermes adultos difieren en su tamaño, siendo mayores los de *Clonorchis sinensis*.

Su distribución geográfica varía dependiendo de la especie parásita. *C. sinensis* se encuentra en el este asiático (China, Japón, Corea, Vietnam), *O. viverrini* en el sudeste asiático (nordeste de Tailandia, Laos) y *O. felineus* en el oeste de Siberia, Federación Rusa, Kazajistán y Ucrania. Recientemente se han descrito casos en Italia<sup>36</sup>. Por último, *O. guayaquilensis* y *M. conjunctus* se han descrito en América.

El mecanismo de transmisión se produce por la ingestión de forma habitual de pescado crudo, salado, ahumado y adobado que contenga metacercarias enquistadas. En Tailandia hay 15 especies de ciprínidos hospedadores secundarios de *O. viverrini*. Además, existe la costumbre de consumir platos típicos (*koi pla, lla som, pla ra, jaewbhong*) preparados con pescados pocos cocinados<sup>37</sup>.

Desde el punto de vista clínico, la mayoría de los pacientes infectados permanecen asintomáticos, aunque la eosinofilia es un dato analítico característico. La sintomatología de la fase aguda recuerda al síndrome de Katayama con fiebre, dolor abdominal, hepatomegalia, urticaria y eosinofilia. En la fase crónica y en infecciones intensas se puede producir inflamación de la pared de los conductos biliares produciendo dolor abdominal, anorexia, pérdida de peso y hepatomegalia. Pueden existir complicaciones como colangitis ascendente recurrente con fiebre, ictericia, dolor en hipocondrio derecho e incluso sepsis bacteriana, coledocistitis, abscesos hepáticos y pancreatitis. Por último, estas infecciones se han asociado con la aparición de colangiocarcinoma (adenocarcinoma originado del epitelio biliar hiperplásico), donde existe producción de óxido nítrico a partir de estímulos antigénicos secretados por los parásitos<sup>37</sup>.

El diagnóstico etiológico se realiza mediante la detección de huevos en muestras de heces. Al tratarse de huevos operculados deben realizarse técnicas de sedimentación, dada la fragilidad de los mismos. También se han utilizado métodos de imagen como la colangiopancreatografía endoscópica para visualizar gusanos adultos y la ecografía o tomografía axial computarizada (TAC) para observar cambios estructurales en las paredes de los conductos biliares. Se están desarrollando test serológicos (ELISA frente a cisteína proteasas) y moleculares, con posibilidades comerciales futuras. Las pautas de tratamiento se detallan en la tabla 2.

### Paragonimosis

Es una enfermedad producida por trematodos de localización pulmonar pertenecientes al género *Paragonimus*, del que existen más de 50 especies descritas. *Paragonimus westermani* es la principal especie que afecta a las personas en el continente asiático<sup>38</sup>, principalmente en Korea, Japón, Taiwán, China y Filipinas. *Paragonimus africanus* es la predominante en África, *Paragonimus*

*mexicanus* en América Central y del Sur y *Paragonimus kellicotti* en América del Norte. Los vermes adultos miden entre 7-16 mm de largo por 4-8 mm de ancho y 5 mm de grueso, tienen aspecto de grano de café. Son monoicos y depositan los huevos operculados (80-120 y 50-65 µm) en los bronquiolos, desde donde son expulsados al exterior o deglutidos y eliminados con las heces. En el medio externo los huevos se ponen en contacto con colecciones acuáticas donde embrionan y liberan el miracidio, el cual penetra en diferentes especies de caracoles (primer hospedador intermediario). Dentro de los caracoles se producen diferentes fases biológicas (esporocistos, redias) hasta que se liberan cercarias pequeñas y de cola corta. Un crustáceo (cangrejo) actúa como segundo hospedador intermediario. En él ingresan las cercarias, que tras alojarse en su musculatura se transforman en metacercarias. La infección se inicia con la ingesta de crustáceos frescos o poco cocinados. En el interior del organismo las metacercarias se desenquistan en el duodeno, atravesando la pared intestinal y entrando en la cavidad peritoneal. Migran a través del diafragma, llegando a la pleura y finalmente al parénquima pulmonar. Se han encontrado vermes adultos en otras localizaciones como piel, hígado, bazo, peritoneo o sistema nervioso.

La clínica de la paragonimosis se caracteriza por presentar los siguientes datos. La fase inicial se produce por la migración del parásito. Su duración es entre 2 y 20 días. Habitualmente los pacientes están asintomáticos, aunque en ocasiones se produce dolor abdominal, diarrea, fiebre, dolor torácico, tos, urticaria y eosinofilia. La segunda fase o fase pulmonar se debe a la respuesta inflamatoria desarrollada frente a los gusanos adultos encapsulados en el pulmón o a la liberación de los huevos del parásito al árbol bronquial. Los síntomas principales son tos productiva y esputo, que puede ser hemoptoico. Es obligado realizar un diagnóstico diferencial con la tuberculosis pero la ausencia de fiebre y la presencia de eosinofilia descartan esta entidad. En fases más avanzadas se produce disnea, dolor pleurítico, tos crónica y expectoración abundante. En la radiografía de tórax pueden aparecer infiltrados difusos, nódulos, calcificaciones, derrame pleural y neumotórax. El parásito puede ir a otras localizaciones produciendo formas extrapulmonares. La más común y grave es la que afecta el sistema nervioso. Las presentaciones más frecuentes son meningitis y lesiones ocupantes de espacio con convulsiones, cefalea, déficit visuales o trastornos sensitivos y motores.

El diagnóstico etiológico se realiza mediante análisis parasitológico con la finalidad de identificar la fase de huevo en muestras procedentes de esputo o de heces. También se puede observar el parásito adulto o los huevos en biopsias pulmonares. Además se utilizan pruebas serológicas (ELISA o inmunoblot contra antígenos de *P. westermani*), disponibles en centros de referencia y con un alto rendimiento diagnóstico. Las pautas para el tratamiento de la paragonimosis se detallan en la tabla 2.

## Trematodosis intestinales

Dentro de este grupo se encuadran diferentes trematodosis de menor importancia y de predominio intestinal<sup>39</sup>. Las es-

pecies involucradas así como el mecanismo de transmisión y la distribución geográfica se describen en la tabla 1. Las características comunes más sobresalientes son las siguientes. El ciclo biológico se desarrolla utilizando dos hospedadores intermediarios (caracoles, peces, crustáceos, insectos o plantas acuáticas). Las manifestaciones clínicas habituales son dolor abdominal, dispepsia, diarrea y eosinofilia. A veces pueden invadir otros órganos como el miocardio o el sistema nervioso, produciendo alteraciones graves. El diagnóstico etiológico se realiza mediante identificación de huevos en muestras de heces. Hay que tener en cuenta que es difícil distinguir morfológicamente entre las distintas especies. La eliminación de los gusanos adultos tras el tratamiento (ver tabla 2) nos permite su caracterización definitiva.

## Bibliografía

● Importante ●● Muy importante

- ✓ Metaanálisis
- ✓ Artículo de revisión
- ✓ Ensayo clínico controlado
- ✓ Guía de práctica clínica
- ✓ Epidemiología

1. Webster BL, Southgate VR, Littlewood DT. A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *Int J Parasitol.* 2006;36:947-55.
2. Ohmae H, Sinuon M, Kirinoki M, Matsumoto J, Chigusa Y, Socheat D, et al. Schistosomiasis mekongi: from discovery to control. *Parasitol Int.* 2004;53:135-42.
3. Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature.* 2009;460:352-8.
4. Zhou Y, Zheng H, Chen Y, Zhang L, Wang K, Guo J, et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature.* 2009;460:345-51.
5. Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:347-56.
6. Dvorak J, Mashiyama ST, Braschi S, Sajid M, Knudsen GM, Hansell E, et al. Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie.* 2008;90:345-58.
7. ● King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet.* 2005;365:1561-9.
8. ●● Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, von Sonnenburg F, et al. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N Engl J Med.* 2006;354:119-30.
9. ● Leshem E, Maor Y, Meltzer E, Assous M, Schwartz E. Acute schistosomiasis outbreak: clinical features and economic impact. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1499-506.
10. Pardo J, Carranza C, Muro A, Angel-Moreno A, Martín AM, Martín T, et al. Helminth-related eosinophilia in African immigrants, Gran Canaria. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1587-9.
11. Carranza C, Pardo J, Muro A, Pérez-Arellano, JL. Cryptic parasite infection in recent West African immigrants with relative eosinophilia. *Clin Infect Dis.* 2008;46:48-50.
12. Mountford AP, Trottein F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. *Trends Parasitol.* 2009;20:221-6.
13. Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* 2008;108:109-17.
14. ●● Pearce EJ, Mac Donald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Rev.* 2002;2:499-511.
15. Rutitzky LI, Bazzone L, Shainheit MG, Joyce-Shaikh B, Cua DJ, Staderker MJ. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *J Immunol.* 2008;180: 2486-95.
16. Pérez Arellano JL, Espinoza EY, Sánchez MM, Muro A. Evasión mechanisms of parasites. *Res Rev Parasitol.* 2001;61:4-16.
17. Hervé M, Angeli V, Pinzar E, Wintjens R, Faveeuw C, Narumiya S, et al. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur J Immunol.* 2003;33:2764-72.
18. Meltzer E, Artom G, Marva E, Assous MV, Rahav G, Schwartz E. Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1696-700.



19. ●● Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:218-24.
20. ●● Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006;368:1106-18.
21. Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib Microbiol.* 2006;13:81-100.
22. Kamal SM, Graham CS, He Q, Bianchi L, Tawil AA, Rasenack JW, et al. Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. *J Infect Dis.* 2004;189:1140-50.
23. Karanja DM, Hightower AW, Colley DG, Mwinzi PN, Galil K, Andove J, et al. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: a longitudinal study. *Lancet.* 2002;360:592-6.
24. Oliver-González J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis.* 1954;95:86-91.
25. Stothard JR, Sousa-Figueiredo JC, Standley C, Van Dam GJ, Knopp S, Utzinger J, et al. An evaluation of urine-CCA strip test and fingerprick blood SEA-ELISA for detection of urinary schistosomiasis in schoolchildren in Zanzibar. *Acta Trop.* 2009;111:64-70.
26. Pardo J, Pérez-Arellano JL, López-Vélez R, Carranza C, Cordero M, Muro A. Application of an ELISA test using *Schistosoma bovis* adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:435-40.
27. Sandoval N, Siles M, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, López-Abán J, et al. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology* 2006;133:581-7.
28. Pérez-Arellano JL, Hernández M, Pisos E, Carranza C. Tratamiento de las enfermedades parasitarias: helmintosis y ectoparasitosis. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 2007;31:55-64.
29. Martínez-Fernández AR, Nogal JJ, Muro A. Ensayos de vacunación frente a *Fasciola hepatica*. *Anal Real Acad Ci Vet.* 2004;12:167-83.
30. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmisión, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol.* 2009;69:41-146.
31. Serradell MC, Guasconi L, Cervi L, Chiappello LS, Masih DT. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;117:197-208.
32. Hillyer GV, Soler de Galanes M, Rodríguez-Pérez J, Bjorland J, Silva de Lagrava M, Guzman SR, Bryan RT. Use of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian altiplano. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46:603-9.
33. Ubeira FM, Muiño L, Valero MA, Periago MV, Pérez-Crespo I, Mezo M, et al. MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:156-62.
34. Muro A, Casanueva P, López J, Ramajo V, Martínez AR, Hillyer GV. Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid binding protein T-cell epitope that protect against experimental fascioliasis in rabbits and mice. *J Parasitol.* 2007;93:817-23.
35. ● Lun ZR, Gasser RB, Lai DH, Li AX, Zhu XQ, Yu XB, et al. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:31-41.
36. Armignacco O, Caterini L, Marucci G, Ferri F, Bernardini G, Natalini Raponi G, et al. Human illnesses caused by *Opistorchis felineus* flukes, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1902-5.
37. Kaewpitoon N, Kaewpitoon SJ, Pengsaa P, Sripa B. *Opistorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol.* 2008;14:666-74.
38. ● Liu Q, Wei F, Liu W, Songtao Y, Zhang X. Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China. *Trends Parasitol.* 2008;24:318-23.
39. Toledo R, Esteban JG, Fried B. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Adv Parasitol* 2006, 63: 285-365.

#### Páginas web

[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)  
[www.who.int/neglected\\_diseases](http://www.who.int/neglected_diseases)  
[www.who.int/tdr/svc/diseases/schistosomiasis](http://www.who.int/tdr/svc/diseases/schistosomiasis)

**1.2. Enfermedades difícilmente transmisibles:  
Esquistosomosis**

**Título de la obra: Manual de enfermedades importadas**

**Editorial: Elsevier**

**Capítulo: Enfermedades difícilmente transmisibles:**

**Esquistosomosis**

**Autores: Luis Pérez del Villar, Virginia Velasco, José Luis  
Pérez-Arellano y Antonio Muro Álvarez**

c0210

# Infecciones difícilmente transmisibles IV: Esquistosomosis

Luis Pérez del Villar Moro, Virginia Velasco Tirado,  
José Luis Pérez-Arellano y Antonio Muro Álvarez

## ÍNDICE DE CAPÍTULO

u0010 INTRODUCCIÓN  
u0015 AGENTE CAUSAL Y CICLO BIOLÓGICO  
u0020 EPIDEMIOLOGÍA  
u0025 PATOGENIA

MANIFESTACIONES CLÍNICAS  
DIAGNÓSTICO  
TRATAMIENTO  
PREVENCIÓN

u0030  
u0035  
u0040  
u0045

### st0015 INTRODUCCIÓN

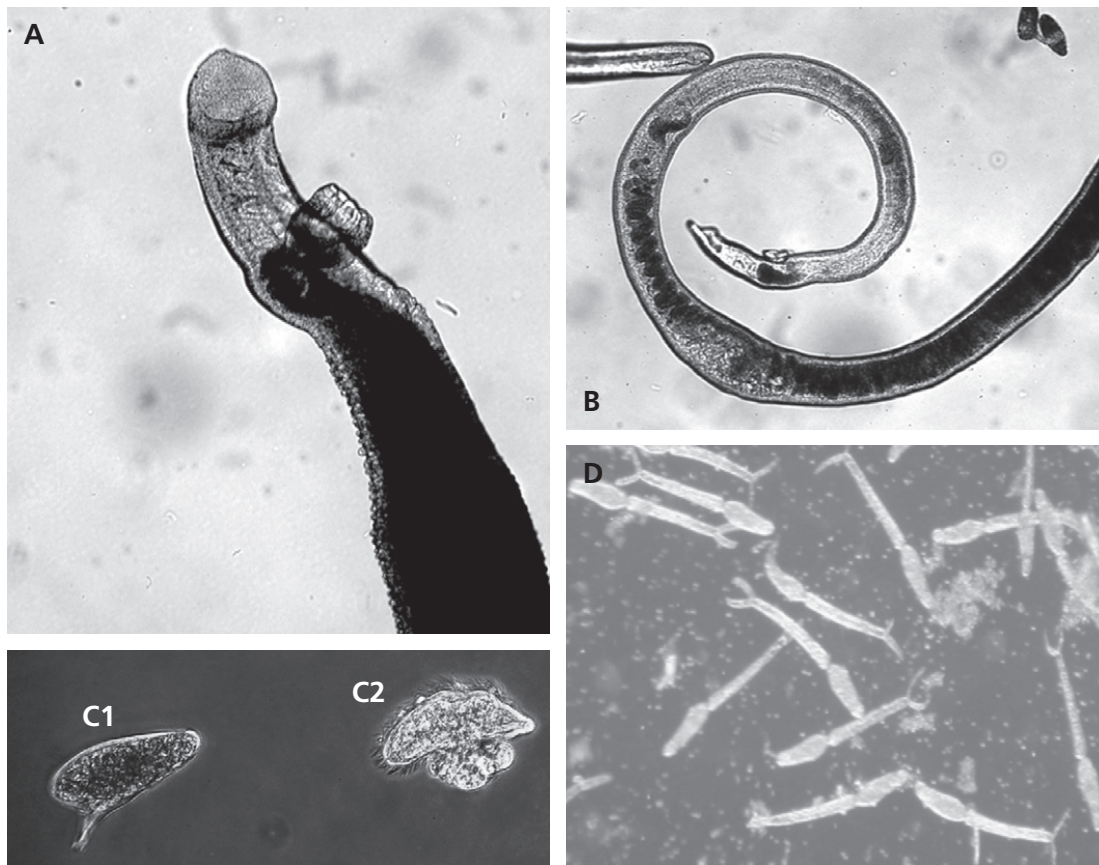
p0050 La esquistosomosis es una de las enfermedades parasitarias más prevalente en los trópicos, teniendo en cuenta el número de personas infectadas y la población en riesgo de infección. En los últimos años ha cobrado importancia en los países desarrollados, ante el aumento del número de viajeros e inmigrantes con esquistosomosis importada, aunque sigue siendo considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales olvidadas.

canal ginecóforo en el que aloja a la hembra, de morfología más estrecha y alargada. En 2009 se describe la secuencia completa del genoma de *S. mansoni*. Su tamaño es de 363Mb con 11.809 genes, un tamaño superior a la mayoría de patógenos secuenciados hasta el momento. Tiene 8 pares de cromosomas, 7 autosomas y un cromosoma sexual. Además, presenta un gran contenido en secuencias repetitivas (al menos el 40%), importantes desde el punto de vista evolutivo, filogenético y de relación con el hospedador. En paralelo, y en el mismo año, el Chinese Human Genome Centre publica la secuenciación del genoma de *Schistosoma japonicum*.

### st0020 AGENTE CAUSAL Y CICLO BIOLÓGICO

p0055 La esquistosomosis es el nombre colectivo de la enfermedad causada por la infección de una (o más) de las cinco especies del género *Schistosoma* (clase *Trematoda*, phylum *Platyhelminthes*) que afectan al ser humano: *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. mekongi* y *S. intercalatum*. Además, otras especies de esquistosomas, fundamentalmente del género *Trichobilharzia*, que parasitan aves y otros mamíferos pueden causar dermatitis cercariana en el ser humano. El esquistosoma es un trematodo dioico sanguíneo que presenta diformismo sexual, el gusano macho tiene una hendidura o

Las parasitosis ocasionadas por estos trematodos son adquiridas por el contacto con agua dulce contaminada con larvas de esquistosoma (cercarias), liberadas por diferentes especies de caracoles. En la figura 42-1 se muestran las distintas formas que adopta *S. mansoni* a lo largo de su ciclo biológico. Las cercarias penetran activamente por la piel del individuo donde se transforman en esquistosómulas. La esquistosómula migra por el sistema vascular hacia los pulmones, para volver a la circulación general. Los vermes de *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* y *S. intercalatum* se asientan y maduran en los vasos mesentéricos, mientras que los vermes de *S. haematobium* maduran en el plexo vesical. Los vermes adultos se aparean y tras un período que



f0010 **FIGURA 42-1** Fases de *Schistosoma mansoni*: A: gusano adulto macho; B: gusano adulto hembra, C1: huevo y C2: miracidio, D: cercarias.

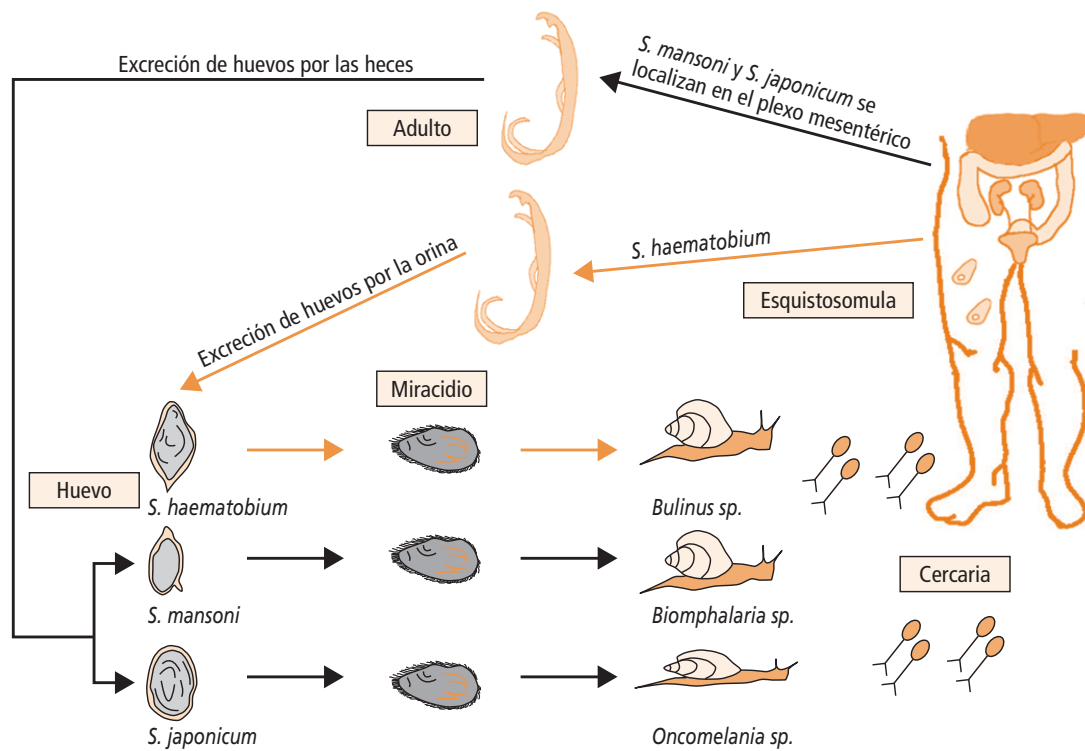
oscila entre los 35 y 70 días comienzan a liberar huevos que se eliminan por las heces u orina del individuo infectado. Los huevos son de morfología no operculada y con una «espina» que difiere en su posición dependiendo de la especie de esquistosoma. En el exterior los huevos eclosionan liberando los miracidios, que penetran en los caracoles de diversos géneros (*Biomphalaria* para *S. mansoni*, *Bulinus* para *S. haematobium* y *S. intercalatum*, *Oncomelania* para *S. japonicum* y *Neotricula* para *S. mekongi*), donde se transforman y multiplican hasta convertirse en cercarias y, así, cerrar el ciclo biológico. Una representación de las diferentes fases del ciclo biológico se muestra en la figura 42-2.

## st0025 **EPIDEMIOLOGÍA**

p0065 La esquistosomosis es endémica en 76 países y territorios. Se calcula que 207 millones de personas están infectadas y 779 millones están en riesgo de

infección en todo el mundo. La distribución geográfica de las diferentes especies de esquistosoma depende del clima, la calidad del agua y otros factores ecológicos que regulan la población de caracoles, así como los patrones de suministro de agua, saneamiento y uso humano. De esta forma, las medidas de control de vectores y el tratamiento masivo a la población infantil han conseguido eliminar la infección en algunas regiones (p. e., norte de África), mientras que la construcción de presas artificiales o los flujos de población han introducido la infección en zonas previamente libres de ella (p. e., Mauritania, Djibouti).

El 85% de la población infectada reside en África Subsahariana. Según los datos aportados p0070 por las bases epidemiológicas de la International Society of Travel Medicine y de Centers for Disease Control and Prevention (GeoSentinel), así como del European Network on Imported Infectious Disease Surveillance (TropNetEurop) de 2008, se trata de la segunda enfermedad importada más prevalente, después de la malaria.



f0015 FIGURA 42-2 Ciclo biológico de las especies más representativas de esquistosomas.

La mayoría de los casos proceden de África occidental, Mali, Costa de Marfil, República Democrática del Congo y Uganda. Algunas de las regiones turísticas que suponen un alto riesgo de infección son el país Dogon en Mali, Banfora en Burkina Faso, la orilla sur del Lago Malawi y el Parque Nacional de Omo en Etiopía.

El mayor porcentaje de casos importados ocurre en inmigrantes, seguido de viajeros y expatriados. Hasta un 50% de los casos importados globalmente y un 30% de los casos importados por viajeros se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico, lo que indica la necesidad de una búsqueda activa de infección en personas procedentes de área endémica. En España, se han publicado varias series de casos en los últimos años. Roca et al, en Barcelona, presentan 200 casos acumulados en inmigrantes y 80 casos en viajeros durante 11 años. Según estos autores, hasta un 2,5% de los viajeros a zonas endémicas y hasta un 15% de los inmigrantes africanos pueden presentar la enfermedad.

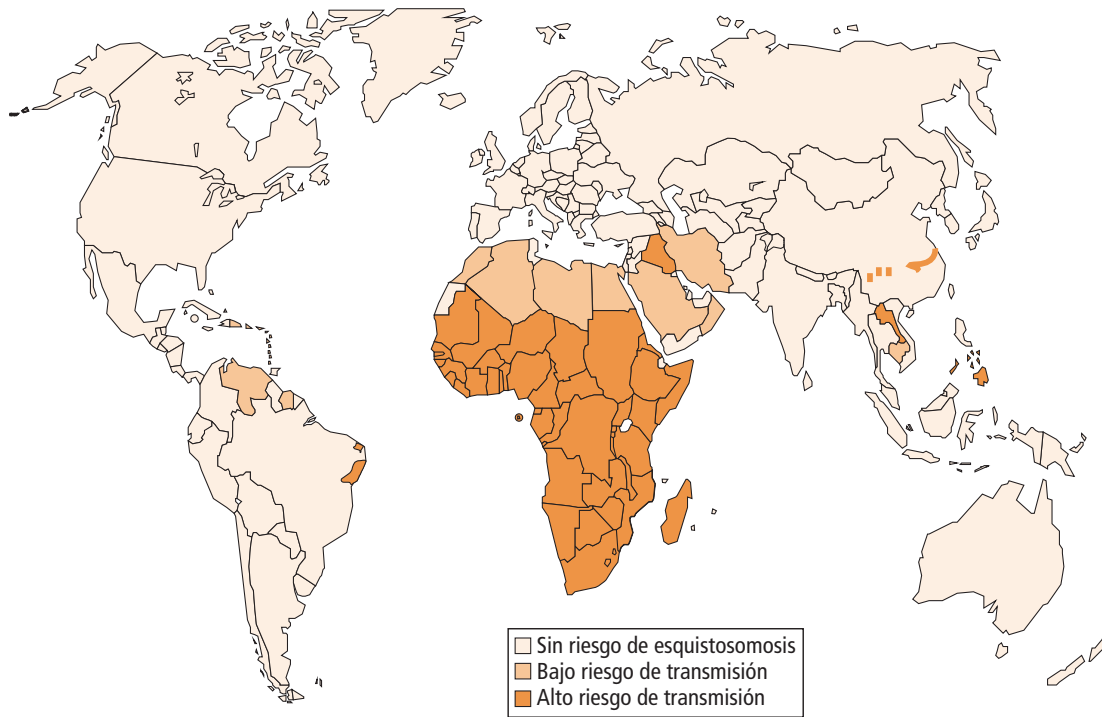
Los países con riesgo de infección por esquistosoma se representan en la figura 42-3 y la dis-

tribución mundial de las especies se recoge en la tabla 42-1.

## PATOGENIA

Se pueden distinguir varias fases:

1. Fase de penetración cercariana. Es un proceso complejo que requiere de la presencia de estímulos químicos por parte del hospedador, así como de la liberación de proteasas secretadas por la cercaria que degrada la elastina de la piel facilitando su penetración.
2. Fase de migración de la esquistosómula. Durante las 4-6 semanas siguientes a la infección, la esquistosómula migra por la circulación sanguínea hasta llegar a su sitio de maduración, produciéndose altos niveles de citocinas pro-inflamatorias (principalmente  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6 e  $IFN\gamma$ ) cuya máxima expresión se produce a la decimosexta semana post-infección. Esta situación se asocia a una respuesta Th1 predominante, responsable de la fiebre de Katayama.



f0020 **FIGURA 42-3** Distribución global de esquistosomosis. OMS, 2007.

t0010

TABLA 42-1 Distribución geográfica de las distintas especies de esquistosoma y afectación orgánica			
Especie	Distribución	Localización principal	Otras localizaciones
<i>S. haematobium</i>	África Madagascar Mauritania Arabia Oriente Próximo	Urinaria	Genital Neurológica Pulmonar
<i>S. mansoni</i>	África Arabia Madagascar Caribe, Venezuela, Brasil	Intestinal, hepática	Genital Neurológica Pulmonar
<i>S. japonicum</i>	China Filipinas Indonesia (Sulawesi) Río Mekong (orilla este de Tailandia)	Intestinal, hepática	Neurológica
<i>S. mekongi</i>	Delta río Mekong	Intestinal, hepática	
<i>S. intercalatum</i>	Focos aislados en África occidental	Intestinal	



o020 3. Fase de formación del granuloma alrededor del huevo. Esta fase ocurre a partir de la octava semana post-infección. Aunque una gran cantidad de huevos son liberados al exterior, una parte quedan atrapados en hígado, intestino o vejiga urinaria. Alrededor de los huevos se produce un infiltrado celular compuesto por macrófagos, eosinófilos, linfocitos CD4<sup>+</sup> y colágeno que da lugar a una amplia reacción granulomatosa <sup>u</sup>. El granuloma destruye el huevo y, además, secuestra o neutraliza sus antígenos, Sin embargo daña al hospedador produciendo fibrosis y obstrucción del flujo sanguíneo. Los antígenos derivados de la fase de huevo interactúan con TLR-2 estimulando la producción de IL-10 y, por lo tanto, la supresión de citocinas propias de respuestas Th1 como IFN $\gamma$ , esto origina una respuesta Th2 característica de la fase crónica de la esquistosomosis. Estudios realizados con ratones *knockout* deficientes en IL-4 demuestran que esta citocina es la responsable directa del tamaño del granuloma. También se ha observado que tanto la expresión de IL-4 como IL-13 inducen estimulación macrofágica vía arginasa produciendo L-ornitina y prolina que estimula la síntesis de colágeno originando fibrosis. Hasta el momento, la forma grave de esquistosomosis se asociaba desde el punto de vista experimental con una respuesta inmune desviada hacia Th1 en la que IL-12 es un elemento crítico para el desarrollo de este tipo de respuesta. Sin embargo, la reciente descripción de la respuesta T-helper-17 ha aportado nuevos datos a la patogenia de la esquistosomosis, de esta manera se ha demostrado la participación de IL-23 e IL-17 en el desarrollo de la forma grave de la enfermedad.

p010 Finalmente, es importante destacar que la respuesta inmune frente a esquistosomas no se desarrolla de forma aislada ya que una gran proporción de individuos afectados albergan otras infecciones como malaria, hepatitis B o C o VIH que modifican la respuesta inmune del individuo.

st0035 **MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

p0110 Las manifestaciones clínicas de la esquistosomosis se pueden dividir en tres fases: fase de inicio o también denominada dermatitis cercariana o

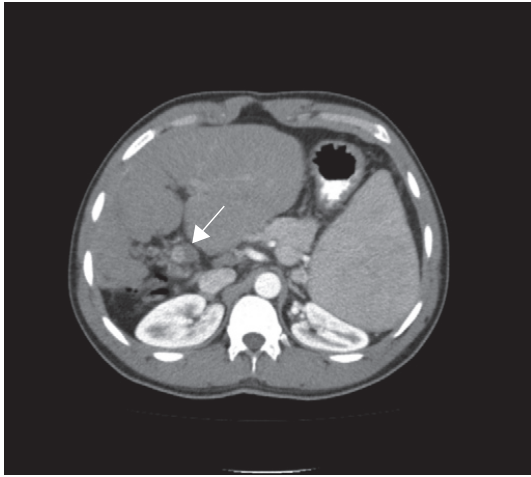
prurito del bañista, fase aguda o síndrome de Katayama y esquistosomosis crónica.

La segunda fase o síndrome de Katayama p0115 se produce entre las 2-8 semanas después de la exposición y se debe a la reacción inmunológica desencadenada frente a la fase de migración de la esquistosómula. Se caracteriza principalmente por fiebre, lesiones cutáneas (exantema, urticaria), afectación pulmonar (tos, disnea) y eosinofilia. En general es autolimitada, aunque en algunas ocasiones los síntomas pueden persistir más de 10 semanas y el paciente puede presentar diarrea, pérdida de peso, dolor abdominal, hepatoesplenomegalia, etc. El síndrome de Katayama se observa con más frecuencia en viajeros procedentes de áreas endémicas.

La tercera fase o esquistosomosis crónica p0120 aparece meses o años después de la infección y se debe a la reacción granulomatosa formada en torno a los huevos atrapados en hígado, bazo, intestino y otras localizaciones más lejanas como pulmones y sistema nervioso. Se presenta con más frecuencia en personas residentes en áreas endémicas de esquistosomosis. Sus principales manifestaciones clínicas se pueden clasificar en tres grupos:

- Manifestaciones habituales: Los principales datos que indican la posibilidad de una esquistosomosis crónica es la presencia de eosinofilia y de microhematuria (en las infecciones ocasionadas por *S. haematobium*). u0050
- Manifestaciones clásicas frecuentes: Las más típicas son las urinarias, las hepatoesplénicas y las intestinales. Las manifestaciones urinarias se producen principalmente por la localización de *S. haematobium* en plexos venosos del tracto urinario. Cursan clínicamente con un síndrome miccional irritativo con disuria, polaquiuria, proteinuria y, especialmente, hematuria terminal. Estadios más tardíos de la enfermedad pueden provocar engrosamiento de la pared de la vejiga, pólipos o masas vesicales. En ocasiones, se pueden asociar infecciones bacterianas. Si la enfermedad progresa puede desencadenar fibrosis y calcificación de uréteres y vejiga, produciendo hidrouréter e hidronefrosis <sup>u</sup>. Las manifestaciones hepatoesplénicas se producen cuando los huevos de *Schistosoma* (fundamentalmente *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi*), localizados en las venas mesentéricas, acceden a la circulación venosa portal, ocasionando una oclusión u0055

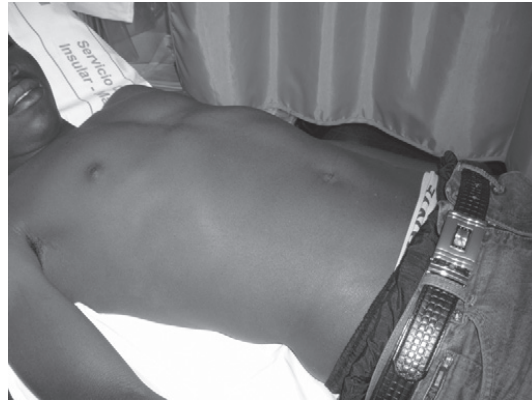
© Elsevier. Es una publicación MASSON. Fotocopiar sin autorización es un delito.



f0025 **FIGURA 42-4** Tomografía computarizada de paciente procedente de Senegal con hepatoesplenomegalia por esquistosomosis crónica (*S. mansoni*) y trombosis portal secundaria (flecha).

gradual de las venas intrahepáticas que puede causar fibrosis de Symmers. La consecuencia es el desarrollo de hipertensión portal que se manifiesta por ascitis, esplenomegalia (figs. 42-4 y 42-5), desarrollo de varices esofágicas con sangrado digestivo alto y encefalopatía. Teniendo en cuenta la localización de las lesiones, no aparecen datos de insuficiencia hepatocelular. Característicamente los valores séricos de transaminasas y bilirrubina son normales, excepto si existe coinfección por virus hepatotropos primarios. Las manifestaciones intestinales (frecuentes en la infección por *S. intercalatum*) se producen cuando los huevos acceden a la mucosa causando hiperplasia, ulceración, formación de microabscesos y poliposis. En la clínica se observa dolor abdominal y diarrea de tipo inflamatorio con o sin sangre. En ocasiones, puede complicarse produciendo cuadro oclusivo o suboclusivo, prolapso anal o incluso fístulas anorrectales. Todo esto plantea un diagnóstico diferencial con la enfermedad inflamatoria intestinal.

- u0060 • Manifestaciones clásicas poco frecuentes: Se denominan también esquistosomosis ectópicas. Las más frecuentes son las cardiopulmonares, renales, genitales y neurológicas. Las manifestaciones cardiopulmonares derivan del escape de huevos desde las venas vesicales (en el caso de *S. haematobium*) o desde la circulación portal a través del *shunt* porto-cava. La localización de los huevos en los vasos pulmonares genera la fibrosis de los



**FIGURA 42-5** Paciente procedente de Mali con esplenomegalia de visu secundaria a infección crónica por esquistosoma. f0030

mismos, cuya consecuencia es la hipertensión pulmonar y el desarrollo secundario de insuficiencia cardíaca derecha. En ocasiones, la esquistosomosis presenta manifestaciones derivadas de la afectación glomerular. En su patogenia influyen dos factores: el depósito de inmunocomplejos y la presencia de *shunt* portosistémicos. Histopatológicamente el patrón más frecuente es la glomerulonefritis mesangial, y las manifestaciones más habituales son la proteinuria y microhematuria. Las lesiones genitales son de dos tipos: inflamatorias (en relación a huevos viables) y fibrosas e hipertróficas (en relación a huevos no viables o calcificados). En las mujeres afecta a la vulva, la vagina y el cuello. Son indoloras pero en el caso de ulcerarse, fistulizarse o sobreinfectarse pueden producir dispareunia y leucorrea. En los hombres, las más frecuentes son la prostatitis crónica y la infección de las vesículas seminales. La clínica más habitual es la alteración en la eyaculación y la hematoespermia. Las dos manifestaciones más típicas de la neuroesquistosomosis son el síndrome cerebral y el medular. La localización de los huevos de *Schistosoma* spp en territorio cerebral puede debutar como una crisis comicial y suele progresar a una encefalitis focal cerebral (más frecuente en *S. japonicum*). La localización medular de los huevos de esquistosoma es más frecuente que la encefálica y puede producir varias formas de mielitis (más habitual en *S. mansoni*). Las más características son la mielitis granulomatosa, la mielorradiculitis y la mielitis isquémica o vascular. La más frecuente es la mielitis transversa. Los pacientes



presentan de forma prácticamente constante una vejiga neurógena asociada, en ocasiones, a un nivel sensitivo-motor con debilidad en extremidades inferiores, incapacidad para la marcha, dolor lumbar y parestesias.

p0140 Se ha demostrado que las cistitis crónicas producidas por *S. haematobium* se comportan como lesiones precancerosas que degeneran con el tiempo en carcinomas de vejiga urinaria de tipo escamoso. Esta asociación no ha sido demostrada con otras especies de esquistosomas en relación con carcinomas de colon o hepatocarcinomas.

p0145 Las relaciones entre esquistosomosis y otras infecciones pueden concretarse en los siguientes aspectos:

o0025 1. Se piensa que las campañas de tratamiento masivo parenteral con praziquantel en algunos países como Egipto contribuyeron a la transmisión de la infección del virus de la hepatitis C.

o0030 2. La coinfección de esquistosomosis e infección crónica por virus de la hepatitis B y C se manifiesta con una fibrosis más intensa y precoz que en individuos no coinfectados.

o0035 3. Por otro lado, es probable que las lesiones de la esquistosomosis genital puedan alterar la barrera mucocutánea favoreciendo la transmisión de las enfermedades de transmisión sexual, entre las que destaca la infección por VIH.

o0030 4. Por último, se ha descrito asociación entre abscesos hepáticos piogénicos por *Staphylococcus aureus* y la infección por *Schistosoma*, así como sepsis ocasionadas por enterobacterias y esquistosomosis crónica intestinal.

## DIAGNÓSTICO

p0140 La esquistosomosis aguda supone un reto diagnóstico basado en un cuadro clínico compatible y una buena anamnesis que incluya posibles contactos con agua dulce (baño o deportes acuáticos) en áreas endémicas. El diagnóstico serológico es el método de elección en pacientes con sospecha clínica de esquistosomosis no inmunizados previamente. Se suele realizar mediante ELISA, que puede confirmarse con inmunoblot. La serología acostumbra a dar positivo entre 4-6 semanas tras el contacto, por lo que en numerosas ocasiones su utilidad es únicamente como diagnóstico de

confirmación. Presenta otro inconveniente: solo se realiza en centros de referencia. El diagnóstico parasitológico es de escasa utilidad en la esquistosomosis aguda, ya que la emisión de huevos aún no ha comenzado o bien se excretan en escasa cuantía. Las técnicas de detección de antígenos del parásito aportan una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, pero actualmente se utilizan a nivel experimental. Se están desarrollando técnicas de biología molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa, que pueden aplicarse en diagnóstico poblacional y diagnóstico precoz de la esquistosomosis aguda.

En la esquistosomosis crónica, el diagnóstico parasitológico directo mediante la observación de huevos de esquistosoma es el método de elección en pacientes procedentes de área endémica, debido a su alta sensibilidad. Permite el diagnóstico de especie, al observar la morfología diferente del huevo y cuantificar la intensidad de la infección, aunque precisa personal entrenado para su correcta realización. *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* presentan una fase de huevo con morfología ovoide y mayor tamaño (entre 60-176 µm), mientras que la fase de huevo de *S. japonicum* y *S. mekongi* tiene aspecto redondeado y menor tamaño (entre 50-100 µm). Además, *S. haematobium* y *S. intercalatum* tienen una espina terminal prominente, mientras que *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi* tienen una espina lateral, el primero prominente y los otros dos reducida. Se pueden observar huevos de *S. haematobium* en orina, mediante técnicas de concentración (sedimentación, filtración o centrifugación). Se debe intentar recoger las muestras entre las 10 y 14 h, ya que aumenta la emisión de huevos a causa del ritmo circadiano del parásito. La determinación de huevos en heces en la esquistosomosis intestinal se realiza procesando las muestras mediante técnicas de concentración o filtración; la más utilizada es la de Kato-Katz, en la que se examina microscópicamente una muestra fresca de 50 mg de heces en extensión, pudiéndose llegar a detectar como positivas muestras con un mínimo de 20 huevos/g de heces. La utilidad de la serología en pacientes crónicamente expuestos es muy limitada. Los valores se mantienen positivos durante un largo período de tiempo, incluso en pacientes tratados y no permite distinguir reinfección. En ocasiones, el diagnóstico se realiza en muestras de biopsias (recto, vejiga, hígado, SNC, etc.) en las que se observan los granulomas rodeando a los huevos.

© Elsevier. Es una publicación MASSON. Fotocopiar sin autorización es un delito.

En la esquistosomosis genital pueden apreciarse huevos de *S. haematobium* o *S. mansoni* en fluido seminal, orina o biopsia prostática.

## st0045 **TRATAMIENTO**

p0180 El fármaco de elección es el praziquantel, que se administra para el tratamiento de la esquistosomosis aguda en dosis de 20 mg/kg cada 12 h durante tres días, repitiendo la dosis al cabo de 3-4 semanas y para la esquistosomosis crónica en dosis de 20 mg/kg cada 12 h durante un día para todas las especies de *Schistosoma* excepto para *S. japonicum*, que se recomienda cada 8 h. El praziquantel es un fármaco seguro y eficaz que actúa contra las formas adultas del parásito. Por tanto, un tratamiento temprano (antes de las semanas 5-6 después de la infección por *S. mansoni* y *S. japonicum* y antes de las semanas 10-12 de la infección por *S. haematobium*) puede resultar inefectivo. En pacientes que presentan fiebre de Katayama se recomienda tratamiento suplementario con corticoides para reducir la gravedad de la reacción inmunológica (dexametasona, 20 mg/día, durante 3 días). En los pacientes con afectación neurológica, también se aconseja asociar esteroides a dosis similares y prolongar el tratamiento de praziquantel durante 5 días.

p0185 Como tratamiento alternativo se usa oxamniquina a dosis de 10 mg/kg/día cada 12 h, durante 2 o 3 días.

## st0050 **PREVENCIÓN**

p0190 En primer lugar, es necesario implantar medidas de educación sanitaria, principalmente evitar el contacto con aguas infectadas. También son necesarias mejoras en las viviendas, en los tratamientos de aguas de consumo y residuales, y en los sistemas de irrigación, como construcción de presas y pantanos. La aplicación generalizada de tratamientos preventivos ha permitido disminuir la prevalencia de la enfermedad en determinadas zonas. No obstante, con estas actuaciones no ha sido posible erradicar la enfermedad y, además, se han seleccionado resistencias al praziquantel. Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna vacuna efectiva, ni se ha logrado conseguir en los humanos los avances realizados en estudios de vacunas experimentales llevadas a cabo en modelos animales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Araujo MI, de Jesús AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol* 1996;26(6):1399-403. bib0010
- Bierman WF, Wetsteyn JC, van Gool T. Presentation and diagnosis of imported schistosomiasis: relevance of eosinophilia, microscopy for ova, and serology. *J Travel Med* 2005;12:9-13. bib0015
- Corachan M. Schistosomiasis and international travel. *Clin Infect Dis* 2002;35(4):446-50. bib0020
- Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiaramonte M, Hesse M, Davis EM, et al. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *Faseb J* 2001;15:2545-7. bib0025
- Jelinek T; European Network on Imported Infectious Disease Surveillance. Imported schistosomiasis in Europe: preliminary data for 2007 from TropNetEurop. *Euro Surveill* 2008;13, pii:8038. bib0030
- Meltzer E, Artom G, Marva E, Assous MV, Rahav G, Schwartz E. Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1696-700. bib0035
- Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):97-111. bib0040
- Nicolls DJ, Weld LH, Schwartz E, Reed C, von Sonnenburg F, Freedman DO, et al. Characteristics of schistosomiasis in travelers reported to the GeoSentinel Surveillance Network 1997-2008. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:729-34. bib0045
- Roca C, Balanzo X, Gascón J, Fernández-Roure JL, Vinuesa T, Valls ME, et al. Comparative, clinico-epidemiologic study of *Schistosoma mansoni* infections in travellers and immigrants in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:219-23. bib0050
- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med* 2002;346:1212-20. bib0055
- Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis* 2007;7:218-24. bib0060
- Rutitzky LI, Bazzone L, Shainheit MG, Joyce-Shaikh B, Cua DJ, Stadecker MJ. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *J Immunol* 2008;180:2486-95. bib0065

- bib0070 Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 2003;171:3655-67.
- bib0075 Schwartz E. Schistosomiasis. En: Schwartz E, ed. *Tropical diseases in travellers*, 1.<sup>a</sup> ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2009, pp.: 229-42.
- bib0080 Schwartz E, Pick N, Shazberg G, Potasman I. Hematospermia due to schistosome infection in travelers: diagnostic and treatment challenges. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1420-4.
- bib0085 Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 2006;6(7):411-25.
- bib0090 Surveillance ENoIID. TropNetEurop Friends & Observers Sentinel Surveillance report: December 2008.
- st0060 World Human Organization. International travel and health: situation as on 1 January 2009.

### **1.3. Schistosoma and Schistosomiasis**

**Título de la obra: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens**

**Editorial: CRC press**

**Capítulo: Schistosoma and Schistosomiasis**

**Autores: Antonio Muro and Luis Pérez del Villar**

# 41 Schistosoma and Schistosomiasis

Antonio Muro and Luís Pérez del Villar

## CONTENTS

41.1 Introduction .....	439
41.1.1 Structure and Biology of Schistosomes .....	440
41.1.1.1 Taxonomy .....	440
41.1.1.2 Morphology and Life Cycle .....	440
41.1.1.3 Genome, Transcriptome, and Proteome .....	440
41.1.2 Epidemiology of Schistosomiasis .....	441
41.1.2.1 Geographical Distribution and Current Status of Infection .....	441
41.1.2.2 Immigrants and Travelers .....	442
41.1.3 Pathogenesis of Human Schistosomiasis: Immune and Genetic Aspects .....	442
41.1.3.1 Acute Phase .....	443
41.1.3.2 Chronic Phase .....	443
41.1.3.3 Susceptibility and Resistance to Schistosomiasis .....	443
41.1.4 Clinical Disease .....	444
41.1.4.1 Cercarial Dermatitis .....	444
41.1.4.2 Katayama Fever .....	444
41.1.4.3 Chronic Schistosomiasis .....	444
41.1.4.4 Association with Carcinogenesis .....	445
41.1.4.5 Interaction with Other Infections .....	445
41.1.5 Diagnosis .....	445
41.1.5.1 Conventional Techniques .....	445
41.1.5.2 Molecular Techniques .....	446
41.1.6 Treatment, Chemoprophylaxis, and Prevention .....	447
41.2 Methods .....	447
41.2.1 Sample Preparation .....	447
41.2.1.1 DNA Extraction from <i>Schistosoma</i> sp. ....	447
41.2.1.2 DNA Extraction from Urine Samples .....	448
41.2.2 Detection Procedures .....	448
41.2.2.1 PCR Approach for Genus- and <i>S. mansoni</i> -Specific Amplification from Urine Samples .....	448
41.3 Conclusion and Future Perspective .....	448
References .....	449

## 41.1 INTRODUCTION

Human schistosomiasis is a severe debilitating illness that represents one of the most important parasitic diseases in tropical areas. It affects over 200 million people across 74 countries [1]. A digenetic trematode worm (“fluke”) of the genus *Schistosoma* that infects both humans and animals is the parasite responsible for schistosomiasis. This illness was first reported in 1798; Renault describes episodes of hematuria suffered by Napoleon’s army soldiers in Egypt. However, the first report of one *Schistosoma* species was made in 1851 by Theodor von Siebold and Theodor Bilharz, who describe *Schistosoma haematobium* (this is the reason why schistosomiasis is also called “bilharziosis”). A year later, the relationship between *S. haematobium* and urinary pathology triggered by this *Schistosoma* species was

established. *Schistosoma* is a neglected ancient pathogen whose evolution is associated with vertebrate host. In fact in 1910, Marc Arman Ruffer found *S. haematobium* eggs in two Egyptian mummies dated 1250.00–1000 years [2] B.C. A few years earlier, in 1902, Manson announced that intestinal schistosomiasis was caused by *Schistosoma mansoni*. Almost simultaneously, in 1904, Fujiro Katsurada discovered *Schistosoma japonicum* and Dario Fujii correlated this parasite with schistosomiasis found in people and animals of the Valley of Katayama. This fact determined the name of Katayama, attributable to the acute phase of the disease. In 1915, Robert Leiper described the intermediate hosts (in different snail species) completing the biological cycle. Other schistosome species like *Schistosoma intercalatum* or *Schistosoma mekongi* [3] were described in humans in

Q1

the second part of the 20th century. Recently, a new species denominated *Schistosoma guineensis* [4] has been described.

#### 41.1.1 STRUCTURE AND BIOLOGY OF SCHISTOSOMES

##### 41.1.1.1 Taxonomy

The genus *Schistosoma* belongs to the family Schistosomatidae, order Strigeiformes, subclass Digenea, class Trematoda, phylum Platyhelminthes, and kingdom Animalia [5]. The genus *Schistosoma* contains 21 species which are classified into four groups according to the geographic distribution, morphology of the parasite's eggs, and the intermediate host [6]. However, the taxonomy and phylogeny of *Schistosoma* sp. are in continuous review due to the large number of molecular studies being carried out [7]. Five major schistosome species are able to infect humans: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, and *S. mekongi*, although human infections by *S. malayensis*, *S. mattheei*, and *S. guineensis* [4] have been described.

##### 41.1.1.2 Morphology and Life Cycle

Schistosomiasis is acquired by contact with freshwater contaminated with cercariae (free-swimming larval forms of parasite). Cercarial larvae are disseminated by different species of snails. *S. mansoni* is transmitted by *Biomphalaria*; *S. haematobium* and *S. intercalatum* by *Bullinus*; *S. japonicum* by *Oncomelania*; and *S. mekongi* by *Neotricula* [3]. The cercariae actively penetrate mammal skin, discarding their bifurcated tail, and transform into the schistosomula phase. Schistosomula migrate toward the lungs and return through the general circulation to their final sites of parasitism; *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, and *S. intercalatum* migrate to mesenteric veins, whereas *S. haematobium* reaches the vesical veins of the bladder. In this location, male and female parasites complete their maturation; sexual reproduction occurs and oviposition begins. The females are

able to produce hundreds to thousands of eggs per day. The majority of eggs migrate through the lumen of the bladder or the intestine and are excreted in the urine or feces in a period of time of 35–70 days after infection. The description of the more representative morphological features of eggs and adult worms are shown in Table 41.1. Eggs reach the water and release the miracidia that penetrate the snails to transform and multiply asexually until they become cercariae. The life cycle of *S. mansoni* kept at our laboratory is illustrated in Figure 41.1.

##### 41.1.1.3 Genome, Transcriptome, and Proteome

In 1994, the World Health Organization (WHO) along with Schistosoma Genome Network began the project of sequencing the *genome* of *S. mansoni* in order to understand the processes involved in the transduction/translation and in the quantitative expression of potential genes as targets for designing vaccines and drugs. Finally, in 2009, the complete sequence and genome mapping of *S. mansoni* [8] was described. The genome size of *S. mansoni* is 363 Mb, larger than most pathogens sequenced to date. 11,809 genes have been identified with an average size of 4.7 kb encoding 13,197 transcripts. The genes described have a particular structure with large introns (average of 1692 bp) and shorter exons (217 bp). In addition, 5' introns are much smaller than the introns of the 3' end. 43% of the genome (distributed in 153 scaffolds) has been mapped using the technique of *in situ* hybridization (FISH) in eight pairs of chromosomes, seven autosomes, and one sex chromosome. Another important feature of the genome of *S. mansoni* is the high content of repetitive sequences (at least 40%), an important fact from the standpoint of evolutionary and phylogenetic relationship with the host. In the same year, the Chinese Human Genome Sequencing Center published and mapped the *S. japonicum* genome [9]. The genome of *S. japonicum* is 397 Mb, in which 13,469 genes encoding proteins have been identified. The

**TABLE 41.1**  
**Morphological Characteristics of *Schistosoma* spp.**

	Morphology	<i>S. haematobium</i>	<i>S. intercalatum</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. mekongi</i>
Adults	Large (μm)	10–15	10–14	10–12	10–20	10–20
	Diameter (μm)	0.75–1	0.3–0.4	1.10	0.55	0.41
Male	Number of testes	4–5	2–7 (+4–5)	4–13 (+7–8)	6–7	6–7
	Tubercles	Fine	Fine	Prominent	Absent	Absent
Female	Ovary (position)	Hindquarters	Posterior half	Anterior third	Half	Posterior half
	Utero (position)	Anterior	Anterior	Anterior half	Anterior half	Anterior half
		two-thirds	two-thirds			
	Number of eggs <i>in utero</i>	100	10–50	5–60	5–200	10+
Mature eggs	Shape	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Round	Round
	Size (μm)	62 × 150	61 × 176	61 × 140	50 × 100	57 × 66
		Terminal	Terminal	Lateral	Lateral	Lateral
	Spine	(prominent)	(prominent)	(prominent)	(reduced)	(reduced)
	Eggs/females/day	20–300	150–400	100–300	3500	¿?

Q3

Q2

Q4



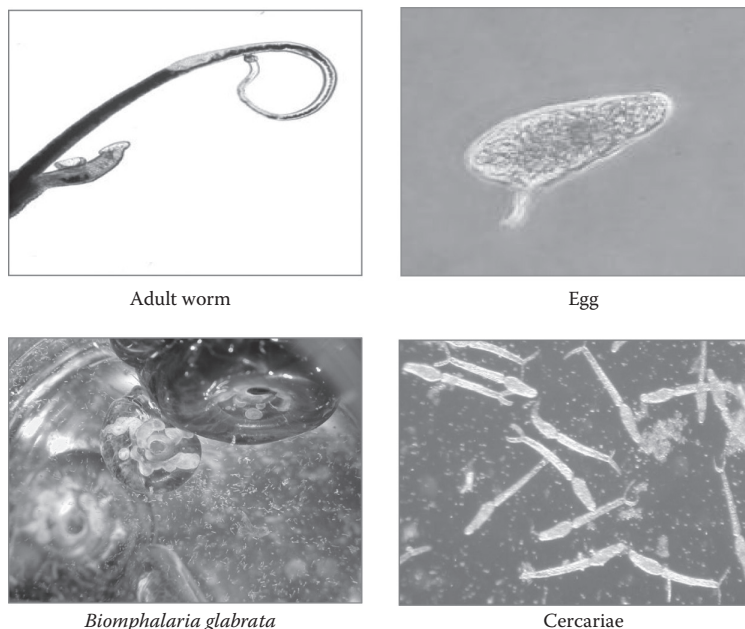


FIGURE 41.1 Biology of *Schistosoma mansoni*.

genome of *S. japonicum* conserves a large number of homologous sequences with the genome of *S. mansoni*, mostly those of protein coding regions [10]. Moreover, the *S. japonicum* genome has a high content of repetitive sequences (40.1% of the genome).

The first step in sequencing the genome of any organism is to generate *express sequencer tag* (EST), short sequences of randomly selected cDNA reflecting the transcriptional activity of organisms and tissues [11]. The *transcriptome* of *S. mansoni* [12] and *S. japonicum* [13] were completed in Brazil and China, respectively. In both projects, the ESTs were generated from a cDNA library obtained by RT-PCR which amplified the coding region of mRNA. The transcriptome obtained from six stages of the life cycle of *S. mansoni* presented 163,586 ESTs, grouped in 30,988 “or assembled EST clusters,” whereas the transcriptome of *S. japonicum* consists of 43,707 ESTs, grouped into 13,131 clusters that cover most of the coding regions of proteins; 20% of these clusters show similarity to sequences described in mammals [13]. This fact provides information on the relationship established by schistosome parasites with the host and how these parasites exploit the endocrine and immune signals.

The term *proteome* was assigned in the mid-1990s to describe the total proteins expressed by the genome [14]. Proteome characterization of schistosome and other parasites are being currently developed using two powerful technologies: two-dimensional electrophoresis (2DE) and mass spectrometry. Many proteomic studies have compared the protein composition between different stages of the life cycle of *S. mansoni* [15] and between male and female adults of *S. japonicum* [16]. However, the numerous molecules of schistosomes in different organs and systems of interest are

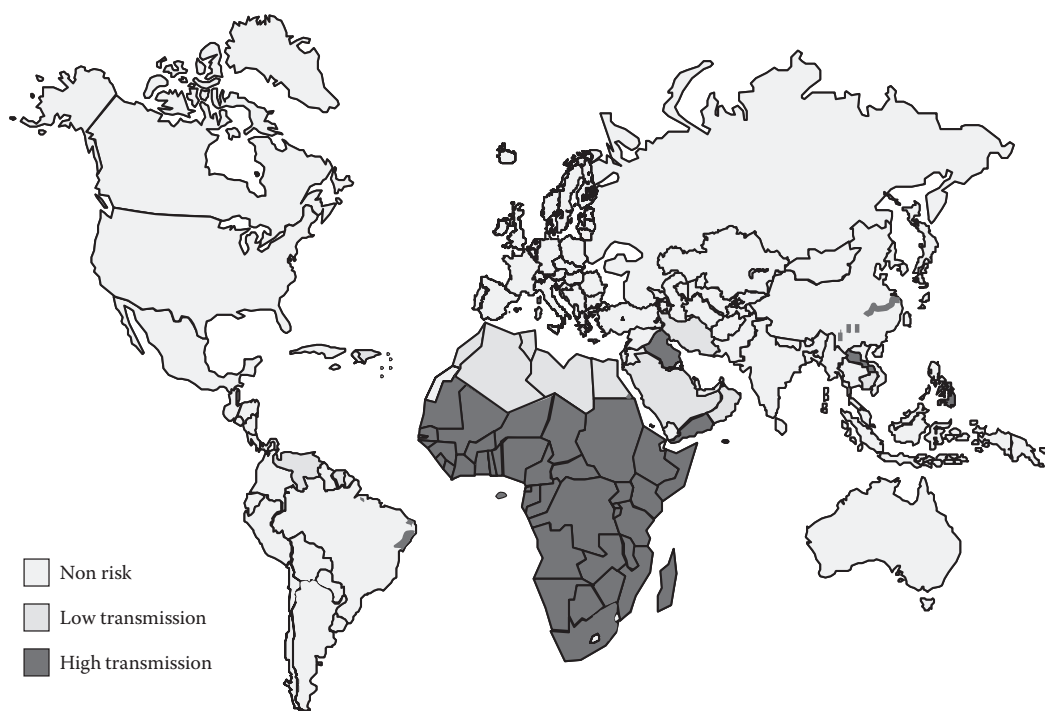
the molecules that are related to host–parasite interaction. These molecules are accessible to effector mechanisms of the host’s immune system and may therefore be of great interest as the main targets for developing drugs and effective vaccines against these organisms. Three different large groups of proteins are the following: (i) Parasite surface proteins: nutrient transport proteins, enzymatic activity proteins, or receptors for host ligands. (ii) Host surface proteins: schistosomes acquire host’s molecules in order to evade immune response. Major histocompatibility complex (MHC), low-density lipoproteins (LDL), C3 complement, and antibodies as molecules adhering to the parasite surface have been identified [17,18]. (iii) Secretion excretion proteins: proteins with a strong immunomodulatory character like proteases involved in the penetration of the parasite into the skin [19,20] or molecules involved in the granulomatous response produced by schistosomes eggs in tissues have been described [21].

## 41.1.2 EPIDEMIOLOGY OF SCHISTOSOMIASIS

### 41.1.2.1 Geographical Distribution and Current Status of Infection

The WHO announced in October 2001 that the epidemiology of schistosomiasis estimate should be recalculated. The data regarding this disease show 779 million people in 76 countries endemic for schistosomiasis. The geographical areas affected by the different species of human schistosomes are shown Figure 41.2. Furthermore, 250 million people are infected (80% in sub-Saharan Africa), 120 million have symptoms, and 20 million have severe disease and there is an annual mortality of 280,000. Some authors report the significant impact of the morbidity caused by schistosomiasis

Q5



**Q6** FIGURE 41.2 Geographical distribution of schistosomiasis (WHO 2007).

reflected in the loss of 1.53 million disability-adjusted life years [22].

There are a number of conditions necessary for an adequate transmission. The first is the water contamination with viable eggs deposited by the definitive host (humans or pets in the case of *S. japonicum*). The second is the conditions for the development of the intermediate hosts (snails). The snails are resistant to drought, climate change, and pollution. The construction of dams like Diama in Senegal, Akosombo in Ghana, and Three Gorges of the Yangtze River in China have allowed the dispersion of the snails and the risk of infection. Finally, the exposure of humans to cercariae-infected water bodies facilitates infection. Thus, children who are in contact with infected waters are most susceptible to contract the disease. In adults, people performing daily activities like washing clothes and utensils, farm workers, and fishermen are the populations most vulnerable to acquiring the infection. We must be aware that the transmission of schistosomiasis is local. Different levels of infection in various areas of the lake or between neighboring towns have been described [1].

#### 41.1.2.2 Immigrants and Travelers

The absence of autochthonous cases of schistosomiasis in nontropical regions has caused it to be denominated as an “exotic disease.” The rise of international tourism, increased migration, and international cooperation programs have led to an increase in schistosomiasis. The groups of patients diagnosed in developed countries belong to the following: (i) Travelers to rural areas and perirural endemic areas, especially those tourists practising “off track” adventure [23].

The database GeoSentinel considers schistosomiasis as a cause of disease in 4% of travelers returning from sub-Saharan Africa [24]. The highest prevalences in travelers from sub-Saharan Africa were detected by serology [25]. A study in Lake Malawi determined that travelers who have bathed for 10 days had an estimated 90% possibility of acquiring the disease [25]. Recently, an outbreak of schistosomiasis has been detected in travelers who were on a safari in Tanzania and had bathed in a natural lake near a luxury hotel [26]. (ii) Expatriates and immigrants from endemic countries [27]. In a study conducted in 788 sub-Saharan immigrants who had absolute eosinophilia, schistosomiasis was diagnosed in 17% of cases [25] and it was the first cause described in sub-Saharan immigrants who had relative eosinophilia [28].

#### 41.1.3 PATHOGENESIS OF HUMAN SCHISTOSOMIASIS: IMMUNE AND GENETIC ASPECTS

The host’s immune mechanisms involved in schistosomiasis are essential to the knowledge of this complex illness. The pathogenesis of schistosomiasis is developed in the context of host–parasite relationship where the development of severe disease is limited by the transmission of the parasite. The severe form of schistosomiasis is normally caused by excessive immune and inflammatory responses, although other factors, such as the intensity of the infection, nutritional status, or genetic background of the patients, may influence the severity of this complex illness. Two distinct phases can be differentiated in schistosomiasis infection: acute phase and chronic phase.



#### 41.1.3.1 Acute Phase

The penetration of cercariae percutaneously is a complex process that requires the presence of chemical stimuli from the host and the release of proteases secreted by the cercariae that allow the digestion of structural proteins. The major component of these proteases is a serine protease of 30 kDa whose elastase activity degrades elastine in the skin, leading to the penetration of cercariae. Other excretory/secretory molecules (ES) are able to degrade other macromolecules present in the skin of the host, such as keratin, fibronectin, laminin, or collagen. Several studies of animal models show that cercariae ES products induce edema and neutrophil infiltration in the skin. However, this inflammatory reaction does not induce protective immunity in the host and favors the survival of the parasite. The initial interaction between cercariae ES products and *pattern recognition receptors* (PRRS) of the innate immune system is crucial in determining the type of adaptive immune response [29]. Toll-like receptors (TLRs) are the best characterized PRRs since they play a central role in the induction of inflammatory response against microbial infections [30]. In humans, 10 functional members have been identified (TLR1–TLR10). Depending on which TLRs are stimulated and the interactions that occur between them, different cellular responses [31] can be generated. There is considerable evidence that TLRs are involved in the recognition of *Schistosoma* antigens. Few *in vitro* studies have been carried out with thioglycollate-elicited peritoneal macrophages stimulated with cercarial ES products suggesting that the cytokine production of IL-6 and IL-12p40 is TLR-mediated signaling. However, it has also been demonstrated that other receptors are involved in the expression of these cytokines [32]. Furthermore, other ligands, particularly glycans, may interact simultaneously with other PRRs such as C-type lectins (C-TLs) or mannose receptors (MR) modulating the TLR activation [33]. During 4–6 weeks postinfection, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) induce the generation of high levels of proinflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL-1, and IL-6 [34]. Moreover, there is an increased production of  $\gamma$ IFN with a peak at 16 weeks postinfection [35]. This cytokine profile reflects a dominant *T helper 1* response that is characteristic of the acute phase of schistosomiasis.

#### 41.1.3.2 Chronic Phase

The chronic phase begins with the oviposition at 8 weeks after infection. Although the majority of eggs are shed in urine or feces, a significant number are retained in the tissues causing a granulomatous response. The innate and adaptive immune system deals with antigens secreted by *Schistosoma* eggs. Molecules of eggs have been extensively studied by proteomic tools; so far, 188 proteins have been described, some of them have been implicated in cell signaling, redox balance, and energy production [21]. Deposition of schistosome eggs on the tissues is a stimulus to the influx of immune cells that leads to the development of a granulomatous reaction. It is clear that this immunological reaction protects the host and neutralizes the schistosome egg antigens and consequently it destroys the *Schistosoma* eggs. However, the granulomas

are the most important pathogenic event in schistosomiasis since the deposition of collagen and the development of fibrosis cause the fibro-obstructive disease. The innate immune system again plays a key role in the initiation and development of immune response against the chronic phase of schistosomiasis. Several studies have examined the interaction between schistosome-soluble egg antigens (SEA) and TLR. Specifically, TLR-2 appears to regulate the activation of dendritic cells (DC) stimulating IL-10 production [36]. The progressive increase of IL-10 induces the suppression of *Th1* cytokines and consequently it facilitates the *switch* from *Th1* to *Th2* profile, an immune response characteristic of the chronic phase [37]. It is widely accepted that the development of granulomatous response is correlated with delayed-type hypersensitivity. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes regulate the host's adaptive immune response in an environment for fibrogenesis and gene expression patterns associated with healing [38]. Studies performed in IL-4<sup>-/-</sup> mice infected with *S. mansoni* demonstrate that IL-4 has a direct implication in *Th2* response regulation. Also, IL-4 has a central role in the size of granuloma lesion [39,40]. Moreover, IL-4 stimulates IL-5 and IL-13, whose role in the development of severe liver fibrosis has been demonstrated in animal models and humans [40–42]. The *Th2* response induces alternative activation of macrophages with collagen synthesis by the L-arginine pathway [43]. Moreover, IL-2 and IL-5 stimulate the eosinophil recruitment, a great source of IL-13 whose fibrogenic activity has already been discussed above [44].

Severe schistosomiasis was classically associated with a *Th1* biased immune response characterized by an increase in the levels of proinflammatory cytokines. It has been demonstrated that both IL-12 and  $\gamma$ IFN play a central role in this kind of immune response [45]. However, the recent description of *T-helper-17* response has brought a novel insight to the investigation of the schistosomiasis pathogenesis. *In vivo* studies have demonstrated that IL-23 and IL-17 (majority cytokines of *T-helper-17* immune response) are involved in developing severe schistosomiasis [46,47]. It is accepted that a sustained *Th2* response appears to protect against severe schistosomiasis. However, prolonged polarization of the immune response toward a *Th2* response contributes to the maintenance of schistosomiasis morbidity [48]. Consequently, the regulation of *Th1/Th2* and *Th17* response is essential to prevent the schistosomiasis malignancies. Finally, schistosomiasis occurs in endemic areas with a high prevalence of malaria, hepatitis C or B, or HIV infection modifying the immune response against *Schistosoma* spp.

#### 41.1.3.3 Susceptibility and Resistance to Schistosomiasis

Schistosomiasis is a multifactorial illness with a strong genetic component influenced by socioeconomic, environmental, and ecological factors. Nevertheless, epidemiological genetic studies have identified genetic regions involved in the degree of susceptibility/resistance in individual infection as well as in the degree of hepatic fibrosis. The methodology undertaken to carry out these studies was segregation analysis.

Q7

Using 20 Brazilians, Marquet et al. obtained results consistent with the existence of a codominant major gene referred to as *SM1* that controls human susceptibility/resistance to infection by *S. mansoni*. This locus (*SM1*) was mapped on the chromosome region *5q31–q33* and included several interesting genes that encode IL-4, IL-5, and IL-13 [49]. Specifically, two single-nucleotide polymorphisms in the encoding region of IL-5 have been associated with the development of symptomatic infections of *S. japonicum* in the Chinese population [50]. Another study performed by Dessein et al. suggested that liver fibrosis schistosomiasis level is controlled by *SM2* (*6q22–q23*) [51]. This locus contains genes encoding the  $2\alpha$  chain receptor of  $\gamma$ IFN (*IFNGR-1*). Therefore, the polymorphism on the *IFNGR-1* may determine the severity of liver disease produced by *S. mansoni*. Subsequent studies conducted in an Egyptian population confirmed the association between severe schistosomiasis and *IFNGR-1* locus [52]. Furthermore,  $\gamma$ IFN production by PBMCs stimulated with egg antigen is associated with protection from severe schistosomiasis [53]. Two polymorphisms in *IFNG* linked to advanced hepatic disease [54] have been described. This is consistent with the antifibrogenic role of  $\gamma$ IFN. Both  $\gamma$ IFN and IL-10 protect against fibrosis development; however, the expression of these molecules is controlled by different gene regions [55].

#### 41.1.4 CLINICAL DISEASE

Clinical schistosomiasis can be divided into three different stages: cercarial dermatitis or swimmer's itch, acute Katayama syndrome, and chronic schistosomiasis. Moreover, we will review two specific clinical situations: the association between schistosomiasis and cancer and the interaction between schistosomiasis and other bacterial and viral infections.

##### 41.1.4.1 Cercarial Dermatitis

Cercarial dermatitis is characterized by the development of pruritus in the first 24 h after the penetration of cercariae through the skin. Skin lesions are very common in people infected by avian schistosomiasis. This is due to the immunological reaction provoked by the death of the cercariae in the skin. It occurs between 7% and 36% of infected patients [56]. It is more observed in travelers and is unnoticed in persons resident in endemic areas.

##### 41.1.4.2 Katayama Fever

“Katayama syndrome” or “acute schistosomiasis” occurs between 2 and 8 weeks after exposure and is due to the immune response triggered against the migration phase of the schistosomules and the start of egg laying by adult worms. The most characteristic signs or symptoms of the disease are fever, cutaneous lesions (rash, urticaria), pulmonary symptoms (cough, dyspnea), and eosinophilia [57]. In general, it is autolimited, although on some occasions the symptoms can persist for more than 10 weeks, presenting diarrhea, weight loss, abdominal pain, hepatosplenomegaly, and so on

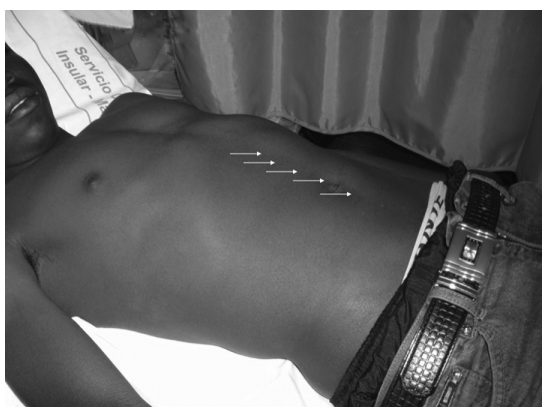
(Swartz, 2009). Katayama fever is a clinical syndrome often seen in nonimmune individuals (tourists, immigrants). **Q8**

##### 41.1.4.3 Chronic Schistosomiasis

It appears months or years after the infection and is due to the granulomatous reaction formed around eggs trapped in the liver, spleen, intestine, and other locations, such as the lungs and nervous system. It appears with greater frequency in persons resident in areas of endemic schistosomiasis. The principal clinical symptoms can be ordered into three groups: (i) *Habitual symptoms*: The principal data that indicate the possibility of a chronic schistosomiasis are the presence of eosinophilia and microhematuria (in the infections caused by *S. haematobium*). (ii) *Frequent classical symptoms*: The most typical are urinary, hepatosplenic, and intestinal. The urinary symptoms are mainly produced by the localization of *S. haematobium* in the venous plexus of the urinary tract. They occur clinically with an irritative mictional syndrome with dysuria, urinary frequency, proteinuria, and especially terminal hematuria. Later stages of the disease can provoke thickening of the wall of the bladder, polyps, or vesical masses. Bacterial infections can occasionally be associated. If the disease progresses, it can provoke fibrosis and calcification of the ureters and bladder (Figure 41.3), producing hydronephrosis and hydro-nephrosis. If the parenchyma is affected, it can produce renal failure. The *hepatosplenic* symptoms are produced when the eggs of *Schistosoma* (fundamentally *S. mansoni*, *S. japonicum*, and *S. mekongi*) localized in the mesenteric veins reach the portal venous circulation, causing a gradual occlusion of the intrahepatic veins, which can cause Symers' fibrosis. This gives rise to a portal hypertension with ascites, splenomegaly (Figure 41.4), development of esophageal varicose veins with high digestive bleeding, and encephalopathy. Transaminases and bilirubin are at normal values except for the existence of coinfection with HVB or HVC [58]. The *intestinal* symptoms are produced when the eggs reach the intestine producing hyperplasia, ulceration, microabscesses, and polyposis. The infections by *S. intercalatum* are frequently associated with



**FIGURE 41.3** Bladder calcification in urinary schistosomiasis (Plain abdominal x-ray). Courtesy of Dr. Perez-Arellano (Hospital Insular Ias Palmas de Gran Canaria, Spain).



**FIGURE 41.4** Splenomegaly in *Schistosoma mansoni* infection. Courtesy of Dr. Perez-Arellano (Hospital Insular Ias Palmas de Gran Canaria, Spain).

intestinal lesions. Clinically, it presents abdominal pain and inflammatory-type diarrhea with or without blood [59]. It can be complicated, producing an enteropathy losing proteins, an occlusive or subocclusive symptomology, anal prolapse, or even anorectal fistulas. All this requires a differential diagnosis with the intestinal inflammatory disease. (iii) *Infrequent classical symptoms*: These are also denominated ectopic schistosomiasis. The most frequent are cardiopulmonary, renal, genital, and those affecting the central nervous system. The *cardiopulmonary* symptoms are produced as a consequence of the eggs leaving the vesical veins (in the case of *S. haematobium*) or from the portal circulation through the portocava *shunt*. As a consequence of the localization of the eggs in the pulmonary circulation, fibrosis of the pulmonary arteries is produced, pulmonary hypertension being presented with right cardiac insufficiency [60]. Schistosomiasis can provoke lesions at the parenchymatous *renal* level, specifically affecting the glomerulus, causing glomerulonephritis [61]. In general, the glomerulonephritis is associated with the existence of hepatosplenic schistosomiasis with porto-systemic *shunt*. The most frequent type is the mesangial glomerulonephritis which is usually presented with a discreet proteinuria and microhematuria. The lesions at the *genital* level are of two types: inflammatory in relation to viable eggs and fibrous and hypertrophic in relation to nonviable or calcified eggs. In women, it affects the vulva, vagina, and neck of the uterus. They are not painful but in the case of ulcerating, fistulizing, or overinfection, they can produce dyspareunia and leucorrea [62]. In men, the most frequent are chronic prostatitis and the infection of the seminal vesicles. The most habitual symptomology is the alteration in ejaculation and hematospermia [23]. The two most typical symptoms of *neuroschistosomiasis* are medullar and cerebral syndromes. The localization of the eggs of *Schistosoma* spp. in cerebral territory can make their debut as a comicial crisis and usually progress to a cerebral focal encephalitis [63]. The medullar localization of the eggs of schistosomes is more frequent than the encephalic and can produce various forms of myelitis, the most characteristic being granulomatous myelitis,

myeloradiculitis, and ischemic or vascular myelitis, the most frequent being transverse myelitis [64]. The patients sometimes present a neurogenic bladder associated with a sensitive motor level with weakness in the legs, incapacity for walking, lumbar pain, and paresthesias.

#### 41.1.4.4 Association with Carcinogenesis

It has been demonstrated how chronic cystitis produced by *S. haematobium* behaves like precancerous lesions that in time degenerate into urinary bladder tumor [65]. This association has not been demonstrated with other species of schistosomes in relation with colon tumors or hepatocarcinomas.

#### 41.1.4.5 Interaction with Other Infections

Patients with schistosomiasis present greater indices of chronic carriers of the Australia antigen of the virus of hepatitis B and antibodies against the virus of hepatitis C. It is thought that the campaigns of parenteral massive treatment in some countries, such as Egypt, contributed to the transmission of the infection of the virus of hepatitis C [66]. The coinfection of schistosomiasis and chronic infection by virus of hepatitis B and C is presented with an earlier and more intense fibrosis than in individuals who are not coinfecting [67].

The HIV infection, on inducing an important deterioration of the cellular immunity, appears to condition an alteration in the migration of the eggs through the wall of the intestine. This leads to the decrease in the number of eggs in feces. This fact has not been demonstrated to imply a greater seriousness of the infection or a worse response to the treatment. It has been demonstrated that the HIV infection increases the susceptibility of reinfection in exposed patients previously treated with praziquantel [68]. In addition, chronic hyperstimulation of the immune response produced by the schistosomiasis can favor the pathogenesis of the infection by HIV. It is believed that the lesions of genital schistosomiasis can alter the mucocutaneous barrier favoring the transmission of sexually transmitted diseases, among which HIV infection is outstanding [62].

Finally, the association between piogenic hepatic abscesses of *Staphylococcus aureus* and the infection by *Schistosoma* [69] has been described, as have septicemias caused by enterobacteria and chronic intestinal schistosomiasis [70].

### 41.1.5 DIAGNOSIS

The diagnosis of human schistosomiasis is based on clinical and epidemiological data. Nonetheless, these data are normally insufficient for an unequivocal diagnosis of this parasitosis. Therefore, distinct diagnostic techniques are employed, included as methods of conventional diagnosis and techniques of molecular diagnosis.

#### 41.1.5.1 Conventional Techniques

This includes techniques of direct parasitological detection and techniques of detection of antigens or antibodies (immunological methods).



#### 41.1.5.1.1 Parasitological Techniques

The parasitological diagnosis by the examination of samples of feces or urine is the most utilized method for the diagnosis of schistosomiasis, since it allows the identification of the different species of schistosomes, visualizing their characteristic morphology (Table 41.1). Moreover, this diagnosis allows the evaluation of the intensity of the infection. The technique utilized for the detection of *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, and *S. mekongi* is the examination of feces by the Kato-Katz [71] technique, microscopically examining a fresh sample of 50 mg of feces, allowing the detection as positive of samples with a minimum of 20 eggs/g of feces. Furthermore, techniques of concentration (formol/ethyl acetate) can be used if the observation of the fresh sample gives negative results. If it is suspected that the patient presents a low number of worms, the eclosion test can be used, incubating the feces until the miracidia hatch from the eggs. The miracidia migrate toward a light source which must be applied to the sample. The infection by *S. haematobium* is not usually diagnosed in unconcentrated samples; therefore, methods of filtration or sedimentation of urine are employed [72].

The search for eggs of schistosomes represents a method of specific diagnosis with low cost and simplicity of performance, able to be used in laboratories with precarious structures and less trained personnel. These characteristics make this method applicable in field studies in endemic areas. Nonetheless, it presents serious inconveniences with regard to its sensitivity, especially when the intensity of the infection is low, as occurs in areas of low prevalence or in individuals with recent infections [73]. Moreover, it can only be carried out after the production and elimination of eggs, which begins at 2 months of infection. In areas of low transmission, where the sensitivity obtained by classical methods is low, the COPT (circumoval precipitation test) technique, described by Oliver-González in 1954 [74], is used. This consists of incubating eggs of *S. mansoni* with sera of patients, and considered positive if there is more than 9% of precipitation around the mature eggs [5].

#### 41.1.5.1.2 Immunological Techniques

The detection of the anodic and cathodic *circulating antigens* (CAA and CCA) is the most utilized method in direct immunological diagnosis [75]. These antigens are glycoconjugated and derive from adult worms. Both can be detected in blood and urine and the CCA in maternal milk, allowing the diagnosis of *S. mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*. Nevertheless, they are shared by the named species and thus only permit diagnosis at the level of genus, although they present few cross-reactions with other parasites. Recently, a test to detect CCA in urine using strips of nitrocellulose (*dipstick*) has been commercialized. The sensitivity of this test has been low [76].

The infection by schistosomes is highly immunogenic and it is not difficult to demonstrate the *presence of antibodies* antischistosome in the infected subjects [77]. Numerous methods have been described, the most utilized

being ELISA. Total extracts of adult worms and eggs (better than larval antigens), purified fractions of these extracts, or recombinant proteins have been assayed. The use of antigens of adult worms (the easiest to obtain), even from other schistosomes, such as *S. bovis*, have permitted the diagnosis of human infections with *S. mansoni*, *S. haematobium*, and *S. intercalatum* in sub-Saharan immigrants [25]. In addition, this test has been used to confirm the diagnosis of patients with Katayama fever [78]. Recently, a test denominated SEA-ELISA, in which soluble antigens of egg are used, has been commercialized. A study carried in 150 children in Zanzibar showed a sensitivity of 89% and a specificity of 70% [76]. The alternative for reducing cross-reactivity is, on the one hand, to eliminate the carbohydrates responsible [5] and, on the other, to isolate and purify more specific molecules. Thus, different preparations have been used from adult worms and microsomal extracts, polysaccharides associated with intestine, alkaline phosphatase, heat shock proteins, and Sm31 and Sm32 adult antigens, obtaining different results. Purified antigens of eggs, such as the antigens  $\omega$ -1,  $\alpha$ -1, and  $\kappa$ -5, have also been used. Recombinant antigens from adult worms, such as RP26 [79], or from eggs, such as CEF6, have still not solved the problem.

In conclusion, the methods of immunodiagnosis, both direct and indirect, present greater sensitivity than the techniques used for direct parasitological diagnosis. Nonetheless, immunodiagnosis continues to present a series of problems related to the obtaining of antigens—often complex—and the appearance of false positives and false negatives. Moreover, immunological detection of schistosomiasis is habitually delayed until the appearance of the corresponding antigens or antibodies, constituting a limited option for diagnosis in the acute phase of the disease. Finally, the persistence of antigens and especially of antibodies after efficient therapy frequently causes the detection of “false positives” corresponding to patients who have already eliminated the parasite.

#### 41.1.5.2 Molecular Techniques

The technique of PCR has been little used in the diagnosis of human schistosomiasis, having been used principally for phylogenetic studies and for the detection of the parasite in contaminated waters or in its intermediary host [80]. The first PCR described for human diagnosis is due to the amplification of *S. mansoni* in human samples—serum and feces—of patients infected with this parasite [81,82]. These authors obtain an amplicon of 121 base pair (bp) using DNA of *S. mansoni*. This reaction is capable of detecting up to 1 fg of parasite DNA. This product is not detected from *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Taenia solium*, and *Trichuris trichura* DNA extracts. However, these authors do not test the specificity of this reaction with DNA of other species of *Schistosoma* or of other parasites potentially present in the same ecological niche as *S. mansoni* (e.g., *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi*, etc.). In the application of the technique to feces of donors from an endemic area for *S. mansoni*, the authors detect a number of samples positive in PCR and negative in the direct parasitological

diagnosis—Kato-Katz—and the inverse [83]. The first are attributed to patients with slight infection, yielding a negative diagnosis on examining the feces, but positive on employing a more sensitive technique, such as PCR. The false negatives are attributed either to the presence of inhibitors in particular samples or, more probably, to the fact that a portion of feces in which the eggs of the parasite can be absent is utilized.

Later, Sandoval et al. [84], using samples of urine from patients infected with different species of schistosomes, amplified a fragment of 877 pb genus-specific and one of 350 pb specific to *S. mansoni*. This reaction is capable of detecting up to 0.98 pg of parasite DNA, presenting a sensitivity of 94% with the genus-specific amplification and 100% when the fragment specific to *S. mansoni* were amplified. The specificity was also evaluated using sera diagnosed with different protozooses and helminthoses, obtaining a specificity of 99% genus-specific and 98% species-specific. Furthermore, in a controlled experiment carried out on mice infected with *S. mansoni* and comparing it with the Kato-Katz technique and detection of specific antibodies, these authors observe that parasite DNA can be amplified from the first week postinfection [85].

In recent years, rapid, simple tests are being developed based on oligochromatographics and real-time PCR techniques. *Oligochromatographic dipstick test* can be carried out in 10 min and can detect 10 fg of genomic DNA [86]. This method can be successfully applied in endemic areas in the subsequent years. Real-time PCR [87] has been developed from large volumes of plasma (10 mL) and has advantages of its validity in chronic schistosomiasis and in Katayama fever, in spite of the fact that the human samples utilized, up to the present, are scarce. It is difficult to apply in endemic areas due to its high cost. Nevertheless, it can be useful for the diagnosis of schistosomiasis imported into industrialized countries.

#### 41.1.6 TREATMENT, CHEMOPROPHYLAXIS, AND PREVENTION

Praziquantel is the choice drug for the treatment of schistosomiasis, since oxamniquin (active against *S. mansoni*) and metrifonate (active against *S. haematobium*) are not commercially available at present [88]. Praziquantel is administered orally and is little toxic, and has very low cost. However, it does not prevent reinfection and for its administration, it is necessary to take into account the phase of the disease and the species responsible [89]. In the acute phase, praziquantel is highly efficient for adult worms, being less so in schistosomes. Praziquantel 20 mg/kg every 12 h together with dexametasone 20 mg/day for 3 days is the treatment of choice in this phase. It is necessary to repeat the dose of praziquantel at 3–4 weeks. In the chronic phase, the dose of praziquantel depends on the species involved. For infections by *S. mansoni* and *S. haematobium*, the recommended dose is 20 mg/kg every 12 h for 1 day. In the case of *S. japonicum*, 20 mg/kg every 8 h for 1 day is recommended.

The fact that the schistosomiasis treatment is limited to one single pharmaceutical presents the risk associated with the appearance of resistances. The WHO has recognized the

necessity of identifying new compounds as alternatives to praziquantel. In the last decade, only the derivatives of artemisine have appeared as a complement to the therapy against schistosomiasis. The use of these derivatives in combination with praziquantel can be a good strategy of control, since the derivatives of artemisine are effective against the juvenile phases of the parasite [88]. In addition, the activity of the derivatives of artemisine as chemotherapy has been demonstrated in numerous clinical assays [90]. Mefloquine has also been used against schistosomiasis, with good results in experimental models [91]. However, the use of these antimalarial drugs in the treatment and/or control of this disease could lead to the appearance of malaria resistant to these compounds.

Schistosomiasis can be eliminated by behavioral changes, sanitation, and safe water supply. Health educational programs can improve knowledge about schistosomiasis, avoiding contact with contaminated water. In schistosomiasis caused by *S. japonicum*, interventions on the animal reservoir are necessary. Molluscicides are toxic chemicals and are expensive. *Preventive treatment* has permitted the decrease in prevalence in certain zones. However, it has not been possible to eradicate the disease and, furthermore, they have generated resistances to praziquantel. Up to the present no effective human vaccine has been developed. Some authors indicate that the proteins of membrane expressed in the surface of the schistosomes or adult worms as key targets for the development of vaccines [92]. The sequencing of the genome of *S. mansoni* [8] and *S. japonicum* [9] will help to identify new candidates for vaccines, determined important advances toward the control and eradication of schistosomiasis.

## 41.2 METHODS

### 41.2.1 SAMPLE PREPARATION

#### 41.2.1.1 DNA Extraction from *Schistosoma* sp.

Adult schistosomes are collected by intracardiac perfusion of mice infected with cercariae. Adult worms are obtained by flowing out the portal vein. The parasites are washed in distilled water three times and they are cut into small pieces and homogenized.

DNA extraction is performed using NucleoSpin Tissue kit (MacheryNagel, Germany), using the manufacturer's instructions as follows:

1. Add 180  $\mu$ L buffer T1 and 25  $\mu$ L proteinase K solution. Vortex to mix for 20 s. Make sure that the samples are completely covered with the lysis solution.
2. Incubate at 56°C until complete lysis is obtained (from 1 h to overnight). Vortex occasionally during incubation.
3. Add 200  $\mu$ L buffer B3, vortex vigorously, and incubate at 70°C for 10 min. Vortex briefly. If insoluble particles are visible, centrifuge for 5 min at 11,000 $\times$  g and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube.

Q10

4. Add 210  $\mu\text{L}$  ethanol 96% to the sample and vortex vigorously.
5. For each sample, place one column into a collection tube. Apply the sample to the column. Centrifuge for 1 min at  $11,000\times g$ . Discard the flow-through and place the column back into the collection tube. If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step at  $11,000\times g$ . Discard flow-through.
6. Add 500  $\mu\text{L}$  buffer BW. Centrifuge for 1 min at  $11,000\times g$ . Discard flow-through and place the column back into the collection tube.
7. Add 600  $\mu\text{L}$  buffer B5 to the column and centrifuge for 1 min at  $11,000\times g$ . Discard flow-through and place the column back into the collection tube.
8. Centrifuge the column for 1 min at  $11,000\times g$ .
9. Place the column into a new microcentrifuge tube and add 35  $\mu\text{L}$  prewarmed buffer BE ( $70^\circ\text{C}$ ). Incubate at room temperature for 3 min.
10. Centrifuge for 1 min at  $11,000\times g$ .
11. Repeat steps (8) and (9). DNA is obtained at 70  $\mu\text{L}$  final volume.

#### 41.2.1.2 DNA Extraction from Urine Samples

DNA extraction from human urine (3 mL each) was performed with the NucleoSpin Trace kit (MacheryNagel, Germany), using the manufacturer's instructions:

1. Boil the urine samples for 5 min. Centrifuge for 5 min at  $11,000\times g$ .
2. Place the sample in a 15 mL centrifuge tube and add 4 mL lysis buffer FLB.
3. Add 50  $\mu\text{L}$  proteinase K stock solution, mix by vortexing, and incubate at  $56^\circ\text{C}$  in a shaking water bath until complete lysis is obtained (1–3 h or overnight). Afterward, any insoluble particles remaining in the sample have to be removed by centrifugation for 10 min at  $5000\times g$ .
4. Add 3.5 mL ethanol (96%) to 4 mL cleared FLB-lysate and vortex the mixture.
5. Pipette the mixture onto the column. Centrifuge for 3 min at  $3,000\times g$ . Discard flow-through.
6. Add 2.5 mL buffer BW to the column. Centrifuge for 3 min at  $3000\times g$ . Discard flow-through.
7. Add 5 mL buffer B5 to the column. Centrifuge for 3 min at  $3000\times g$ . Discard flow-through.
8. Repeat step (6) once more.
9. Centrifuge additional 10 min at  $3000\times g$  in order to remove buffer B5 completely.
10. Attach the supplied elution tube with adaptor to the column. Add 35  $\mu\text{L}$  elution buffer BE preheated to  $70^\circ\text{C}$  and incubate for 2 min at room temperature.
11. Centrifuge for 3 min at  $3000\times g$  to collect the nucleic acid-containing fraction.
12. Repeat steps (9) and (10) once more.
13. Remove the elution tube containing the nucleic acids and keep it for further use.

Q11

## 41.2.2 DETECTION PROCEDURES

### 41.2.2.1 PCR Approach for Genus- and *S. mansoni*-Specific Amplification from Urine Samples

Q12

#### 41.2.2.1.1 Principle

We present a sensitive and specific PCR-based approach for the amplification of defined regions from 28S ribosomal DNA of schistosome species. We use two primer pairs to amplify 28S rDNA: CF1/CR2 and CF2/CR2 giving genus-specific PCR products of 877 and 1032 bp, respectively; CF1 (5'-GAGTTGAACTGCAAGCTCTGG-3'), CR2 (5'-TTCGCCCCCTATACTCACGTTAT-3'), CF2 (5'-GTTTGTGAATGCAGCCCCAAAGT-3'). Specific primers for the amplification of the 28S rDNA region from *S. mansoni*: SmF/SmR giving species-specific PCR products of 350 bp; SmF (5'-GAGATCAAGTGTGACAGTTTTGC-3'), SmR (5'-ACAGTGC GCGCGTCGTAAGC-3').

#### 41.2.2.1.1.2 Procedure

1. PCR reactions were carried out in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  with 2  $\mu\text{L}$  of  $10\times$  reaction buffer, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 U *Taq* DNA polymerase, 2 mM of each primer, 0.5 mM dNTPs, and 1  $\mu\text{L}$  of template DNA, either from schistosome DNA or from DNA extracted from human urine samples.
2. PCR was performed in 35 cycles, each consisting of  $94^\circ\text{C}$  for 20 s,  $65^\circ\text{C}$  for 20 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 30 s.
3. Corresponding PCR products were electrophoresed, together with the molecular weight markers in 1% agarose in Tris-borate EDTA gels with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide, and visualized in a UV transilluminator.

## 41.3 CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVE

Schistosomiasis is a tropical helminth disease due to a different schistosome species. 779 million people in 76 countries that are endemic could be infected. Furthermore, 250 million people are infected (80% in sub-Saharan Africa), 120 million have symptoms, and 20 million have severe disease and there is annual mortality of 280,000 with 1.53 million disability-adjusted life years. Moreover, schistosomiasis have been detected in *Schistosoma*-free areas, mainly due to the increase in off-track tourism, the spread of schistosomiasis in previously nonendemic areas, and the recent waves of immigrants from endemic countries. Cercariae penetration and migration of the schistomulæ occurs generally 2–6 weeks after the exposure and combines fever, urticarial rash, pulmonary symptoms, and eosinophilia. This clinical outcome should be considered as suggestive for acute schistosomiasis or Katayama fever. In chronic stages of the infection, fibrosis and calcification of tissue trapped ova in the lower urinary tract, and liver and intestine lead several signs and symptoms, depending on the parasite load. Diagnosis of schistosomiasis is performed through the direct detection of parasite eggs in stool and urine. Immunological methods are usually applied to patients with schistosomiasis clinical signs

Q13



when parasites cannot be directly detected. Nevertheless, both the above-mentioned diagnostic techniques present false-negative and false-positive results, especially in low parasite burden and acute phase of schistosomiasis. In the last few years, PCR-based diagnosis has been used. PCR amplifying an *S. mansoni*-specific DNA fragment has been applied to stool and serum from South American schistosomiasis patients. Recently, we have developed a new PCR approach allowing the amplification of both genus- and species-specific schistosome DNA in easy-to-handle human urine sample. Moreover, simple tests are being developed based on oligochromatographics and real-time PCR techniques. Praziquantel is the choice drug for the treatment of schistosomiasis, since oxamniquin and metrifonate are not commercially available. Praziquantel is administered orally, is little toxic, and has very low cost. The fact that schistosomiasis treatment is limited to one single pharmaceutical presents the risk associated with the appearance of resistances. In the last decade, only the derivatives of artemisine have appeared as a complement to the therapy against schistosomiasis. Actually, no effective human vaccine is available but the sequencing of the genome of *S. mansoni* and *S. japonicum* will help to identify new candidates for vaccines in the future.

## REFERENCES

1. Vester, U. et al. Urinary tract morbidity due to *Schistosoma haematobium* infection in Mali. *Kidney Int.* 52, 478–481, 1997.
2. Cox, F.E. History of human parasitic diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 18, 171–188, table of contents, 2004.
3. Ohmae, H. et al. Schistosomiasis mekongi: From discovery to control. *Parasitol. Int.* 53, 135–142, 2004.
4. Webster, B.L., Southgate, V.R., and Littlewood, D.T. A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *Int. J. Parasitol.* 36, 947–955, 2006.
5. Alarcón de Noya, B.a.N.O. Schistosomiasis. In: *Parasitología Médica*. México, 2008.
6. Rollinson, D., and Southgate, V.R. The biology of schistosomes. From genes to latrines. In: Rollinson, D., and Simpson, A.J.G. (eds), Academic Press Ltd, London, 1987.
7. Morgan, J.A. et al. A newly-identified lineage of *Schistosoma*. *Int. J. Parasitol.* 33, 977–985, 2003.
8. Berriman, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460, 352–358, 2009.
9. Liu, F. et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* 460, 345–351, 2009.
10. LoVerde, P.T. et al. *Schistosoma mansoni* genome project: An update. *Parasitol. Int.* 53, 183–92, 2004.
11. Adams, M.D. et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651–1656, 1991.
12. Verjovski-Almeida, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.* 35, 148–157, 2003.
13. Hu, W. et al. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nat. Genet.* 35, 139–147, 2003.
14. Wilkins, M.R. et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19–50, 1996.
15. Curwen, R.S. et al. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: A comparison across four life-cycle stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 57–66, 2004.
16. Cheng, G.F. et al., Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics* 5, 511–521, 2005.
17. Braschi, S., and Wilson, R.A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell Proteomics* 5, 347–356, 2006.
18. Liu, F. et al. Insight into the host-parasite interplay by proteomic study of host proteins copurified with the human parasite, *Schistosoma japonicum*. *Proteomics* 7, 450–462, 2007.
19. Guillou, F. et al. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 155, 45–56, 2007.
20. Dvorak, J. et al. Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* 90, 345–358, 2008.
21. Cass, C.L. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 155, 84–93, 2007.
22. King, C.H., Dickman, K., and Tisch, D.J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: A meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* 365, 1561–1569, 2005.
23. Corachan, M. et al. Hematospermia: A new etiology of clinical interest. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 580–584, 1994.
24. Freedman, D.O. et al. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N. Engl. J. Med.* 354, 119–130, 2006.
25. Pardo, J. et al. Utility of *Schistosoma bovis* adult worm antigens for diagnosis of human schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot techniques. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 1165–1170, 2004.
26. Leshem, E. et al. Acute schistosomiasis outbreak: Clinical features and economic impact. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1499–1506, 2008.
27. Jelinek, T., Nothdurft, H.D., and Loscher, T. Schistosomiasis in travelers and expatriates. *J. Travel. Med.* 3, 160–164, 1996.
28. Carranza-Rodriguez, C. et al. Cryptic parasite infection in recent West African immigrants with relative eosinophilia. *Clin. Infect. Dis.* 46, e48–e50, 2008.
29. Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216, 2002.
30. Akira, S. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 38105–38108, 2003.
31. Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257–263, 2004.
32. Jenkins, S.J. et al. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.* 17, 1409–1418, 2005.
33. van Kooyk, Y., Engering, A., Lekkerkerker, A.N., Ludwig, I.S., and Geijtenbeek, T.B. Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 488–493, 2004.
34. Araujo, M.I. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 26, 1399–1403, 1996.
35. Caldas, I.R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* 108, 109–117, 2008.

36. van der Kleij, D. et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277, 48122–48189, 2002.
37. Montenegro, S.M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: The cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J. Infect. Dis.* 179, 1502–1514, 1999.
38. Davies, S.J. et al. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Science* 294, 1358–1361, 2001.
39. Brunet, L.R. et al. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J. Immunol.* 159, 777–785, 1997.
40. Fallon, P.G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J. Immunol.* 164, 2585–2591, 2000.
41. Cheever, A.W. et al. Analysis of egg granuloma formation in *Schistosoma japonicum*-infected mice treated with antibodies to interleukin-5 and gamma interferon. *Infect. Immun.* 59, 4071–4074, 1991.
42. de Jesus, A.R. et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.* 72, 3391–3397, 2004.
43. Hesse, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 167, 6533–6544, 2001.
44. Rumbley, C.A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J. Immunol.* 162, 1003–1009, 1999.
45. Pardo, J. et al. Helminth-related eosinophilia in African immigrants, Gran Canaria. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1587–1589, 2006.
46. Rutitzky, L.I., Lopes da Rosa, J.R., and Stadecker, M.J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J. Immunol.* 175, 3920–3926, 2005.
47. Rutitzky, L.I. et al. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *J. Immunol.* 180, 2486–2495, 2008.
48. Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: Excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J. Immunol.* 164, 6406–6416, 2000.
49. Marquet, S. et al. Full results of the genome-wide scan which localises a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 88–97, 1999.
50. Burke, M.L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 31, 163–176, 2009.
51. Dessein, A.J. et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 709–721, 1999.
52. Blanton, R.E. et al. Schistosomal hepatic fibrosis and the interferon gamma receptor: A linkage analysis using single-nucleotide polymorphic markers. *Eur. J. Hum. Genet.* 13, 660–668, 2005.
53. Henri, S. et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J. Immunol.* 169, 929–936, 2002.
54. Chevillard, C. et al. IFN-gamma polymorphisms (IFN-gamma +2109 and IFN-gamma +3810) are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). *J. Immunol.* 171, 5596–5601, 2003.
55. Arnaud, V. et al. Regulatory role of interleukin-10 and interferon-gamma in severe hepatic central and peripheral fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. *J. Infect. Dis.* 198, 418–426, 2008.
56. Meltzer, E. et al. Schistosomiasis among travelers: New aspects of an old disease. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1696–1700, 2006.
57. Ross, A.G., Vickers, D., Olds, G.R., Shah, S.M., and McManus, D.P. Katayama syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 7, 218–224, 2007.
58. Bica, I., Hamer, D.H., and Stadecker, M.J. Hepatic schistosomiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14, 583–604, viii, 2000.
59. Gryseels, B. et al. Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106–1118, 2006.
60. Bethlem, E.P., Schettino Gde, P., and Carvalho, C.R. Pulmonary schistosomiasis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 3, 361–365, 1997.
61. Barsoum, R. The changing face of schistosomal glomerulopathy. *Kidney Int.* 66, 2472–2484, 2004.
62. Poggensee, G. et al. Female genital schistosomiasis of the lower genital tract: Prevalence and disease-associated morbidity in northern Tanzania. *J. Infect. Dis.* 181, 1210–1213, 2000.
63. Ferrari, T.C. Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 59–62, 2004.
64. Nobre, V. et al. Schistosomal myeloradiculopathy due to *Schistosoma mansoni*: Report on 23 cases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(Suppl), 137–141, 2001.
65. Yosry, A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib. Microbiol.* 13, 81–100, 2006.
66. Rao, M.R. et al. Further evidence for association of hepatitis C infection with parenteral schistosomiasis treatment in Egypt. *BMC Infect. Dis.* 2, 29, 2002.
67. Kamal, S.M. et al. Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: Relation to progression of liver fibrosis. *J. Infect. Dis.* 189, 1140–1150, 2004.
68. Karanja, D. M. et al. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: A longitudinal study. *Lancet* 360, 592–596, 2002.
69. Teixeira, R. et al. Schistosomiasis mansoni is associated with pyogenic liver abscesses in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(Suppl), 143–146, 2001.
70. Gendrel, D. et al. Nontyphoidal salmonella septicemia in Gabonese children infected with *Schistosoma intercalatum*. *Clin. Infect. Dis.* 18, 103–105, 1994.
71. Katz, N., Chaves, A., and Pellegrino, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 14, 397–400, 1972.
72. Gyorkos, T.W. et al. Efficacy of new low-cost filtration device for recovering *Schistosoma haematobium* eggs from urine. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2681–2682, 2001.
73. Berhe, N. et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 92, 205–212, 2004.

74. Oliver-Gonzalez, J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* 95, 86–91, 1954.
75. van Lieshout, L., Polderman, A.M., and Deelder, A.M. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop.* 77, 69–80, 2000.
76. Stothard, J.R. et al. An evaluation of urine-CCA strip test and fingerprick blood SEA-ELISA for detection of urinary schistosomiasis in schoolchildren in Zanzibar. *Acta Trop.* 111, 64–70, 2009.
77. Doenhoff, M.J., Chiodini, P.L., and Hamilton, J.V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: Can it be done with antibodies? *Trends Parasitol.* 20, 35–39, 2004.
78. Pardo, J. et al. Application of an ELISA test using *Schistosoma bovis* adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings. *Scand. J. Infect. Dis.* 39, 435–440, 2007.
79. Makarova, E. et al. Detection of IgG binding to *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26 is a sensitive and specific method for acute schistosomiasis diagnosis. *Parasitol. Int.* 54, 69–74, 2005.
80. Hamburger, J. et al. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: A potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 907–911, 2001.
81. Rabello, A., Pontes, L.A., and Dias-Neto, E. Recent advances in the diagnosis of *Schistosoma infection*: The detection of parasite DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(Suppl 1), 171–172, 2002.
82. Pontes, L.A., Dias-Neto, E., and Rabello, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 157–162, 2002.
83. Pontes, L.A. et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 652–656, 2003.
84. Sandoval, N. et al. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology* 133, 581–587, 2006.
85. Sandoval, N. et al. *Schistosoma mansoni*: A diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Exp. Parasitol.* 114, 84–88, 2006.
86. Akinwale, O.P. et al. Detection of schistosomes polymerase chain reaction amplified DNA by oligochromatographic dipstick. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 167–170, 2008.
87. Wichmann, D. et al. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e422, 2009.
88. Fenwick, A. et al. Drugs for the control of parasitic diseases: Current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 19, 509–515, 2003.
89. Pérez Arellano, J.L. et al. Tratamiento de las enfermedades parasitarias (II): Helmintosis y ectoparasitosis. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 31, 55, 2007.
90. Xiao, S.H. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. *Acta Trop.* 96, 153–167, 2005.
91. Keiser, J. et al. Mefloquine-an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e350, 2009.
92. McManus, D.P., and Loukas, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 225–242, 2008.

## Capítulo 2

# HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La esquistosomosis es una enfermedad multifactorial en la que el componente genético de la respuesta inmune del hospedador juega un papel principal en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, dicho componente se ve fuertemente influenciado por diversos factores socioeconómicos, ambientales, de distribución y densidad del hospedador intermediario. Los cruces experimentales de ratón suponen una buena estrategia para identificar posibles rasgos genéticos implicados en la susceptibilidad a esta infección.

Por otro lado, gran parte de las medidas de control de la esquistosomosis en países en vías de desarrollo recae sobre el uso del praziquantel como única medida eficaz para el control de esta enfermedad. El praziquantel es un fármaco seguro y eficaz que actúa sobre las formas adultas del parásito. Sin embargo, su uso masivo ha hecho que la OMS reconociera la necesidad de identificar nuevos compuestos como alternativas al praziquantel para evitar la aparición de resistencias. En la última década tan solo los derivados de la artemisina han surgido como un complemento a la terapia frente a la esquistosomosis. La utilización de estos derivados en combinación con el praziquantel puede ser una buena estrategia de control, ya que los derivados de la artemisina son efectivos contra las formas juveniles del parásito. Sin embargo, en la actualidad no existen trabajos que utilicen metodologías basadas en meta-análisis que valoren estos compuestos en la esquistosomosis. Estudios con metodología de meta-análisis están teniendo cada vez más importancia en la medicina y actualmente constituyen un tipo de estudio fundamental para evaluar nuevas terapias.

En la presente tesis doctoral se abordan ambos enfoques con la definición de tres objetivos generales que se desglosan en diferentes objetivos específicos.

## 2.1. Objetivos generales

- Objetivo 1. Identificación de *Quantitative Trait Loci* (QTLs) implicados en el proceso inflamatorio en un modelo experimental de variabilidad genética controlada.
- Objetivo 2. Estudiar la importancia del fondo genético en la susceptibilidad a la infección por *Schistosoma mansoni* en cepas de ratón singénicas
- Objetivo 3. Definir la utilidad de los derivados de la artemisina en el tratamiento y prevención de la esquistosomosis, mediante revisión sistemática y meta-análisis.

## 2.2. Objetivos específicos

**En cuanto al objetivo 1, se establecen los siguientes objetivos específicos:**

- Determinar la relación entre células leucocitarias, proliferación celular y grado de inflamación mediante análisis univariante y multivariante.
- Realizar un análisis de ligamiento para cada fenotipo relacionado con la respuesta inmune.

**Respecto al objetivo 2, se definen los siguientes objetivos específicos:**

- Estudiar la respuesta inmune de *Mus spretus* como modelo de resistencia a la infección por *S. mansoni*.
- Describir las magnitudes asociadas con la susceptibilidad a la infección por *S. mansoni* mediante el análisis de la dominancia de ambos fenotipos en el híbrido F1B6CBA.

**En relación al objetivo 3, se describen los siguientes objetivos específicos:**

- Evaluar la eficacia en el tratamiento de la esquistosomosis de los derivados de la artemisina en monoterapia y en combinación con el praziquantel.
- Determinar la eficacia del artesunate y artemether en la prevención de la esquistosomosis.



## Capítulo 3

# MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta tesis doctoral se describen en la sección de resultados mediante la inclusión de cuatro trabajos de investigación. Además, al final de la tesis doctoral se incluye un anexo metodológico en el que se detalla cada uno de los protocolos utilizados.

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se resumen en un informe y tres artículos de investigación en proceso de revisión o aceptados.

En primer lugar, en el informe: “Identificación de *Quantitative Trait Loci (QTLs)* implicados en la respuesta inmune del ratón en condiciones basales: Rastreo genético y aproximación multivariante” se presenta la metodología de cruce retrógrado de ratón y los resultados procedentes del análisis de ligamiento de un estudio sobre genética cuantitativa del proceso inflamatorio y las variables inmunológicas a nivel basal en una población de ratón *backcross* (SPRET/Ei x FVB/N) x FVB/N.

En segundo lugar, la subespecie de ratón *Mus spretus* representa una gran oportunidad para el estudio de enfermedades de rasgos complejos puesto que presenta una gran divergencia genética respecto al ratón *Mus musculus*, especie comúnmente utilizada en el laboratorio. Hasta el momento no se conoce el comportamiento de esta especie de ratón respecto a la resistencia/susceptibilidad a la infección por *S. mansoni*. Se incluye el artículo: “*Schistosoma mansoni* infection in SPRET/Ei mice: a multivariate approach” donde se realiza una exploración de las variables inmunológicas y hematológicas de esta subespecie de ratón en respuesta a la infección experimental de *S. mansoni*.

En tercer lugar, el artículo: “*Identifying phenotypes involved in the susceptibility to Schistosoma mansoni infection in F1B6CBA mice*” presenta los resultados obtenidos del análisis de la resistencia/susceptibilidad a la esquistosomosis en dos cepas de ratón divergentes y la generación del cruce F1 como paso previo a la generación de la población *backcross*. Este estudio preliminar ayudará a dilucidar el papel del fondo genético en la resistencia/susceptibilidad a la infección y a elegir los fenotipos inmunitarios responsables de la resistencia/susceptibilidad a la enfermedad.

Por último, se incluye el artículo: “*Systematic review and meta-analysis of Artemisinin based therapies for the treatment and prevention of schistosomiasis*” en el que se presenta el uso del meta-análisis como una herramienta para dilucidar la posible incorporación de los derivados de la artemisina en el tratamiento y control de la esquistosomosis en zona endémica.

**4.1. Identificación de Quantitative Trait Loci (QTLs) implicados en la respuesta inmune del ratón en condiciones basales: Rastreo genético y aproximación multivariante**

# Identificación de Quantitative Trait Loci implicados en la respuesta inmune del ratón en condiciones basales: Rastreo genético y aproximación multivariante

Pérez del Villar L.<sup>1</sup>, Galindo Villardón P.<sup>2</sup>, Muro A.<sup>1</sup>, Pérez-Losada J.<sup>3</sup>

28 de diciembre de 2012

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Castilla y León, SPAIN

<sup>2</sup>Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, Castilla y León, SPAIN

<sup>3</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Castilla y León, SPAIN

## Resumen

El análisis de rasgos complejos mediante cruces experimentales de ratón es una estrategia que se ha implementado con éxito para el rastreo de genes implicados en la resistencia/susceptibilidad de enfermedades como la diabetes o el cáncer. El objetivo global de este estudio es la identificación de genes implicados en la respuesta inflamatoria en un cruce retrogrado de ratón: *M. musculus* x *M. spretus*. A través del análisis de ligamiento en este cruce de ratón se han identificado 15 *loci* que controlan rasgos genéticos cuantitativos con una posible implicación en la respuesta inflamatoria del ratón. Estas regiones se corresponden a estudios de infiltración celular, expresión de las distintas subpoblaciones celulares y a la proliferación celular en respuesta a distintos estimulantes celulares. Por otro lado, se ha realizado un estudio multivariante de los distintos fenotipos incluidos en el estudio mediante un HJ-Biplot demostrándose una alta correlación entre el estudio de inflamación y porcentaje de linfocitos B circulantes, así como entre las distintas subpoblaciones de linfocitos T-helper entre sí. Nuestros resultados proporcionan la base para profundizar en modelos que describan relaciones entre las variables genéticas y fenotípicas asociadas a la respuesta inmune del ratón.

# 1. Introducción

La mayor parte de la variabilidad fenotípica entre individuos de una misma especie está gobernada por regiones genéticas denominadas Quantitative Trait Loci (QTL) [1]. Los QTL controlan rasgos cuantitativos del individuo como la talla, el peso o la presión arterial y tienen una gran importancia en la susceptibilidad/resistencia a enfermedades de rasgos complejos como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares o la diabetes [1,2]. Generalmente, los rasgos genéticos cuantitativos son multifactoriales y están controlados por varios genes polimórficos y por las condiciones ambientales.

Uno de los protocolos más comunes para cruzar dos cepas consanguíneas es el retrocruce o *backcross*. El protocolo comienza con el cruce de dos cepas consideradas fenotípicamente distintas, el resultado de ese cruce se denomina primera generación filial o "F1". Considérese un *locus* genético donde ambas cepas difieran: AA para una de las cepas parental y BB para la otra cepa parental, el genotipo de la generación F1 será AB. Por lo tanto, los ratones F1 tendrán una composición genética fija (heterocigotos para todos los *loci* polimórficos) y todos serán idénticos entre ellos (figura 1).

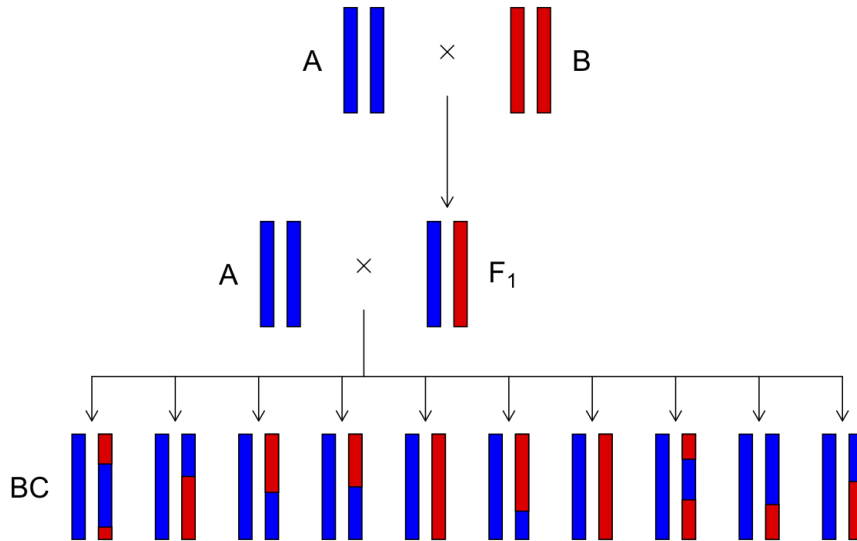


Figura 1: representación esquemática de los autosomas en un experimento backcross. Las dos cepas de ratón *inbreed*, A y B están representadas por los cromosomas azul y rojo, respectivamente. En una población backcross para cualquiera de los *locus* en que difieran las cepas parentales tiene el 50% de posibilidad de ser heterocigoto y el 50% de posibilidad de ser homocigotos.

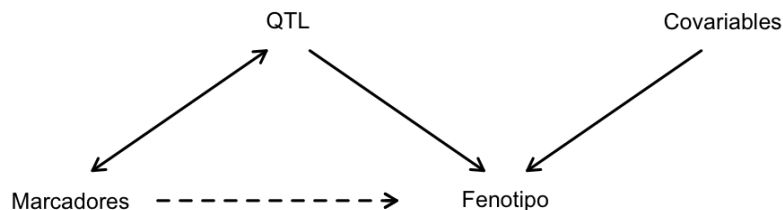


Figura 2: representación gráfica de la identificación de QTL en el modelo de ratón. Los QTL y las covariables (sexo, edad) son responsables de la variabilidad fenotípica en la población. Los QTL y los marcadores genéticos (SNP) están correlacionados debido al desequilibrio de ligamiento como se indica con la línea continua bidireccional. Este hecho determina que algunos marcadores pueden estar asociados a con la variabilidad fenotípica vía análisis de ligamiento.

En la generación de un *backcross* los mecanismos de recombinación genética se hacen evidentes, por lo que un único individuo puede ser homocigoto AA o heterocigoto AB para aquellos *loci* polimórficos. Por lo tanto, una población de ratones *backcross* representa un modelo de variabilidad genética controlada que va a determinar una variabilidad fenotípica [3, 4]. Distintas herramientas estadísticas nos van a permitir asociar la variabilidad genética controlada a la variabilidad fenotípica de la población. Las regiones del genoma que muestren una clara evidencia de asociación serán identificadas como QTL [5]. La figura 2 indica el esquema general para identificar QTL en cruces experimentales. El término de ligamiento genético se refiere a la proximidad física de dos *loci* a lo largo del cromosoma y es una herramienta útil para identificar qué regiones génicas son responsables de la variabilidad fenotípica. En este trabajo se estudiarán los fenotipos relacionados con la reacción inflamatoria y las subpoblaciones leucitarias mayoritarias.

Los leucocitos maduros en la sangre periférica de ratón y de humanos expresan moléculas específicas de superficie (marcadores) que pueden ser detectadas por *fluorescence-activated cell staining* (FACS) usando anticuerpos específicos [6,7]. Las poblaciones mayoritarias de los leucocitos circulantes son B220, linfocitos T-helper que expresan CD4, linfocitos T citotóxicos que expresan CD8 y granulocitos que expresan Gr1 y Mac-1. Bajo condiciones fisiológicas, las proporciones de subpoblaciones leucocitarias circulantes son relativamente constantes en ratones de un genotipo en particular, mostrando una regulación precisa del compromiso de linaje hematopoyético, diferenciación, maduración, reclutamiento



to y eliminación [8]. Sin embargo, en el ser humano, las proporciones de las diferentes subpoblaciones de leucocitos puede ser alteradas por el efecto del fondo genético del individuo. Por ejemplo, Dendrou *et al.* han vinculado la expresión relativa de CD25 en la superficie de las células CD4 T de memoria con un haplotipo previamente demostrado que confieren protección contra la diabetes de tipo I [9]. Especificar de la base genética de los inmunofenotipos específicos es una herramienta valiosa en la comprensión de las susceptibilidades y/o progresión de enfermedades, tales como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, que se caracterizan por la desregulación o desequilibrios de distintas poblaciones de células inmunes [10, 11]. Además, las células estromales, citocinas, receptores, ligandos, moléculas de señalización y factores de transcripción se ha demostrado que afectan a los niveles de B y T linfocitos [12].

El objetivo principal del presente trabajo es determinar qué regiones cromosómicas son las responsables de los procesos de inflamación e infiltración celular y relacionarlos con los niveles de linfocitos %T-CD4, %T-CD8, %B220 y el grado de proliferación celular en respuesta a distintos estimulantes.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Generación de la poblablación *backcross*

Se generó un cruce retrógrado o *backcross* entre una cepa de ratón singénica resistente al proceso inflamatorio, SPRET/Ei, y otra susceptible, FVB/N. Primero se estableció la generación F1 (SPRET/Ei X FVB/N) y posteriormente se volvió a cruzar con la cepa FVB/NH estableciéndose el cruce (SPRET/Ei X FVB/N) X FVB/N al que denominaremos FVBBX. Cada uno los ratones generados será genéticamente único, pero con una variabilidad genómica controlada, puesto que sólo serán mezcla de C57/BL6 y FVB/N en grado variable.

### 2.2. Estudio del genotipo de los ratones

Se llevó a cabo el genotipado de 88 ratones *backcross* (FVBBX) utilizando 231 polimorfismos de un solo nucleótido SNP separados de modo uniforme a lo largo del genoma del ratón. Estos marcadores se utilizaron para encontrar haplotipos que permitieran acotar las regiones que contienen genes de susceptibilidad/resistencia al proceso inflamatorio. Existe dos posibilidades para cada SNP que se codifican de la siguiente forma: “homocigotos AA=0” o “heterocigotos AB=1”. Por lo tanto, los datos que disponemos en la matriz de datos genéticos son de tipo binario.

### 2.3. Estudio del fenotipo de los ratones

**Variables de inflamación:** se determinó el incremento del grosor de la oreja a nivel basal y a las 24 horas tras la administración de ésteres de fosfol aldehído (TPA), así como el infiltrado celular (leucocitos) mediante anatomía patológica.

**Variabes hematológicas:** fueron obtenidas mediante un equipo Hema-vet M-950HV<sup>®</sup>, se trata de un hemocitómetro que nos proporciona magnitudes sanguíneas de la serie blanca, roja y plaquetaria a partir de volúmenes pequeños de sangre periférica. En este estudio se incluirán únicamente las variables de serie blanca de la sangre. Serie blanca: recuento de células blancas (WBC), neutrófilos (NE), linfocitos (LY), monocitos (MO), eosinófilos(EO) y basófilos (BA).

**Variabes inmunológicas:** para su obtención se recurrió a la citometría de flujo (separador celular activado por fluorescencia o FACS<sup>®</sup>) que nos proporciona información sobre el tamaño celular (FSC) y granulosidad (o grado de complejidad interna) (SSC) de las células y, con ello, nos permite estudiar las propiedades de las sub-poblaciones celulares identificadas mediante anticuerpos monoclonales contra las proteínas de superficie celular. De este modo, se realizó el inmunofenotipo de cada ratón incluido en el experimento, del que obtuvimos: porcentaje de la serie linfocítica (% linfocitos B, % linfocitos T-CD3, ratio T:B, % linfocitos T-CD4, % linfocitos T-CD8, ratio TCD4:TCD8) y de la serie mielocítica (% de monocitos, % de neutrófilos, % de eosinófilos)..

**Variabes de proliferación celular:** se determinó la proliferación celular en ausencia de estimulantes y tras la administración de PMA/Ionomicina, oligonucleótidos de DNA (CpG), Lipopolisacárido bacteriano (LPS) y medio-NK mediante la técnica de timidina tritiada.

## 2.4. Métodos estadísticos utilizados

**Análisis estadístico de la matriz de datos fenotípicos:** el primer paso para describir las relaciones fenotípicas existentes en un organismo es calcular una matriz de correlación entre todas las variables en estudio mediante un análisis de correlación de Pearson [13]. Sin embargo, para tener una visión global del problema, se aplicó un HJ-Biplot como técnica de análisis multivariante [14]. El objetivo general de los métodos Biplot es la aproximación de una matriz de datos, de tal forma que permita su modelización a partir de mapas geométricos construidos como proyecciones de nubes de puntos, filas y columnas sobre subespacios de ajustes óptimos [15, 16]. Respecto a la representación gráfica, los individuos (marcadores fila) se observan como puntos y las variables (marcadores columna) como vectores, cuyo sentido representa la dirección en la que aumentan los valores de la variable correspondiente. La longitud de los marcadores columna aproxima la desviación estándar de las variables y el coseno del ángulo entre dos marcadores columna aproxima la correlación entre las variables correspondientes. Cuanto más distantes aparezcan los puntos que representan a los caracteres del centro de gravedad, más variabilidad habrán presentado esos caracteres en el estudio. Cuanto menor sea el ángulo que forman dos vectores que unen el centro de gravedad con los puntos que representan las variables, más correlacionados están los caracteres.

**Análisis estadísticos de la matriz de datos genéticos:** en genética, la correlación entre dos variables dicotómicas que no presentan una distribución continua se estima mediante el coeficiente  $\phi$ . Se calcula usando la misma fórmula que para el coeficiente de correlación de Pearson, y se relaciona con el estadístico chi-cuadrado para testar la asociación entre dos variables binarias [17]. De hecho, se demuestra que  $\phi = \sqrt{r^2}$  donde  $r^2$  es la medida de asociación definida como “frecuencia de recombinación”. En nuestro modelo experimental se usarán los estudios de correlación entre los distintos marcadores para comprobar que los eventos de recombinación genética ocurren entre marcadores cercanos.

**Análisis de ligamiento:** el método estadístico utilizado en este estudio para calcular un LOD score<sup>1</sup> fue el “*marker regresión*” [5]. Se adoptó el criterio de Lander & Kruglyak [18] para determinar si existe o no asociación entre los distintos marcadores genéticos y un determinado fenotipo en la población *backcross*. Este criterio implica un fuerte control sobre el riesgo de TIPO I, para asegurarse un amplio margen de confianza que limite la detección de regiones genéticas “falsas”. A continuación se describen los límites establecidos en términos de LOD score y de p-valor, según estos criterios:

- Posible presencia de ligamiento (sugestivo): aquella región genética que presenta un lod score= 1.5 (p-valor=3.4x10-3).
- Presencia significativa de ligamiento: aquella región genética que presenta un lod score= 3.3 (p-valor=1.0 x 10-4).

La estadística descriptiva y los estudios de correlación de los datos fenotípicos se desarrollaron utilizando SPSS v.20.0 para Windows. Los análisis estadísticos relacionados con los métodos biplot se realizaron con el programa estadístico MULTBILOT [19]. Finalmente, el estudio de ligamiento genético se realizó utilizando R/qlt package [20].

---

<sup>1</sup>El LOD score o puntuación LOD es un estimador que nos permite detectar ligamiento y estimar la frecuencia de recombinación más probable entre genes. Se calcula como el logaritmo de la razón entre la probabilidad de la descendencia dada la existencia de ligamiento con frecuencia de recombinación  $r$  respecto al caso sin ligamiento.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Datos genéticos

Se realizó el genotipado de 88 ratones de ambos sexos con 231 marcadores SNP a lo largo de los 19 cromosomas del ratón y del cromosoma sexual X. Lo primero que se hizo fue estimar la fracción de recombinación entre los distintos marcadores genéticos,  $r$ , y calcular su correspondiente LOD score. Se testó la hipótesis nula de ausencia de recombinación, es decir  $H_0: r = 0.5$ . Como norma, los marcadores de distintos cromosomas no pueden aparecer ligados. Sin embargo, la fracción de recombinación para los marcadores que se encuentren cercanos en el mismo cromosoma será  $r < 0.5$ . Los resultados que se muestran en la figura 3 indican la fracción de recombinación estimada (triángulo superior izquierdo) y el LOD score (triángulo inferior derecho) para todos los pares de marcadores. El color rojo indica que los marcadores en esa posición aparecen ligados, es decir presentan una baja fracción de recombinación ( $r < 0.5$ ) o alto LOD score. El color azul indica que los marcadores no están ligados es decir, presentan una fracción de recombinación ( $r = 0.5$ ) o un LOD score bajo.

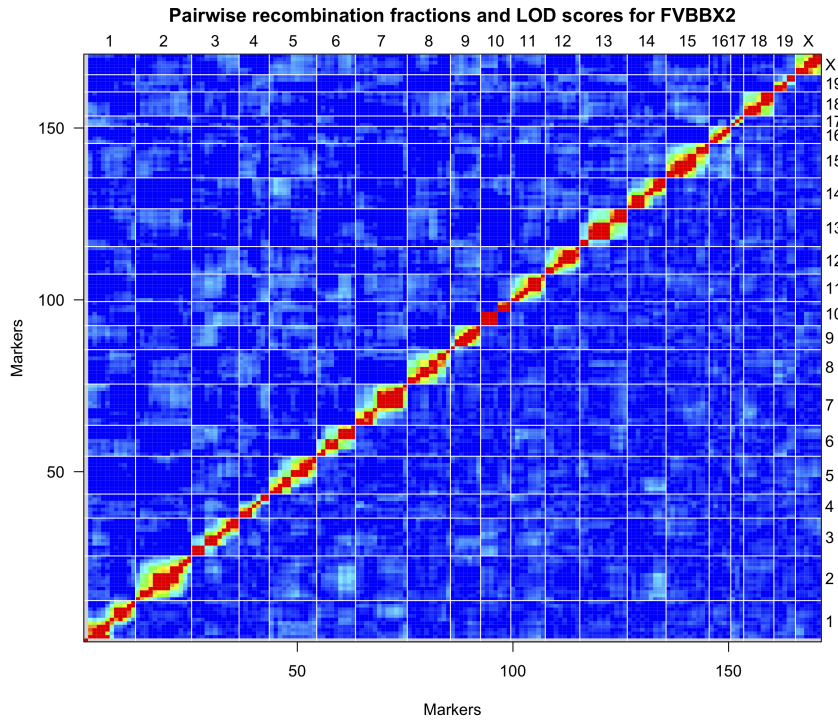


Figura 3: fracción de recombinación estimada (triángulo superior izquierdo) y LOD score (triángulo inferior derecho) para todas los pares de marcadores.

### 3.2. Estudio de la respuesta inmune y del proceso inflamatorio: correlación entre fenotipos relacionados con la respuesta inmune y análisis multivariante mediante un HJ-Biplot

Se realizó un estudio de inflamación midiendo el incremento en el grosor de la oreja tras 24h de la aplicación de TPA además se evaluó el grado de infiltración leucocitaria de la oreja mediante anatomía patológica. Por otro lado, se realizó un estudio de proliferación celular mediante la cuantificación de leucocitos *in vitro* (determinada con timidina tritiada) tras la acción de diferentes estimulantes. Para determinar la relación entre el grado de proliferación celular, el grado de infiltración celular e inflamación, se realizó un estudio de correlación univariante mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Como se puede observar en el cuadro 1, se detecta una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre el estudio de inflamación y el grado de infiltración celular después de la exposición de TPA.

Cuadro 1: correlación entre los estimulantes celulares, el estudio de inflamación y el grado de infiltración celular.

		CONTROL	PMA_IONO	LPS	CPG	NK	INFLAMACIÓN	INFILTRACIÓN
CONTROL	Pearson	1	,315**	,820**	,316**	,238*	,018	,058
	Sig. (bilateral)		,003	,000	,003	,028	,871	,605
	N	89	89	89	87	86	83	82
PMA_IONO	Pearson	,315**	1	,380**	,255*	,239*	-,008	,068
	Sig. (bilateral)	,003		,000	,017	,027	,945	,544
	N	89	89	89	87	86	83	82
LPS	Pearson	,820**	,380**	1	,260*	,256*	,005	,002
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,015	,017	,963	,983
	N	89	89	89	87	86	83	82
CPG	Pearson	,316**	,255*	,260*	1	,191	,001	,053
	Sig. (bilateral)	,003	,017	,015		,081	,993	,636
	N	87	87	87	87	84	83	82
NK	Pearson	,238*	,239*	,256*	,191	1	-,139	-,130
	Sig. (bilateral)	,028	,027	,017	,081		,216	,251
	N	86	86	86	84	86	81	80
INFLAMACION	Pearson	,018	-,008	,005	,001	-,139	1	,689**
	Sig. (bilateral)	,871	,945	,963	,993	,216		,000
	N	83	83	83	83	81	83	80
INFILTRACIÓN	Pearson	,058	,068	,002	,053	-,130	,689**	1
	Sig. (bilateral)	,605	,544	,983	,636	,251	,000	
	N	82	82	82	82	80	80	82

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* . La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

También se puede observar una alta correlación entre el grado de proliferación celular en respuesta a los distintos estímulos utilizados, especialmente con la estimulación realizada con LPS y PMA-IONOMICINA. Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran ninguna correlación significativa entre grado de proliferación celular en respuesta a los diferentes estimulantes y el estudio de inflamación e infiltración celular.

Además, se realizó un estudio mediante citometría de flujo de las sub-poblaciones

celulares más importantes de la serie linfoide (% de linfocitos B, % de linfocitos T-CD4+ y % de linfocitos T-CD8+) y de la serie mieloide (% de monocitos, % de neutrófilos % de eosinófilos). El porcentaje de Basófilos se obtuvo a partir de los resultados obtenidos mediante el Hemavet. De la misma forma que en el caso anterior, se realizó un estudio de correlación univariante para estudiar la posible relación entre las distintas subpoblaciones con el grado de inflamación e infiltración celular (cuadro 2).

Cuadro 2: correlación entre el estudio de inflamación y las distintas subpoblaciones celulares

		%NE	%EO	%BA	%B220	%TCD4	%TCD8	T:B	TCD4:TCD8	INFLAMACIÓN	INFILTRACIÓN
%NE	Pearson	1	,038	,054	,037	,076	,108	,009	-,023	-,060	,042
	Sig. (bilateral)		,730	,618	,743	,500	,333	,938	,838	,590	,709
	N	87	87	87	81	81	82	81	81	82	81
%EO	Pearson	,038	1	,89**	,062	-,067	-,043	-,075	-,067	,063	-,071
	Sig. (bilateral)	,730		,000	,581	,552	,703	,504	,555	,574	,529
	N	87	87	87	81	81	82	81	81	82	81
%BA	Pearson	,054	,887**	1	,071	-,083	,044	-,087	-,163	,034	-,023
	Sig. (bilateral)	,618	,000		,527	,463	,694	,442	,146	,759	,839
	N	87	87	87	81	81	82	81	81	82	81
%B220	Pearson	,037	,062	,071	1	-,56**	-,443*	-,86**	-,178	,191	,203
	Sig. (bilateral)	,743	,581	,527		,000	,000	,000	,109	,092	,076
	N	81	81	81	82	82	82	82	82	79	77
%TCD4	Pearson	,076	-,067	-,083	-,558**	1	,407**	,726**	,615**	-,132	-,102
	Sig. (bilateral)	,500	,552	,463	,000		,000	,000	,000	,246	,376
	N	81	81	81	82	82	82	82	82	79	77
%TCD8	Pearson	,108	-,043	,044	-,443*	,407**	1	,457**	-,404**	-,109	-,130
	Sig. (bilateral)	,333	,703	,694	,000	,000		,000	,000	,337	,257
	N	82	82	82	82	82	83	82	82	80	78
T:B	Pearson	,009	-,075	-,087	-,856**	,726**	,457**	1	,339**	-,149	-,151
	Sig. (bilateral)	,938	,504	,442	,000	,000	,000		,002	,191	,190
	N	81	81	81	82	82	82	82	82	79	77
TCD4:TCD8	Pearson	-,023	-,067	-,163	-,178	,615**	-,404**	,339**	1	-,011	,044
	Sig. (bilateral)	,838	,555	,146	,109	,000	,000	,002		,926	,704
	N	81	81	81	82	82	82	82	82	79	77
INFLAMACIÓN	Pearson	-,060	,063	,034	,191	-,132	-,109	-,149	-,011	1	,689**
	Sig. (bilateral)	,590	,574	,759	,092	,246	,337	,191	,926		,000
	N	82	82	82	79	79	80	79	79	83	80
INFILTRACIÓN	Pearson	,042	-,071	-,023	,203	-,102	-,130	-,151	,044	,689**	1
	Sig. (bilateral)	,709	,529	,839	,076	,376	,257	,190	,704	,000	
	N	81	81	81	77	77	78	77	77	80	82

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Se observó un alto grado de correlación entre el %BA y %EO en sangre periférica. Además, se puede observar una correlación negativa entre el %B220 y de linfocitos T-helper (%T-CD4 y %TCD8). También, se observa una correlación positiva entre el el grado de inflamación e infiltración con el % de Linfocitos B, aunque esta correlación no llega al límite de significación estadística.

Para obtener una visión global del problema, se realizó una aproximación multivariante de las diferentes variables inmunológicas, y de los estudios de proliferación e inflamación. Se realizó un HJ-Biplot para identificar qué variables están correlacionadas y si los individuos se clasifican siguiendo un mismo patrón inmunológico.



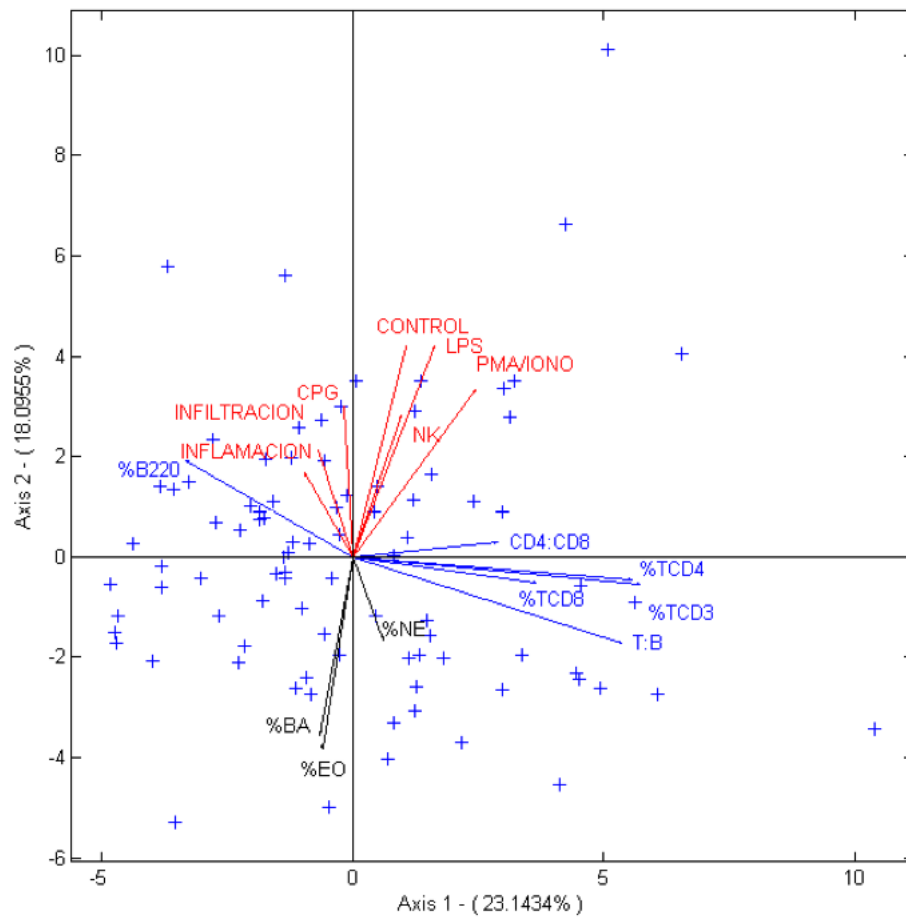


Figura 4: representación Biplot en los dos primeros planos factoriales de los fenotipos implicados en la respuesta inmune. La bondad del ajuste o la variabilidad explicada por el primer plano factorial (eje 1 y 2) es del 39.19%.

De acuerdo con la figura 4, es evidente que las variables inflamación e infiltración celular son variables que están altamente correlacionadas puesto que los vectores que representan estas variables forman un ángulo agudo. También se puede observar relaciones significativas entre las variables linfocitos T-helper entre sí. Se debe destacar que el porcentaje de linfocitos B es la subpoblación celular que mejor se asocia al grado de inflamación e infiltración celular. También se debe de destacar que existe una correlación inversa entre la proporción de linfocitos B y T en sangre periférica, estos resultados confirman los resultados obtenidos del análisis univariante. Además este comportamiento tiene un sentido biológico ya que las células T y B se midieron a partir del porcentaje del total de linfocitos seleccionados y estas dos mediciones poseen una fuerte correlación inversa. Por otro lado, desde el punto de vista de la representación

gráfica del HJ-Biplot se puede observar que las poblaciones granulocíticas están inversamente correlacionadas con grado de inflamación e infiltración celular, ya que muestran direcciones opuestas. De igual forma, no se ha encontrado ninguna relación en el porcentaje de linfocitos T y estos dos procesos. Por último, una de las ventajas de los métodos Biplot respecto a otros análisis multivariantes, es que permite la representación simultánea de individuos y variables. En nuestro estudio, respecto a la representación de los individuos se observa que se distribuyen de forma uniforme en el primer plano factorial, no observandose agrupación alguna.

### 3.3. Estudio de ligamiento: respuesta inmune y del proceso inflamatorio

**Estudio de ligamiento del estudio de inflamación e infiltración celular:** se identificó el marcador E02.112.734\_10 ubicado a 60.61cM con un LOD score  $>3$  (altamente significativo) como región genética implicada en el proceso inflamatorio. Además, se identificó E02.078.067\_10 ubicada a 46.76 cM como región cromosómica asociada al grado de infiltración con un LOD score = 2.11 (figura 5). Ambos marcadores se encuentran cercanos en el mismo cromosoma, por lo que es previsible que se encuentren en desequilibrio de ligamiento y tiendan a heredarse formando un haplotipo. Además, ambas variables se correlacionan desde el punto de vista fenotípico. Como se puede observar en la figura 5, los alelos que confieren un menor grado de inflamación y de infiltración celular es el alelo “B”, con el que se ha codificado el alelo procedente de la cepa SPRET/Ei. Esto concuerda con el fenotipo de la cepa de ratón SPRET/Ei que presenta un menor grado de inflamación y se presenta como modelo experimental de resistencia a diferentes enfermedades infecciosas donde el proceso inflamatorio tiene un papel crucial.

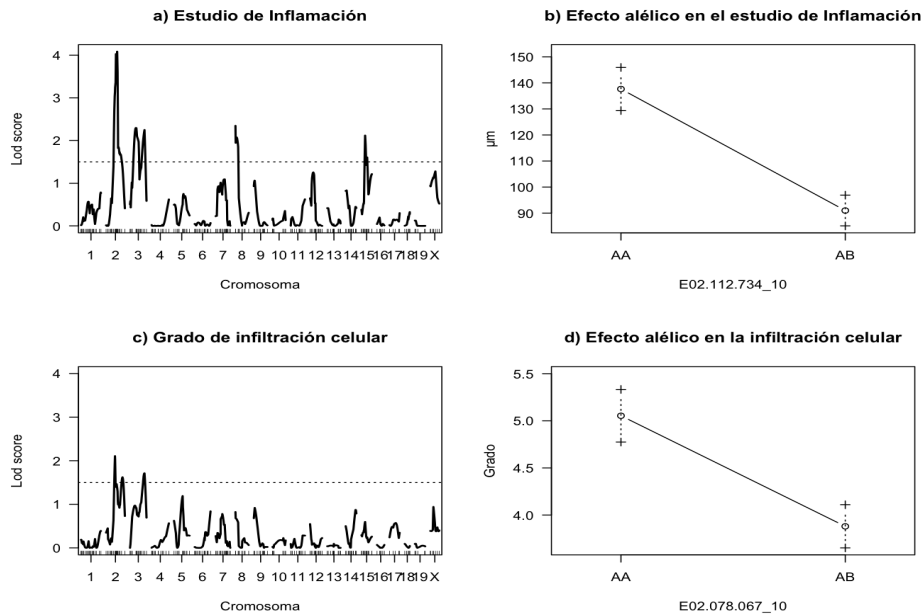


Figura 5: rastreo genético de las variables que describen el proceso de inflamación y de infiltración celular

**Estudio de ligamiento de las variables de proliferación celular:** se realizó el estudio de ligamiento del estudio de proliferación celular en respuesta a diversos estimulantes. En la tabla-1 se muestran los resultados de las regiones genéticas identificadas para los distintos fenotipos analizados involucrados en la proliferación celular. Para cada uno de los estimulantes celulares utilizados en los ensayos de proliferación se identificó al menos una región génica implicada en su regulación con un LOD score  $> 1,5$ . Sin embargo en condiciones basales (control) no se identificó ningún QTL. Por otro lado, se identifica una región cromosómica E17.022.410\_10 relacionada con la estimulación en presencia de PMA/Ionomicina.

**Tabla-1. Regiones génicas con valores LOD score más altos implicadas en la proliferación celular.**

SNP	PMA/iono	LPS	CPG	NK
E02.172.454	0.99	1.64	0.02	0.75
E06.092.041	0.50	0.01	0.01	1.90
E10.102.359	0.79	0.87	2.25	0.05
E17.022.410	2.09	0.30	0.24	0.65

De acuerdo a la tabla-1, se representó el efecto del alelo SPRET/Ei (AB) frente el efecto de ese mismo alelo en homocigosis (AA) procedente de la cepa

(FVB/N) para aquel polimorfismo que presentó un LOD score más alto en el análisis de ligamiento en el estudio de proliferación celular. Los resultados se muestran en la figura 6. Según los resultados obtenidos, podemos afirmar que los alelos procedentes de la cepa de ratón SPRET/Ei confieren un menor grado de proliferación leucocitaria con los estimulantes celulares aplicados en el estudio, excepto en el caso de la estimulación con medio NK.

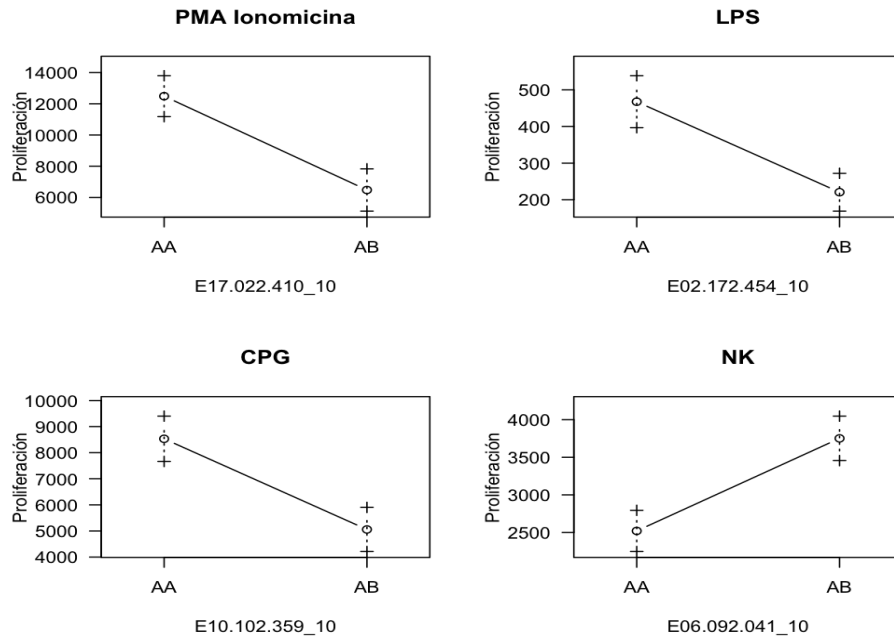


Figura 6: efecto alélico sobre las variables de inflamación que han mostrado una asociación significativa con alguna región cromosómica

**Estudio de ligamiento de las subpoblaciones leucocitarias mayoritarias, serie mieloide y linfoide:** en la tabla-2 se resumen las regiones genéticas implidas en el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias mayoritarias en sangre periférica, así como la relación de proporciones que existen entre ellas como la proporción de CD4:CD8 o la proporción de linfocitos T/B.

Se han identificado los marcadores E17.022.410 (11.4 cM) y E17.056.536 (29.31 cM) como dos SNPs implicados en el control del porcentaje de linfocitos T-CD3, T-CD4 y T-CD8. Respecto al % de linfocitos B, se ha detectado la presencia de un posible QTL cercano al marcador E03.140.010 ubicado en el cromosoma 3 a 65.25 cM, sin embargo el LOD score que presenta este marcador es bajo, por lo que más estudios son necesarios para confirmar esta observación.

**Tabla-2. QTLs implicados en el control del porcentaje de células linfoides en sangre periférica.**

SNP	%B220	%T-CD4	%T-CD8	CD4:CD8	%T-CD3	T:B
E03.140.010	1.51	0.46	1.03	0.88	1.47	0.07
E03.147.739	1.49	0.39	1.04	0.74	1.53	0.07
E04.080.606	0.26	0.07	3.04	0.61	0.04	1.35
E05.032.425	0.40	1.60	0.97	1.71	0.74	0.00
E05.047.657	0.67	2.03	0.43	1.50	0.82	0.49
E05.120.578	0.43	1.07	2.38	1.82	1.02	0.00
E12.105.658	0.41	1.12	2.33	1.84	1.04	0.00
E16.084.417	0.00	0.05	1.02	0.00	0.00	1.72
E17.022.410	0.67	3.34	1.01	4.29	1.60	0.66
E17.056.536	0.61	1.32	1.57	2.50	1.09	0.00

Por lo tanto, se puede afirmar que existen evidencias de que las diferentes subpoblaciones celulares de la serie linfoide podrían estar afectadas por regiones genéticas comunes. Respecto al efecto del alelo procedente de la cepa de ratón SPRET/Ei codificado como "B", se puede observar que en la mayoría de los casos, el alelo de la cepa SPRET/Ei determina una menor expresión en las poblaciones linfocitarias analizadas excepto en el ratio CD4/CD8 (figura 7). Por último, se analizaron las poblaciones de monocitos y de células granulocíticas (%Basófilos %Neutrófilos y %Eosinófilos) en sangre periférica, se realizó el estudio de ligamiento y, en este caso, no se detectó ningún QTL asociado a este tipo de células en condiciones basales.

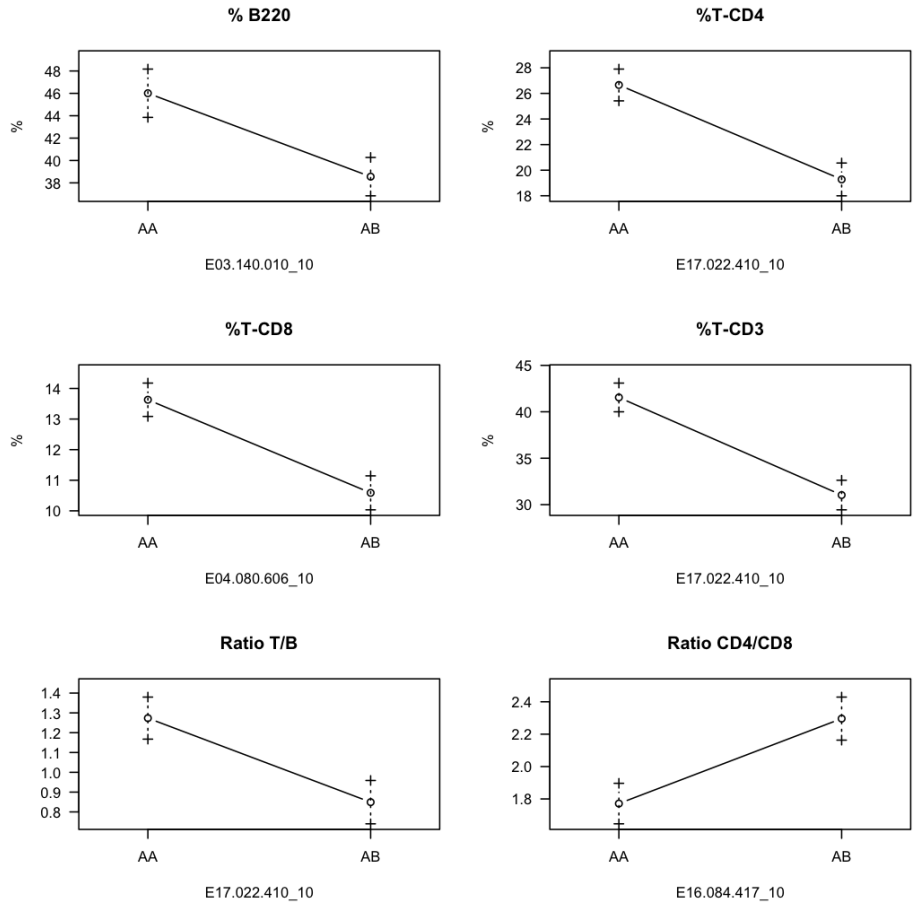


Figura 7: efecto alélico sobre las variables de linfocitarias que han mostrado una asociación significativa con alguna región cromosómica

## 4. Observaciones finales

La genética de sistemas permite la detección de QTL y la identificación de genes candidatos implicados en la resistencia/susceptibilidad a distintas enfermedades [21]. Este estudio se ha centrado en tres fenotipos relevantes (1) grado de inflamación como incremento de grosor de la oreja tras la administración de TPA, (2) grado de infiltración leucocitaria medida mediante anatomía patológica a partir de una biopsia tras la administración de TPA y (3) estudio del inmunofenotipo de ratón en condiciones basales. Se ha demostrado que los fenotipos grado de inflamación e infiltración celular son dos fenotipos altamente correlacionados y que están bajo el control de una misma región génica ubicada



entre 46.76 cM y 60.61cM en el cromosoma 2. Se debe de destacar que en esta misma región se ha identificado previamente el Factor de transcripción nuclear 2 (Nrf2) implicado en la respuesta del organismo al estrés oxidativo [22]. En este sentido, la cepa de ratón SPRET/Ei se considera una cepa de ratón que desarrolla una respuesta inflamatoria ante diversos agentes muy leve, esto hace que sea un modelo óptimo para estudiar este proceso en diferentes enfermedades. De forma específica se han realizado estudios en poblaciones *backcross* en las que la cepa SPRET/Ei se utiliza como modelo de resistencia frente a patógenos como *Mycobacterium bovis* [23] o *Salmonella enterica* [24].

Además, el análisis multivariante desarrollado en este trabajo nos permitió relacionar la inflamación y el grado de infiltración celular con subpoblaciones leucocitarias mayoritarias en la sangre y grado de proliferación celular en respuesta a distintos estimulantes. De hecho a partir de los resultados obtenidos en el análisis multivariante, se observó que el % de linfocitos B estaba relacionado de forma positiva con el grado de infiltración celular y de inflamación. La abundancia específica de las subpoblaciones linfocitarias se ve alterada por múltiples factores como la edad, la dieta o la presencia de infecciones [25-27]. Sin embargo, la variabilidad de estas subpoblaciones celulares también está fuertemente regulada por un control genético y puede jugar un papel importante en la susceptibilidad/resistencia a distintas enfermedades infecciosas [28]. De hecho, en la mayoría de las enfermedades infecciosas, y en concreto la enfermedades parasitarias, una respuesta inflamatoria exacerbada puede determinar un rasgo de susceptibilidad a una infección [29].

A la luz de los resultados, hemos encontrado diversas regiones génicas capaces de explicar la mayor parte de la variación de cada uno de los 15 inmunofenotipos analizados en la población FVBNH/Spret en condiciones basales. El análisis de ligamiento ha determinado la vinculación a dos QTL ubicados en el cromosoma 17 E17.022.410 (11.4 cM) y E17.056.536 (29.31cM) con una fuerte influencia sobre el porcentaje de linfocitos T-CD4, esto concuerda con resultados obtenidos previamente [29]. Se debe destacar que, al igual que en el estudio de inflamación e infiltración celular, los marcadores E17.022.410\_10 y E17.056.536\_10 se encuentran en regiones cercanas, por lo que es probable que se encuentren en desequilibrio de ligamiento y tiendan a heredarse de forma conjunta. Además, E17.022.410 muestra un fuerte control sobre el ratio de linfocitos T-CD4 y T-CD8, este parámetro es un parámetro importante para el pronóstico de enfermedades como la artritis reumatoide o la infección por el VIH [31, 32]. En este caso, el alelo de la cepa SPRET/Ei confiere una mayor proporción de este ratio. Respecto a la población de linfocitos B, se ha detectado un posible QTL en E03.140.010 con un LOD score =1.51, por lo que se necesitan más estudios que confirmen la presencia de un QTL que regulen el porcentaje de células B en esta región génica. Por otro lado, solamente se ha detectado un marcador E16.084.417\_10 que esté ligado de forma sugestiva al ratio T/B aunque el marcador E04.080.606 presenta una posible asociación a este fenotipo. En este sentido, previamente ha sido descrito un *locus* en cromosoma 4 que está implicado en el control del ratio T/B [33].

Por último, existen dos posibles explicaciones para que no se detecten

ningún QTL asociado a las poblaciones basales de granulocitos. En primer lugar, el %Basofilos y %Eosinófilos es muy escasa en la sangre y esto hace que los resultados puedan estar sometidos a un mayor error experimental y, en segundo lugar, no se han detectado diferencias significativas en la presencia de granulocitos a nivel basal entre las cepas parentales SPRET/Ei y FVB/NH, por lo tanto es más difícil obtener QTLs con un nivel de significación. Esto no ocurre cuando a la población experimental se le somete a un agente infeccioso donde las células granulocíticas tienen un papel fundamental. En general, los resultados de este estudio proporcionan un excelente modelo para examinar los mecanismos celulares y moleculares que están implicados en la inflamación y sus implicación en múltiples enfermedades como la artritis reumatoide, cáncer y enfermedades infecciosas.

## 5. Contribuciones y agradecimientos

Los datos biológicos de este estudio fueron generados en el laboratorio del Dr. Balmain en el Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center de la Universidad de California San Francisco (UCSF) por el Dr. Pérez-Losada durante su etapa postdoctoral en dicho laboratorio. El análisis genético y tratamiento estadístico de los datos ha sido llevado a cabo íntegramente por el doctorando D. Luis Pérez del Villar Moro bajo la supervisión de la Dra. Galindo Villardón y Dr. Muro Álvarez. Finalmente este trabajo se ha realizado con el permiso del Dr. Balmain, al que agradecemos su colaboración.

## 6. Bibliografía

1. Broman KW. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab Anim (NY)* 2001;30(7):44-52.
2. Li R, Tsaih SW, Shockley K, et al. Structural model analysis of multiple quantitative traits. *PLoS Genet* 2006;2(7):e114.
3. Abiola O, Angel JM, Avner P, et al. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet* 2003;4(11):911-6.
4. Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, et al. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 1993;75(4):631-9.
5. Broman kW. *A guide to QTL Mapping with R/qlt*. New York: Springer, 2009.
6. Spangrude GJ, Klein J, Heimfeld S, Aihara Y, Weissman IL. Two monoclonal antibodies identify thymic-repopulating cells in mouse bone marrow. *J Immunol*. 1989;142:425-430

7. Wu L, Scollay R, Egerton M, et al. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature*. 1991;349:71-74.
8. Busslinger M, Nutt SL, Rolink AG. Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:151-158.
9. Dendrou CA, Plagnol V, Fung E, Yang JH et al. Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat Genet* 41: 564 1011-1015, 2009.
10. Cope AP, Schulze-Koops H, and Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 25: S4-11, 2007.
11. Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, and Lakos G. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun* 29: 154-163, 2007.
12. Obinata M, Okuyama R, Matsuda KI, Koguma M, Yanai N. Regulation of myeloid and lymphoid development of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Leuk Lymphoma*. 1998;29: 61-69.
13. Mackay TF, Stone EA, Ayroles JF. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nat Rev Genet* 2009;10(8):565-77.
14. Galindo P. Una alternativa de representación simultánea: HJ-Biplot. *Questílio* 1986;10(1):13-23.
15. Gabriel KR. The biplot graphic display of matrices with application to principal components analysis. *Biometrics* 1971;58(3):453-467.
16. Cárdenas O, P. Galindo, and J.L. Vicente-Villardón. Los métodos Biplot: Evolución y Aplicaciones. *Revista Venezolana de Análisis de Coyuntura*. 2007;13(1):279-303.
17. Foulkes AS. *Applied Statistical Genetics with R*. London, 2009.
18. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995;11(3):241-7.
19. A package for Multivariate analysis using Biplot. [program], 2010.
20. Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 2003;19(7):889-90.
21. Jonathan Flint, William Valdar, Sagiv Shifman and Richard Mott. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 2005;(6):271-285.

22. Alison K. Bauer, Alvin M. Malkinson, and Steven R. Kleeberger. Susceptibility to neoplastic and non-neoplastic pulmonary diseases in mice: genetic similarities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L685–L703, 2004
23. Turcotte, K., Loredó-Osti, J. C., Fortin, P., Schurr, E., Morgan, K., and Gros, P., 2006. Complex genetic control of susceptibility to *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guerin) infection in wild-derived *Mus spretus* mice. *Genes Immun* 7, 684-687.
24. Dejager, L., Pinheiro, I., Bogaert, P., Huys, L., and Libert, C., 2010. Role for neutrophils in host immune responses and genetic factors that modulate resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the inbred mouse strain SPRET/Ei. *Infect Immun* 78, 3848-3860.
25. Babcock GF, Taylor AF, Hynd BA, Sramkoski RM, Alexander JW. Flow cytometric analysis of lymphocyte subset phenotypes comparing normal children and adults. *Diagn Clin Immunol* 1987;5(4):175-9.
26. Tripp RA, Hou S, McMickle A, Houston J, Doherty PC. Recruitment and proliferation of CD8+ T cells in respiratory virus infections. *J Immunol* 1995;154(11):6013-21.
27. Zhang ZL, Constantinou D, Mandel TE, Georgiou HM. Lymphocyte subsets in thymus and peripheral lymphoid tissues of aging and diabetic NOD mice. *Autoimmunity* 1994;17(1):41-8.
28. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995;1(12):1279-83.
29. Laura I. Rutitzky and Miguel J. Stadecker. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* 2011. 41: 2677–2687
30. Lynch RM, Naswa S, Rogers GL, Jr., et al. Identifying genetic loci and spleen gene coexpression networks underlying immunophenotypes in BXD recombinant inbred mice. *Physiol Genomics* 2010.
31. Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, et al. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun* 2007;29(2-3):154-63.
32. MacDonell KB, Chmiel JS, Poggensee L, Wu S, Phair JP. Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte counts and p24 antigenemia. *Am J Med* 1990;89(6):706-12.
33. Chen J, Harrison DE. Quantitative trait loci regulating relative lymphocyte proportions in mouse peripheral blood. *Blood* 2002;99(2):561-6.

4.2. *Schistosoma mansoni* infection in SPRET/Ei mice:  
a multivariate approach

# *S. mansoni* infection in SPRET/Ei mice: a multivariate approach

Pérez del Villar L.<sup>1</sup>, Vicente B.<sup>1</sup>, Galindo-Villardón P.<sup>2</sup>, Gutiérrez M.<sup>1</sup>, Castellanos A.<sup>3</sup>, Pérez-Losada J.<sup>3</sup>, Muro A.<sup>1</sup>

27th December 2012

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Castilla y León, SPAIN

<sup>2</sup>Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, Castilla y León, SPAIN

<sup>3</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Castilla y León, SPAIN

## Abstract

Most *Schistosoma mansoni* experimental infections are developed in several inbred strains of *Mus musculus* as definitive host. However, *Mus spretus* is unexplored mouse sub-specie in Schistosoma infection studies. *Mus spretus* provides a high variation in immunological phenotypes being an invaluable tool for genetic studies and gene mapping. The aim of this study is to characterize haematological and immunological response against *Schistosoma mansoni* infection in *Mus spretus* (SPRET/Ei) vs. *Mus musculus* (CD1) mice. Blood parameters and specific anti-IgG, IgG1 and IgG2a *Schistosoma mansoni* antibodies were determined at three, six, and nine weeks after infection. Nine weeks after cercarial exposure, animals were perfused and adult males and females were counted. The parasitological data suggest that SPRET/Ei mice can tolerated a higher parasite loads compared with CD1 strain. In addition, haematological parameters measured in SPRET/Ei group showed a significant increase in granulocytes population in early stages of infection compared with the CD1 cohort. Meanwhile CD1 presented higher levels of lymphocytes and IgG1 in the late stages of *S. mansoni* experimental infection.

# 1 Introduction

Schistosomiasis remains one of the most important parasitic disease affecting over 200 million human beings that causes 200,000 deaths per year. More than 10% of the world population were at risk of schistosomiasis in mid-2003 and approximately 207 million people were infected (Steinmann, et al., 2006). However, the pathology caused by *Schistosoma spp.* infection varies widely according to the combination of intensity of infection, ecological and social factors. These factors contribute towards the differential global infection and mortality rates (Campino, et al., 2006). Furthermore, schistosomiasis susceptibility is influenced by multiple genes as well as by gene-gene and gene-environment interactions (Flint, et al., 2005). In experimental infections, different inbred strains develop different degrees of *Schistosoma* pathology; among these mouse strains, CBA/2J and C3H strains develop significantly higher hepatic pathology than C57BL/6J (Farah, et al., 2001, Stavitsky, 2004). At the late stages of experimental infections, the decrease of peripheral neutrophils is associated with an increase of lesion size and fibrosis in CBA mice, whereas those effects were minimal in C57BL/6 strain, indicating that neutrophils play a regulatory role for granuloma formation (Hirata, et al., 2002). Furthermore, enhanced neutrophil apoptosis has been reported in neutropenic hepatosplenic schistosomiasis in humans (Aref, et al., 2004). Thus, identifying relevant haematological phenotypes involved in schistosomiasis susceptibility provides a useful insight into schistosomiasis pathogenesis in humans (Cooke and Hill, 2001, Smith, et al., 2009).

*Mus spretus* derived from wild mice collected in Southern France, Spain and Northern Africa (Hochepped, et al., 2004). Strains derived from wild *M. spretus* (i.e. SPRET/Ei) mice show different divergent phenotypes and higher genetic variability than common laboratory strains (for more details, see Mouse Phenome Database; <http://www.jax.org/phenome>). Furthermore, *M. spretus* diverged from *M. musculus* one to three million years ago (Veyrunes, et al., 2005). *M. spretus* shows obvious external morphological differences (small size and short tail) compared with *M. musculus*. Indeed, *M. spretus* has a reputation of being wild and aggressive, a poor breeder, and sensitive to stress. Furthermore, these mice have been useful for the identification of loci contributing to differences in immune response and inflammation (Staelens, et al., 2004, Stephan, et al., 2007). Thus, *M. spretus* has already proved to be useful as a tool for dissecting the genetic architecture of different complex traits including obesity, cancer and infectious diseases (Nagase, et al., 1999, To, et al., 2006). In addition, information about the susceptibility of *M. spretus* to experimental *S. mansoni* infection is not available.

To determine whether there were specific variations in immunological and haematological response against *S. mansoni* infection, we infected *M. spretus* mice (SPRET/Ei strain), and compared their immunological response and infection parameters with *M. musculus* (CD1) mice. We expect that the present work provide useful information to develop experimental crosses between *M. musculus* and *M. spretus* in order to determine genetic factors involved in the resistance/susceptibility to *S. mansoni* infection.



## 2 Materials and methods

### 2.1 *Parasite and mice*

*M. spretus* (SPRET/Ei) and *M. musculus* (CD1) were purchased from The Jackson Laboratory and maintained in the Animal Facility at the University of Salamanca. All animals were treated according to the provisions of the current European law on animal experimentation. Cercariae of *S. mansoni* were obtained from infected *Biomphalaria glabrata* snails breeding in the Laboratory of Immunological and Molecular Parasitology, CIETUS, at the University of Salamanca. Each mouse was infected subcutaneously with 150 *S. mansoni* cercariae. Blood samples were collected at 0, 3, 6 and 9 weeks after infection. Animals were perfused and adult male and female parasites were counted with a dissecting microscope (10 $\times$ ) as previously described (Siles-Lucas, et al., 2007). At the time of perfusion, small intestines and livers were collected and digested in 4%KOH for measuring the number of eggs deposited in these organs. Macroscopic lesions in the liver were quantified as granuloma affected surface per 100 mm<sup>2</sup> in each animal using the Image J software (Schneider, et al., 2012).

### 2.2 Haematological analysis

Fifty microliters of blood were collected in EDTA-coated tubes (Vacutainer®), then mixed and analysed using the HEMAVET system®, validated by manufacturer for the analysis of mouse blood. The following haematological parameters were measured: Total White Blood Cell (WBC, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), Neutrophil (NE, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), Lymphocyte (LY, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), Monocyte (MO, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), Eosinophil (EO, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), Basophil (BA, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), and Red Blood Cell (RBC, 10<sup>6</sup>cel/ $\mu$ L) counts, Haemoglobin (Hb, g/L), Haematocrit (HCT, %), Mean Corpuscular Volume (MCV,  $\mu$ 3), Mean Haemoglobin Corpuscular (MCH, pg.), Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC, g/dL), Red Cell Distribution Width (RDW) and Platelets (PLT, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L).

### 2.3 Quantitation of serum immunoglobulins

A measurement of specific antibodies (IgG, IgG1 and IgG2a) to Worm Antigen Product (SWAP) was performed using an indirect ELISA. The Specific Worm Antigen Product (SWAP) was obtained as previously described (Pardo, et al., 2004). ELISAs were performed by coating polystyrene plates (Costar) with 0.1 ml of 10 mg/ml SWAP in Phosphate Buffer Saline (PBS) overnight at 4°C. Plates were washed in PBS-Tween 20 and blocked with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in PBS for 1 hr. at 37°C. Plates were again washed and sera added at 1:1000 dilution and incubated overnight at 4°C. Detection antibodies were biotinylated affinity purified rabbit anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a. This step was followed by the addition of peroxidase-labelled anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a antibodies at 1:2000 dilution (Sigma). The reaction was developed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and orthophenylenediamine (Sigma) and measured at 492nm on an Ear400FT

ELISA reader (Lab Instruments). The results were expressed as means of the optical density from all the animals of each group plus the standard error (SEM).

## 2.4 Data analysis

Statistical significance of parasitological data was analyzed by Krustal-Wallis test. Results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). In all cases, we considered a statistically significant difference from chance at p-value  $<0.05$ . Differences with a p-value  $<0.05$  were considered as statistically significant. A multivariate approach was performed on haematological variables using Canonical Biplot (Amaro, 2003). The great advantage of a Biplot analysis is that its components can be interpreted very easily. First, correlations among the variables are related to the angles between the lines. An acute angle between two lines indicates a positive correlation between the two corresponding variables, while obtuse angles indicate negative correlation. Angle of 0 or 180 degrees indicates perfect positive or negative correlation, respectively. A pair of orthogonal lines represents a correlation of zero. The distances among individuals (mice) correspond to the similarities between the phenotypes profiles. Two observations that are relatively similar across all the variables will fall relatively close to each other within the two-dimensional space used for the Biplot (Zhang, et al., 2007). Additionally, Canonical Biplot allows group separation and the study of the influence of variables. The results are presented as dispersion diagrams with group and vector markers for the different variables (Amaro, 2003). All data were analyzed with the statistical software SPSS for Windows 11.5 (Lead Technologies) and visually display using lattice package developed in R (Sarkar, 2008). The multivariate approach was applied using the Multibiplot software (J.L., 2010).

## 3 Results

### 3.1 *S. mansoni* infection parameters vary between *M. musculus* and *M. spretus*

Regarding parasitological data, our results showed that the male, female and total worms recoveries were higher in SPRET/Ei than in CD1 mice, all significant results were reported in table-1. According to these recovery rates, we also noticed that eggs trapped in intestine and liver organs were significantly higher in SPRET/Ei, in addition, we also found a higher percentage of macroscopic lesions caused by *S. mansoni* eggs in SPRET/Ei mice compared with CD1 mice (table-1). Concerning the effect of the mouse gender on parasitological data, we did not observe any statistical differences regardless the strain of mice.

### 3.2 Antibodies against *S. mansoni* in SPRET/Ei and CD1 mice

Our results show a typical progressive enhancement on antibodies levels against SWAP during *S. mansoni* experimental infection in both subtypes of immunoglobulin analysed. Regarding IgG2a production, SPRET/Ei mice showed an increase of IgG2a levels compared with CD1 at 9 week post-infection (figure-1A). On the other hand, CD1 mice showed significant higher IgG1 levels at three and six weeks after infection compared with SPRET/Ei mice ( $p < 0.05$ ) (figure-1B).

### 3.3 Haematological responses to *S. mansoni* differ between SPRET/Ei and CD1 mice

We monitored the blood parameters at 0, 3, 6 and 9 weeks during the *S. mansoni* infection. The analysis was focused on white cells counts associated with the inflammatory response against *S. mansoni*. The differences on White Blood Cells and granulocytes between SPRET/Ei and CD1 were reported in table 3 and 4. Additionally, we evaluated through a multivariate point of view in both mouse subspecies at three, six and nine weeks after *S. mansoni* experimental infection (Figures 2, 3 and 4). The results after the Canonical Biplot analysis demonstrated that those mice included in the experiment, SPRET/Ei and CD1, can be perfectly differentiated in two clusters after *S. mansoni* infection. Regarding the white blood cells parameters at three weeks after infection, we observed that granulocytes levels highly correlated (BA, EO NE) among them. In addition, SPRET/Ei presented higher levels of monocytes and neutrophils compared to CD1 mice (Figure-2). Regarding haematological levels at 6 weeks after infection we could observe that higher levels of neutrophils, eosinophil and basophils continue to be associated to SPRET/Ei strain. On the other hand, higher levels of lymphocytes populations were significantly associated to CD1 mice (Figure-3). Finally, we noted that total WBCs and lymphocyte populations were significantly higher in CD1 strain at 9 weeks after infection ( $p < 0.05$ ) (figure-4).

## 4 Discussion

Several studies have reported differences in the hepatic fibrosis, granuloma size and other different phenotypes related with the resistance and susceptibility to schistosomiasis infection in different inbreed mouse strains (Bin Dajem, et al., 2008, Cheever, et al., 2002). For example, C57BL/6 mice show the highest degree of resistance to schistosomiasis, whereas CBA/2J mice develop the severe form of murine schistosomiasis probably due to a Th17 biased immune response (Rutitzky and Stadecker, 2011). However, no experimental studies have been developed in other mouse subspecies like SPRET/Ei or *Mus castaneus*. These mouse sub-species are useful for dissecting genetic determinants in susceptibility

and resistance to complex trait diseases due to their genetic divergence (Boumahrou, et al., 2011). Furthermore, SPRET/Ei mice have been valuable for the identification of genetic loci contributing to differences in immune response (Stephan, et al., 2007). In the present study, we characterized haematological features and immunophenotypes correlating with susceptibility of schistosomiasis disease in SPRET/Ei mice. This is the first exploratory study that describes the differences in *S. mansoni* infection in SPRET/Ei mice. Our results indicate that SPRET/Ei mice tolerates better *S. mansoni* infection than CD1 strain. Among the different parameters studied, the first finding related with the resistance/susceptibility to the experimental disease was the difference on intensity of infection rates. Regarding these parameters we noticed that SPRET/Ei strain was able to harbour a higher number of adult worms compared to CD1 strain, this pattern of infection was also observed in C57BL/6 resistant mice compared to other inbred strains (Rutitzky, et al., 2003). Additionally, we observed that SPRET/Ei presented significantly higher number of macroscopic lesions than CD1. The evaluation macroscopic granulomatous lesions are positively correlated with the intensity of infection useful for evaluating *S. mansoni* experimental infections (Shariati, et al., 2011).

In this study, we analysed the immunological and haematological profiles presented during *S. mansoni* infection in SPRET/Ei and CD1 mice. The variables studied were white blood cell counts, and determination of IgG, IgG1 and IgG2a isotype-specific subclasses. Previous studies in mice have shown that the Th2-response is associated with the production of IL-4 and high levels of IgG1, while the Th1-response is associated with the production of high levels of IFN $\gamma$  and IgG2a. Results showed that CD1 mice presented higher IgG1 levels at three and six weeks after infection suggesting a stronger Th2 immune response against the parasite compared with SPRET/Ei mice. The haematological features in both mouse subspecies were studied from a multivariate approach to provide a wider point of view of the host response to *S. mansoni* infection. Biplot methods are currently broadly used for biological data (Thiyagarajan, et al., 2012). In general, these methods allow the simultaneous representation of arrows (individuals) and columns (variables) of a given data, and the length of variable vectors (arrows) give a good indication as to which variable(s) had the largest influence, positive or negative, in discriminating the various samples (Cárdenas O, 2007, KR, 1971). Our results showed that SPRET/Ei mice differ from CD1 in the haematological response along the *S. mansoni* experimental infection. SPRET/Ei mice presented high levels of peripheral blood granulocytes (neutrophils, eosinophils and basophils) in the early stage of infection. These innate immune cells play a critical role in host defense mechanisms against invading pathogens, because they are rapidly recruited to the infection site. In addition, these cells types are present in the initiation and maintenance of chronic allergic inflammation, and they could play a protective role in the immune response against *S. mansoni* (Rumbley, et al., 1999). Published studies have shown that mast cells and eosinophils are able to produce IL-4 and modulate granuloma formation (Gessner, et al., 2005, Mohrs, et al., 2005). In addition, it has also been demonstrated that SPRET/Ei mice showed a high level of resistance to

infection of other pathogens, like *Salmonella enterica*, where macrophages and neutrophils play a critical role in controlling invading pathogens in the periphery by phagocytosis and the production of antimicrobial proteins (Dejager, et al., 2010). Furthermore, previous studies showed that SPRET/Ei is also strongly resistant to inflammation induced either by cytokines or by bacterial products (Turcotte, et al., 2006).

The present study highlight the importance of *Mus spretus* to unravel mechanisms of resistance/susceptibility against *S. mansoni* infection. Their elevated neutrophil counts could be a probable reason for the tolerability of SPRET/Ei mice against *S. mansoni* infection. Further dissection of the complex host response to *S. mansoni* infection, combined with the recent availability of the complete SPRET/Ei genome sequence, will contribute further to our understanding of the genetic control of host immunity against *S. mansoni* infection and the essential role of neutrophils in early immune defense mechanisms. The identification of such mechanisms and phenotypes associated to the resistance/susceptibility to *S. mansoni* infection could be translated into an effective disease intervention strategy not only for schistosomiasis but also for other infectious diseases.

## 5 Acknowledgements

We thank Dr. Julio López-Aban for his technical assistance. We also thank Luis Miguel Rincón for reviewing the manuscript.

## 6 Financial support

2010-13 (Fundación Areces) and funding of Junta de Castilla y Leon (Orden EDU/330/2008)

## 7 Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## 8 References

1. Amaro, I. R., Vicente-Villardón, J. L. y Galindo-Villardón, M. P., 2003. MANOVA Biplot para arreglos de tratamientos con dos factores basado en modelos Lineales Generales Multivariantes. (Manova-Biplot for two-way arrays based on Multivariate General Linear Models). *Interciencia* 29, 26-32.
2. Aref, S., El Refaei, M. F., Sakrana, M., and El-Nemre, H., 2004. Enhanced neutrophil apoptosis in neutropenic patients with hepatosplenic schistosomiasis: evidence of serum Fas ligand. *Hematology* 9, 71-78.

3. Bin Dajem, S. M., Mostafa, O. M., and El-Said, F. G., 2008. Susceptibility of two strains of mice to the infection with *Schistosoma mansoni*: parasitological and biochemical studies. *Parasitol Res* 103, 1059-1063.
4. Boumahrou, N., Bevilacqua, C., Beauvallet, C., Miranda, G., Andrei, S., Rebours, E., Panthier, J. J., Bellier, S., and Martin, P., 2011. Evolution of major milk proteins in *Mus musculus* and *Mus spretus* mouse species: a genoproteomic analysis. *BMC Genomics* 12, 80.
5. Campino, S., Kwiatkowski, D., and Dessein, A., 2006. Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. *Semin Immunol* 18, 411-422.
6. Cárdenas O, P. G., and J.L. Vicente-Villardón, 2007. Los métodos Biplot: Evolución y Aplicaciones. 13 1, 279-303.
7. Cheever, A. W., Lenzi, J. A., Lenzi, H. L., and Andrade, Z. A., 2002. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 917-940.
8. Cooke, G. S. and Hill, A. V., 2001. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2, 967-977.
9. Dejager, L., Pinheiro, I., Bogaert, P., Huys, L., and Libert, C., 2010. Role for neutrophils in host immune responses and genetic factors that modulate resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the inbred mouse strain SPRET/Ei. *Infect Immun* 78, 3848-3860.
10. Farah, I. O., Kariuki, T. M., King, C. L., and Hau, J., 2001. An overview of animal models in experimental schistosomiasis and refinements in the use of non-human primates. *Lab Anim* 35, 205-212.
11. Flint, J., Valdar, W., Shifman, S., and Mott, R., 2005. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 6, 271-286.
12. Gessner, A., Mohrs, K., and Mohrs, M., 2005. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* 174, 1063-1072.
13. Hirata, M., Hara, T., Kage, M., Fukuma, T., and Sendo, F., 2002. Neutropenia augments experimentally induced *Schistosoma japonicum* egg granuloma formation in CBA mice, but not in C57BL/6 mice. *Parasite Immunol* 24, 479-488.
14. Hocephied, T., Schoonjans, L., Staelens, J., Kreemers, V., Danloy, S., Puimege, L., Collen, D., Van Roy, F., and Libert, C., 2004. Breaking the species barrier: derivation of germline-competent embryonic stem cells from *Mus spretus* x C57BL/6 hybrids. *Stem Cells* 22, 441-447.

15. A package for Multivariate Analysis using Biplots. [program], 2010.
16. KR, G., 1971. The biplot graphic display of matrices with application to principal components analysis. *Biometrics* 58 453-467.
17. Mohrs, K., Wakil, A. E., Killeen, N., Locksley, R. M., and Mohrs, M., 2005. A two-step process for cytokine production revealed by IL-4 dual-reporter mice. *Immunity* 23, 419-429.
18. Nagase, H., Mao, J. H., and Balmain, A., 1999. A subset of skin tumor modifier loci determines survival time of tumor-bearing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15032-15037.
19. Pardo, J., Carranza, C., Turrientes, M. C., Perez Arellano, J. L., Lopez Velez, R., Ramajo, V., and Muro, A., 2004. Utility of *Schistosoma bovis* adult worm antigens for diagnosis of human schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot techniques. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 1165-1170.
20. Rumbley, C. A., Sugaya, H., Zekavat, S. A., El Refaei, M., Perrin, P. J., and Phillips, S. M., 1999. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J Immunol* 162, 1003-1009.
21. Rutitzky, L. I., Mirkin, G. A., and Stadecker, M. J., 2003. Apoptosis by neglect of CD4+ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 171, 1859-1867.
22. Rutitzky, L. I. and Stadecker, M. J., 2011. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma. *Eur J Immunol* 41, 2677-2687.
23. Sarkar, D., 2008. *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer.
24. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.
25. Shariati, F., Perez-Arellano, J. L., Carranza, C., Lopez-Aban, J., Vicente, B., Arefi, M., and Muro, A., 2011. Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. *Exp Parasitol* 128, 44-49.
26. Siles-Lucas, M., Uribe, N., Lopez-Aban, J., Vicente, B., Orfao, A., Nogal-Ruiz, J. J., Feliciano, A. S., and Muro, A., 2007. The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. *Vaccine* 25, 7217-7223.



27. Smith, P. M., Shainheit, M. G., Bazzone, L. E., Rutitzky, L. I., Poltorak, A., and Stadecker, M. J., 2009. Genetic control of severe egg-induced immunopathology and IL-17 production in murine schistosomiasis. *J Immunol* 183, 3317-3323.
28. Staelens, J., Puimege, L., Mahieu, T., Pynaert, G., Hochepped, T., Vandena-beele, A., Grooten, J., Kontoyiannis, D., Van Roy, F., Kollias, G., and Libert, C., 2004. Response of TNF-hypo-responsive SPRET/Ei mice in models of inflammatory disorders. *Mamm Genome* 15, 537-543.
29. Stavitsky, A. B., 2004. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect Immun* 72, 1-12.
30. Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., and Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6, 411-425.
31. Stephan, K., Smirnova, I., Jacque, B., and Poltorak, A., 2007. Genetic analysis of the innate immune responses in wild-derived inbred strains of mice. *Eur J Immunol* 37, 212-223.
32. Thiyagarajan, D., Fismen, S., Sereckina, N., Jacobsen, S., Elung-Jensen, T., Kamper, A. L., Fenton, C. G., Rekvig, O. P., and Mortensen, E. S., 2012. Silencing of renal DNaseI in murine lupus nephritis imposes exposure of large chromatin fragments and activation of Toll like receptors and the Clec4e. *PLoS One* 7, e34080.
33. To, M. D., Perez-Losada, J., Mao, J. H., Hsu, J., Jacks, T., and Balmain, A., 2006. A functional switch from lung cancer resistance to susceptibility at the *Pas1* locus in *Kras2LA2* mice. *Nat Genet* 38, 926-930.
34. Turcotte, K., Loredó-Osti, J. C., Fortin, P., Schurr, E., Morgan, K., and Gros, P., 2006. Complex genetic control of susceptibility to *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guerin) infection in wild-derived *Mus spretus* mice. *Genes Immun* 7, 684-687.
35. Veyrunes, F., Britton-Davidian, J., Robinson, T. J., Calvet, E., Denys, C., and Chevret, P., 2005. Molecular phylogeny of the African pygmy mice, subgenus *Nannomys* (Rodentia, Murinae, *Mus*): implications for chromosomal evolution. *Mol Phylogenet Evol* 36, 358-369.
36. Zhang, Z. D., Paccanaro, A., Fu, Y., Weissman, S., Weng, Z., Chang, J., Snyder, M., and Gerstein, M. B., 2007. Statistical analysis of the genomic distribution and correlation of regulatory elements in the ENCODE regions. *Genome Res* 17, 787-797.

Table 1: Worms recovery and eggs counts in hepatic and intestinal tissues of SPRET/Ei and CD1 mice

Sex	Mice	Worm recovery			Total	Egg density			Lesions/cm <sup>2</sup>
		Male	Female			Liver	Intestine		
Female	SPRET/Ei	21.0 (9.8)*	31.8 (18.1)*	52.8 (27.8)*	11571.3 (5731.5)*	15154.8 (8830.4)*		44.5 (1.4)	
	CD1	4.8 (1.7)	5.2 (2.0)	10.0 (3.7)	4185.2 (1585.3)	2600.6 (1367.5)		38.6 (4.7)	
Male	SPRET/Ei	18.0 (6.1)	21.0 (7.5)	38.3 (13.4)	17749.3 (5048.9)	33206.3 (14678.7)		49.6 (2.0)*	
	CD1	10.2 (2.3)	11.4 (2.4)	21.6 (4.7)	6693.6 (940.5)	6440.2 (2314.5)		35.8 (2.1)	

Mean (SEM) \*p<0.05

Table 2: Summary of blood parameters in SPRET/Ei and CD1 during *S. mansoni* infection

Mice	Sex	Mice	White Blood Cells ( $10^3$ cel./ $\mu$ L)	Lymphocytes ( $10^3$ cel./ $\mu$ L)	Monocytes ( $10^3$ cel./ $\mu$ L)
Healthy	Female	SPRET/Ei	5.6 (1.4)	2.93 (0.65)	0.52 (0.09)
		CD1	4.95 (0.8)	3.30 (0.60)	0.42 (0.08)
	Male	SPRET/Ei	6.64 (1.13)	1.95(0.26)	0.57 (0.07)*
		CD1	5.11 (0.4)	3.61 (0.32)*	0.33 (0.02)
3 <sup>th</sup> week	Female	SPRET/Ei	13.7 (1.9)*	6.94 (0.86)*	0.99 (0.09)*
		CD1	5.62 (0.6)	3.53 (0.26)	0.44 (0.07)
	Male	SPRET/Ei	5.29 (0.37)	3.22 (0.51)*	0.32 (0.03)
		CD1	4.95 (0.7)	1.43 (0.32)	0.31 (0.03)
6 <sup>th</sup> week	Female	SPRET/Ei	6.0 (0.9)	2.55 (0.51)	0.56 (0.03)
		CD1	7.14 (1.14)	4.18 (0.64)	0.896 (0.18)
	Male	SPRET/Ei	6.8 (0.6)	2.12 (0.27)	0.730 (0.04)
		CD1	8.14 (1.04)	5.07 (0.78)*	0.581 (0.11)
9 <sup>th</sup> week	Female	SPRET/Ei	6.51 (1.37)	1.92 (0.51)	0.67 (0.10)
		CD1	5.78 (0.54)	3.16 (0.46)	0.44 (0.03)
	Male	SPRET/Ei	6.74 (1.74)	2.19 (1.04)	0.60 (0.13)
		CD1	11.24 (1.29)*	5.15 (0.61)*	0.71 (0.10)

Mean (SEM) \*p<0.05

Table 3: Summary of granulocytes in SPRET/Ei and CDI during *S. mansoni* infection

Mice	Sex	Mice	Neutrophils (10 <sup>3</sup> cel./µL)	Eosinophils (10 <sup>3</sup> cel./µL)	Basophils (10 <sup>3</sup> cel./µL)
Healthy	Female	SPRET/Ei	1.89 (0.57)	0.23 (0.13)	0.07 (0.05)
		CDI	1.15 (0.26)	0.06 (0.02)	0.02 (0.00)
	Male	SPRET/Ei	3.93 (1.14)*	0.15 (0.02)	0.04 (0.01)
		CDI	1.05 (0.09)	0.08 (0.02)	0.02 (0.00)
3 <sup>th</sup> week	Female	SPRET/Ei	5.25 (0.87)*	0.41(0.2)	0.07 (0.05)
		CDI	1.48 (0.22)	0.13 (0.05)	0.04 (0.02)
	Male	SPRET/Ei	3.36 (0.34)*	0.14(0.05)	0.03(0.01)
		CDI	1.38 (0.22)	0.03 (0.01)	0.00 (0.00)
6 <sup>th</sup> week	Female	SPRET/Ei	2.80 (0.59)	0.08 (0.03)	0.02 (0.01)
		CDI	1.99 (0.41)	0.05 (0.02)	0.01 (0.00)
	Male	SPRET/Ei	3.86 (0.29)*	0.06 (0.02)	0.02 (0.00)
		CDI	2.43 (0.24)	0.04 (0.01)	0.01 (0.00)
9 <sup>th</sup> week	Female	SPRET/Ei	3.67 (0.75)	0.19 (0.09)	0.02 (0.01)
		CDI	2.05 (0.20)	0.10 (0.03)	0.02 (0.01)
	Male	SPRET/Ei	3.86 (0.63)	0.06 (0.03)	0.01 (0.00)
		CDI	5.21(1.00)	0.13 (0.02)	0.01 (0.00)

Mean (SEM) \*p<0.05

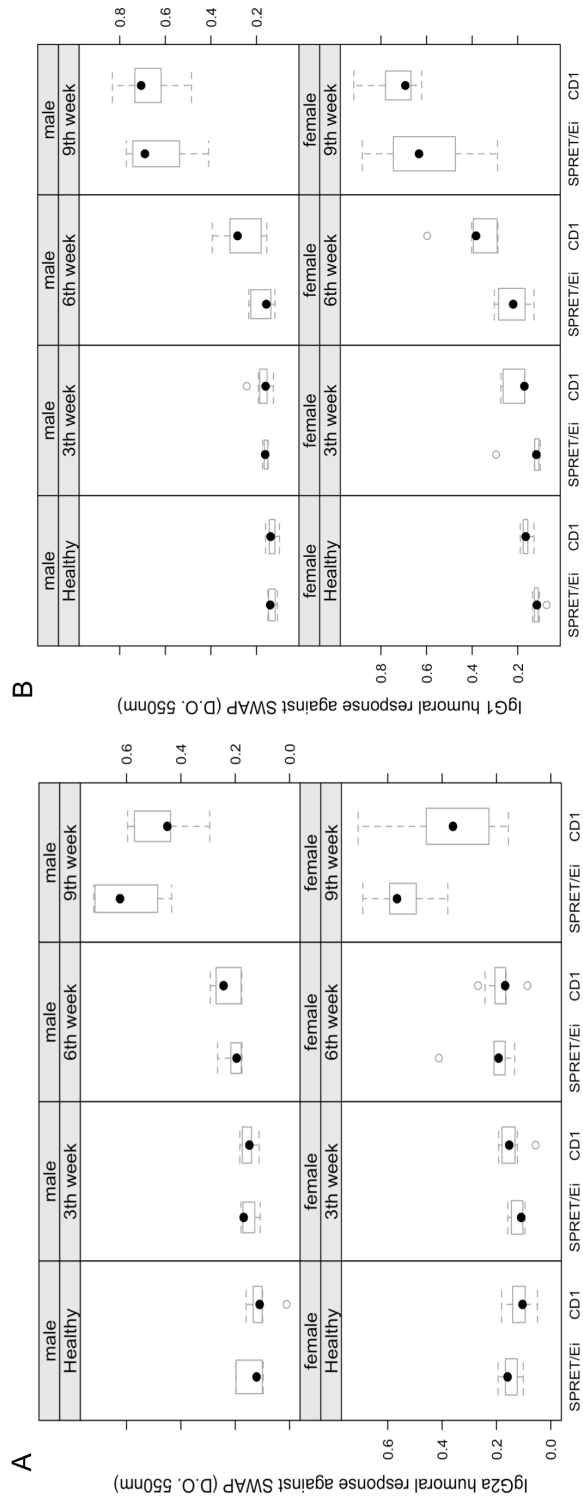


Figure 1: Trellis graph displays the levels of IgG2a (A) and IgG1 (B) along *S. mansoni* infection, conditioned on sex and strain of mice.

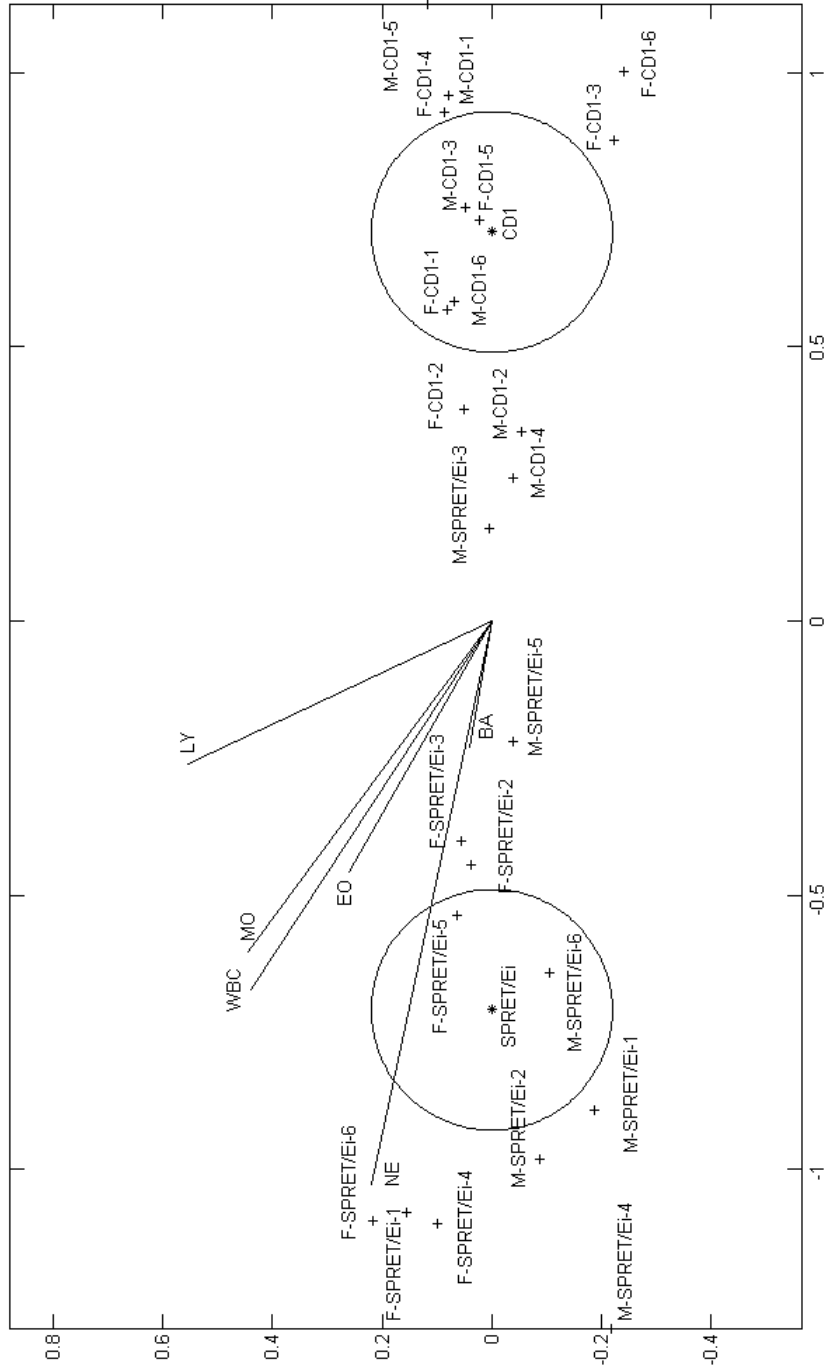


Figure 2: Canonical Biplot analysis of SPRET/Ei vs. CD1 mice at 3 weeks after infection. White Blood Cell (WBC), Neutrophil (NE), Lymphocyte (LY), Monocyte (MO), Eosinophil (EO) and basophil counts (BA).

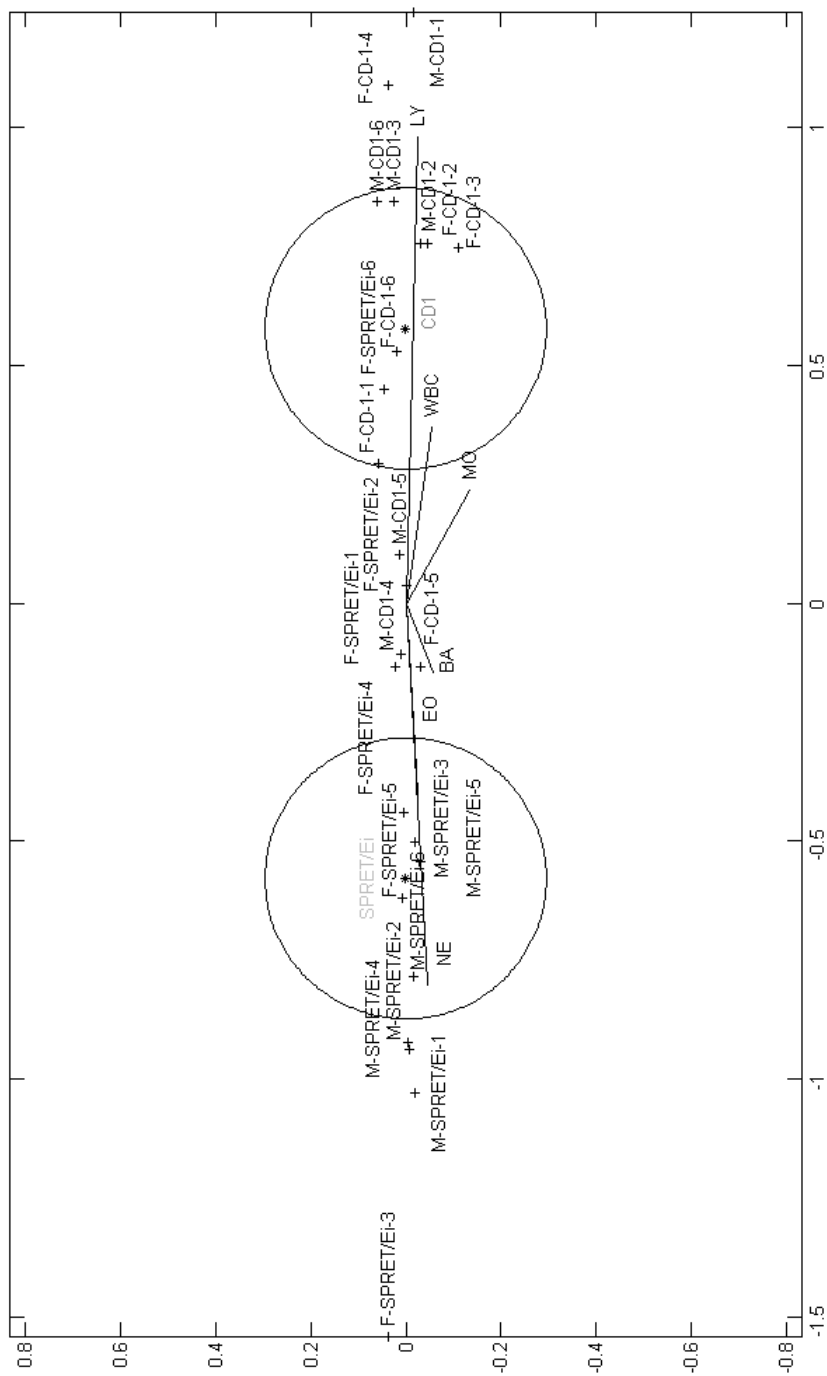


Figure 3: Canonical Biplot analysis of SPRET/Ei vs. CD1 mice at 6 weeks after infection. White Blood Cell (WBC), Neutrophil (NE), Lymphocyte (LY), Monocyte (MO), Eosinophil (EO) and basophil count (BA).



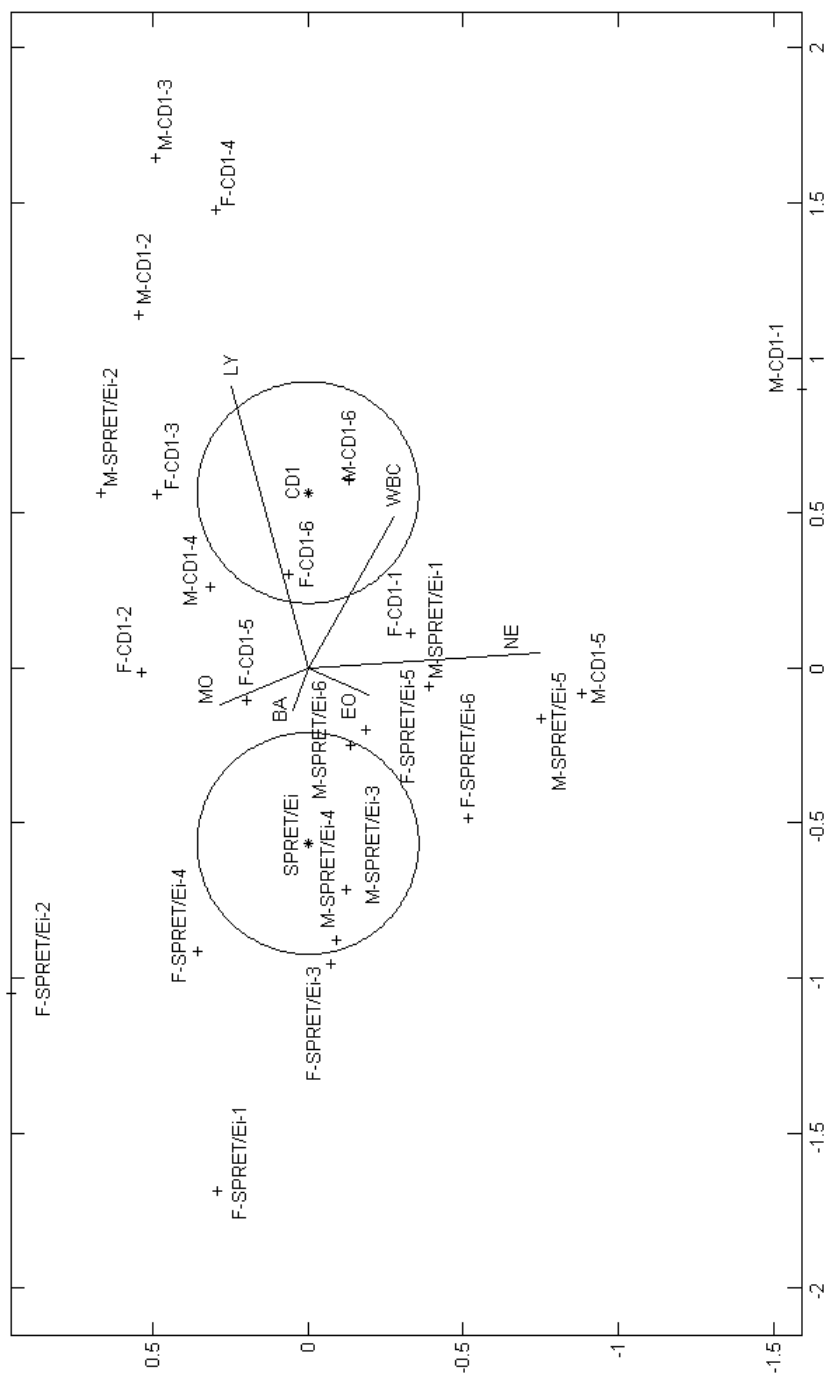


Figure 4: Canonical Biplot analysis of SPRET/Ei vs. CD1 mice at 9 weeks after infection, respectively. White Blood Cell (WBC), Neutrophil (NE), Lymphocyte (LY), Monocyte (MO), Eosinophil (EO) and basophil count (BA).

**4.3. Identifying phenotypes involved in the susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection in F1B6CBA mice**

Identifying phenotypes involved in susceptibility  
to *Schistosoma mansoni* infection  
in F1B6CBA mice

Pérez del Villar L.<sup>1</sup>, Gutiérrez M.<sup>1</sup>, Vicente B.<sup>1</sup>,  
Castellanos A.<sup>2</sup>, Pérez-Losada J.<sup>2</sup>, Muro A.<sup>1</sup>

28th December 2012

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Castilla y León, SPAIN

<sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Castilla y León, SPAIN

**Abstract**

Schistosomiasis is a disease with a strong genetic component and also influenced by socioeconomic and ecological factors. Epidemiological studies have identified different genetic regions involved in the individual susceptibility to this infection and in the degree of hepatic fibrosis. However, it is not well known what physiological traits are predisposing to the disease. The study of experimental infections in inbred mouse strains with variable genetic susceptibility to the disease offers a good opportunity to tackle this question. F1B6CBA hybrid between the most divergent strains was infected in order to characterize the immunophenotypes that correlate with the susceptibility of schistosomiasis disease in mice. Complete blood counts and immunophenotype were determined at 0, 3, 6, and 9 weeks post-infection. Nine weeks after cercariae exposure, animals were perfused and worm recovery was assessed. A large number of hepatic lesions, a reduction in the eosinophil and basophil count in the acute phase of infection and the decreased number of monocytes, neutrophils and B-lymphocytes are phenotypes associated with increased susceptibility to *S. mansoni* infection.

# 1 Introduction

Schistosomiasis is an infectious disease with a strong genetic component influenced by socioeconomic, environmental and ecological factors [1]. The immune response plays a central role on the development of severe forms of schistosomiasis, although others factors like infection intensity, nutritional status or genetic background of patients may influence the severity of schistosomiasis [2]. *S. mansoni* may cause markedly varied patterns of immune response during the course of the infection [2-4]. The immunopathology of *S. mansoni* infection consists of skin inflammation (cercariae dermatitis) and granulomatous reaction in response to the tissue-trapped parasite eggs [5]. Therefore, *S. mansoni* infection causes most of the damage in the liver where maximum egg accumulation occurs [3].

Mononuclear cells, neutrophils and eosinophils play a main role in the early stages of granuloma, being an important source of proinflammatory chemokines [6]. However, the development of long-lived organized granulomatous lesions around eggs is wholly dependent on CD4+ T lymphocytes [7]. An effective T-cell response is known to be critical for the development of the granulomatous response and host survival. Although the role of CD8+ cells in the immune response against *S. mansoni* is still unclear, this subtype of lymphocytes around the granuloma has been identified suggesting that CD8+ cells act as suppressors of Th2 cell function thereby regulating granulomatous inflammation [8].

The susceptibility to schistosomiasis presents the classic complex disease phenotype [9, 10]. Mouse experimental crosses have been a suitable strategy for mapping genes involved in different complex diseases including the immune response against *S. mansoni* [11, 12]. Several studies report differences in the hepatic fibrosis or granuloma size in different inbred mouse lines [13-15]. C57/BL6 mice show the highest degree of resistance to schistosomiasis, whereas CBA/2J mice develop the severe form of murine schistosomiasis [16, 17]. Hybrids between those strains (F1B6CBA) mice are heterozygous for those loci that differ between both parental strains but are genetically uniform. In spite of the participation of different white blood cells subpopulations in schistosomiasis pathogenesis, blood parameters have not been explored as putative biomarkers of schistosomiasis susceptibility. The analysis of these phenotypes could help to understand the differences in the susceptibility to *S. mansoni* infection. In the current study, we evaluated the degree of susceptibility to schistosomiasis of F1B6CBA2J hybrids and their parental counterparts (CBA/2J and C57BL/6); we also characterized the immuno- and haematological phenotypes that correlate with susceptibility of schistosomiasis in mice.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Parasite and mice

Mice were housed and handled under standard animal laboratory conditions according to European Union (EU) regulations. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Salamanca. We used 8 male, 7 female from the parental strains CBA/2J and C57BL/6J, respectively; and 16 male and 17 female F1 hybrid mice (F1B6CBA2J) hybrid. Mice were purchased from Charles River Laboratory (France). Cercariae of *S. mansoni* were obtained from infected *Biomphalaria glabrata* snails breeding in the Laboratory of Immunological and Molecular Parasitology, University of Salamanca. Each mouse was subcutaneously infected with 150 *S. mansoni* cercariae. Blood samples were collected at 0, 3, 6 and 9 weeks after infection. Animals were perfused and adult parasites were counted with a dissecting microscope at 10 $\times$  magnification 9 weeks after infection. At the time of perfusion, the liver was also collected for measurement of egg counts. Then, liver tissue was digested in 4%KOH, as previously described [18]. Macroscopic lesions of liver were quantified as granuloma affected surface per 100 mm<sup>2</sup> in each animal using imageJ software [19].

### 2.2 Quantification of specific antibodies against *S. mansoni*

Serum was collected 0, 3, 6 and 9 weeks after infection and immunoglobulin levels were determined. The Specific Worm Antigen Product (SWAP) were obtained as previously described [20]. ELISAs were performed by coating polystyrene plates (Costar) with 0.1 ml of 10 mg/ml SWAP in Phosphate Buffer Saline (PBS) overnight at 4°C. Plates were washed in PBS-Tween 20 and blocked with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in PBS for 1 hr. at 37°C. Plates were again washed and sera added at 1:1000 dilution and incubated overnight at 4°C. Antibodies were detected by the addition of peroxidase-labelled anti-mouse IgG1 or IgG2a antibodies at 1:2000 dilution (Sigma). The reaction was developed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and orthophenylenediamine (Sigma) and measured at 492nm on an Ear400FT ELISA reader (Lab Instruments). The results are expressed as means of the optical density from all the animals of each group plus the standard error.

### 2.3 Haematological analysis

Blood was collected in EDTA-coated tubes (Vacutainer®). Fifty microliters of blood were analysed using HEMAVET system®. The following haematological parameters were measured: White Blood Cell (WBC, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), neutrophil (NE, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), lymphocyte (LY, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), monocyte (MO, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L), eosinophil (EO, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L) and basophil count (BA, 10<sup>3</sup>cel/ $\mu$ L). Red Blood Count (RBC, 10<sup>6</sup>cel/ $\mu$ L), Haemoglobin (Hb, g/L), Haematocrit (HCT, %), Mean Corpuscular Volume (MCV,  $\mu$ 3), Mean Haemoglobin Corpuscular (MCH, pg), Mean

Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC, g/dL), Red Cell Distribution Width (RDW) and platelet (PLT, 103cel/ $\mu$ L).

## 2.4 Flow cytometry analysis

Red blood cells were lysed using red cell lysis buffer (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Following centrifugation the white blood cell pellet was washed in PBS with 2% FBS and then stained with appropriate combinations of the following antibodies purchased from BD Biosciences: CD45-PERCP-Cy5 (553092), CD8b-PE (550798), CD4 FITC (553047), B220-APC (553092). After 30 minutes of antibody incubation, samples were washed again and then stored on ice in the dark until analysed by flow cytometer. Acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer; at least 10.000 cells per sample were acquired. Data analysis was performed using FlowJo software (Tree Star). Steps involved in the analyses of immunophenotypes were included in figure 1.

## 2.5 Statistical analysis

Differences between groups were examined for statistical significance using the Kruskal-Wallis test. Spearman correlations were computed between each pair of phenotypes. Differences with a p-value  $<0.05$  were considered as statistically significant and all test were two-sided. Statistical analyses were performed using R [21].

# 3 Results

## 3.1 Mortality and parasite burden in F1CBAB6 compared with their parental progenitors

No deaths were observed on C57BL/6 compared with a 37.5% mortality rate in CBA/2J mice ( $p<0.04$ ). Meanwhile, F1B6CBA hybrid mice presented a 15.2% of mortality. In the present study, we have observed the highest parasite recovery in C57BL/6 compared with CBA/2J and F1B6CBA hybrid mice under experimental *S. mansoni* infection. Meantime, CBA/2J was the strain with the highest eggs counts ( $p<0.001$ ) and hepatic lesions in liver ( $p<0.001$ ). These data confirm that CBA/2J mice had a significantly higher hepatic damage than C57/BL6. Although F1CBAB6 hybrid mice tend to have similar values to C57/BL6 mice in egg density, no significant differences were observed with CBA/2J parental strain. (table 1).

## 3.2 Haematological response to *S. mansoni* infection in CBA/2J, C57/BL6 and F1CBAB6 hybrid mice

The haematological parameters were measured following the schedule of determinations at 0, 3, 6 and 9 weeks after infection. We compared F1CBAB6 hybrid

with both parental counterparts. Regarding the red blood parameters, we observed that CBA/2J mice showed anaemia induced by the infection as judged by the significant decrease of the Hb content ( $p = 0.003$ ) and the RBC count ( $p = 0.007$ ) at nine week after infection compared with C57BL/6J strain. In addition, CBA/2J mice showed a significant decrease in PLT count ( $p=0.03$ ). F1B6CBA hybrid showed intermediate levels of RBC, Hb and PLT (Figure 2).

On the white cells parameters, we noted that the levels of lymphocytes and neutrophils in C57BL/6J were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in CBA/2J along the entire period of the infection; furthermore, at 9 week after infection C57BL/6J also presented higher levels of monocytes ( $p < 0.001$ ). The hybrid F1B6CBA showed similar levels of lymphocytes, monocytes and neutrophils than CBA/2J. Interestingly, C57BL/6J strain showed a maximum peak of eosinophil and basophil levels at the third week after infection, something that was not present in F1B6CBA hybrids and CBA/2J strain (Figure 3).

### **3.3 Specific antibodies response and lymphocytes subpopulation analysis to *S. mansoni* infection in F1CBAB6 compared with their parental progenitors**

With respect to humoral response, figure 4 illustrates the level of SWAP-specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies in F1CBAB6 hybrid and both parental strains. We describe the highest differences between the parental strains at 9th week after infection. At this time the levels of IgG, IgG1 and IgG2a were significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in CBA/2J mice compared to C57BL/6 and F1CBAB6, suggesting that C57/BL6 presents a more effective humoral immune response against *S. mansoni*.

We analysed lymphocytes subpopulations on F1CBAB6 mice and their parental counterparts at different times of infection (figure 5). Globally, it was observed that CD4 T-lymphocytes count increased at the 3th week post-infection, however at 6th and 9th weeks after infection in C57BL6, CBA/2J and hybrid F1CBAB6 mice it was observed a decrease on CD4 T-lymphocytes. CBA/2J susceptible strain showed a higher percentage of CD4 T-lymphocytes compared with C57BL/6 at 3 weeks post-infection ( $p < 0.05$ ), while the hybrid F1CBAB6 presented an intermediate count. No significant differences between parental strains were observed at week 6 and 9 post-infection. Regarding CD8+ lymphocytes we noted that CBA/2J showed significant diminished CD8+ levels at 3 and 6 weeks post-infection compared with C57/BL6 strain ( $p < 0.05$ ). Meanwhile F1CBAB6 presented intermediate levels of CD8+ lymphocytes. With respect to circulating lymphocytes B, it was noticed that C57BL/6J mice showed a significantly higher level of circulating B cells compared with CBA/2J and F1CBAB6 hybrid ( $p < 0.05$ ) along *S. mansoni* infection. The high levels of circulating B cells in C57/BL6 are highly correlated with the production of total IgG levels ( $p = 0.003$ ). Moreover, CBA/2J strain presented a decrease of circulating B cells after the third week after infection, whereas F1CBAB6 hybrid increased

this lymphocyte population at six and nine weeks after infection.

## 4 Discussion

In this study we confirmed the differences of *S. mansoni* infection between C57BL/6 and CBA/2J inbred mouse strains and we described the degree of schistosomiasis susceptibility in F1B6CBA hybrid. The results obtained clearly showed that C57BL/6 tolerate better *S. mansoni* infection than CBA/2J. Among the different parameters studied, the first finding related with the resistance/susceptibility to experimental infection was the difference on mortality rates; indeed, C57BL/6 survived longer than CBA/2J strain. The mortality of hybrid F1B6CBA showed intermediate values between both parental strains, and therefore indicates a degree of susceptibility to infection also intermediate between the parental strains.

The second important finding associated with the resistance/susceptibility to *S. mansoni* infection is the schistosomiasis-related iron deficiency. Our results showed that CBA/2J presented high level of anaemia compared with C57/BL6 mice. Different aetiologies could explain the relationship between schistosomiasis and anaemia: (i) iron deficiency due to extra-corporeal loss; (ii) splenic sequestration; (iii) autoimmune haemolysis; and (iv) anaemia and inflammation playing a simultaneous role [22]. Thus, experimental cross could be an appropriate methodology for mapping genes involved in the development anaemia in *S. mansoni* infection.

Thirdly, regarding the intensity of infection, C57BL/6 mice were able to harbour a higher number of adult worms than CBA/2J strain. According to other authors, the behaviour of the CBA/2J strain could be explained because most of the mice with high numbers of adult worms have died during the experiment, and only those containing fewer would have survived [23]. On the other hand, we observed that CBA/2J presented higher number trapped eggs in liver. In addition, we also observed that the CBA/2J strain presented a significantly higher granuloma affected surface compared with C57BL/6. The evaluation macroscopic granulomatous lesions are positively correlated with the intensity of infection and it is useful for evaluating *S. mansoni* experimental pathology [24]. These results confirm that CBA/2J presented high grade of susceptibility against *S. mansoni* infection showing a high grade of hepatic damage [25].

In the present study, we also characterized haematological features and immunophenotypes correlating with susceptibility of experimental *Schistosoma* infection. The variables studied were the magnitudes associated with the immune response: cell blood counts, lymphocyte subpopulations (B-cells, CD4 and CD8 T lymphocytes), and detection of IgG, IgG1, IgG2a isotype-specific antibodies and subclasses. B-cells are required for Th2 T-cell responses but not for granuloma formation late in infection [26]. In addition B-cells are responsible for producing specific antibodies against multicellular pathogens. For this reason, high levels of B-cells correlate with high levels of immunoglobulins in C57BL/6 resistant strain. Studies in mice have shown that the Th2 response is associated



with the production of IL-4 and high levels of IgG1 while the Th1 response is associated with the production of high levels of IFN $\gamma$  and IgG2a [27]. We should remark the low level of IgG1 and IgG2a antibodies in CBA/2J mice. Recently, it has been reported that CBA/2J have a Th17-type dominant response against *S. mansoni*, which could be the cause of their increased vulnerability to schistosomiasis [28].

Multiple studies conducted in mice showed that CD4 T-lymphocytes are essential for granuloma formation and to orchestrate the immune response to *S. mansoni* infection [29]. In this sense, we found an increase in the T-CD4 levels at initial stages of *S. mansoni* infection followed by a deep suppression of T-CD4+ expression in F1CBAB6 and their parental strains. Several studies have indicated that schistosomes are able to induce the death of CD4+ T cells through the binding of Fas-ligand [30]. Interestingly, we found that C57/BL6 presented higher levels in monocytes population at nine weeks after infection than CBA/2J. Monocytes population to mobilize and traffic to where they are needed is central for their functions in promoting immune defense during infection and in driving inflammatory diseases, and play an important role mediating host antimicrobial defense. In our study, we described a higher number of neutrophils in C57/BL6 resistant strain compared with CBA/2J and F1CBAB6 along the *S. mansoni* experimental infection. This type of granulocytes population has also a key role in the pathogenesis of schistosomiasis. Published studies have shown that mast cells and eosinophils are able to produce IL-4 and modulate granuloma formation [31, 32]. Our results showed high levels of peripheral blood eosinophils and basophils at the early stage of infection (third week after infection) in C57/BL6 strain. Both cells types are present in the initiation and maintenance of chronic allergic inflammation, and they could play a protective role in the immune response against *S. mansoni* [33].

CD8 T-Lymphocytes are a cell population that has traditionally been associated with Th1 immune response against intracellular pathogens. However, it has been shown that this cell population can process an immune response against extracellular pathogens before antigen presentation by Major Histocompatibility Complex I (MHCI) [34, 35]. In addition, the murine model of schistosomiasis reported the presence of infiltrating CD8 cytotoxic T-lymphocytes in the granuloma reaction around eggs [8]. In our study C57BL/6 strain presented high levels of CD8 cytotoxic T-lymphocytes at 3 and 6 weeks after infection. Therefore, this subtype of lymphocytes could be involved in the modulation of Th-2 immune response characteristic of the chronic phase of this disease, maybe minimizing the damage associated with the immune granuloma formation. Taken together, comparative analysis on the immunophenotype showed the following data associated with resistance in C57BL/6 inbred mice: (1) high level of lymphocytes, neutrophils and monocytes during *S. mansoni* infection, (2) high level of eosinophils and basophils 3 weeks after infection, and (3) an efficient Th1/Th2 humoral immune response with increased IgG1 and IgG2a. The results in F1CBAB6 hybrid mice demonstrated an intermediate survival and middle Th1/Th2 humoral immune response. Futures studies will be performed in a backcross population in order to identify Quantitative Trait Loci

involved in the susceptibility to schistosomiasis.

## 5 Acknowledgements

We thank Dr. Julio López-Aban for his technical assistance. We also thank Javier Carreras for reviewing the manuscript.

## 6 Financial support

The present study was supported by a grant from the Areces Foundation (2010-13) and funding of the Junta de Castilla y Leon (Orden EDU/330/2008).

## 7 Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## 8 References

1. Campino, S., Kwiatkowski, D., and Dessein, A. (2006). Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. *Seminars in immunology* 18, 411-422.
2. Pearce, E.J., and MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2, 499-511.
3. Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., and Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106-1118.
4. Stadecker, M.J., Asahi, H., Finger, E., Hernandez, H.J., Rutitzky, L.I., and Sun, J. (2004). The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev* 201, 168-179.
5. Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleight, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., and McManus, D.P. (2002). Schistosomiasis. *N Engl J Med* 346, 1212-1220.
6. Burke, M.L., Jones, M.K., Gobert, G.N., Li, Y.S., Ellis, M.K., and McManus, D.P. (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol* 31, 163-176.
7. Gause, W.C., Urban, J.F., Jr., and Stadecker, M.J. (2003). The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol* 24, 269-277.

8. Pedras-Vasconcelos, J.A., and Pearce, E.J. (1996). Type 1 CD8+ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 157, 3046-3053.
9. Bethony, J.M., and Quinnell, R.J. (2008). Genetic epidemiology of human schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop* 108, 166-174.
10. Cooke, G.S., and Hill, A.V. (2001). Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2, 967-977.
11. Rutitzky, L.I., Hernandez, H.J., Yim, Y.S., Ricklan, D.E., Finger, E., Mohan, C., Peter, I., Wakeland, E.K., and Stadecker, M.J. (2005). Enhanced egg-induced immunopathology correlates with high IFN-gamma in murine schistosomiasis: identification of two epistatic genetic intervals. *J Immunol* 174, 435-440.
12. Smith, P.M., Shainheit, M.G., Bazzone, L.E., Rutitzky, L.I., Poltorak, A., and Stadecker, M.J. (2009). Genetic control of severe egg-induced immunopathology and IL-17 production in murine schistosomiasis. *J Immunol* 183, 3317-3323.
13. Cheever, A.W. (1986). The intensity of experimental schistosome infections modulates hepatic pathology. *Am J Trop Med Hyg* 35, 124-133.
14. Cheever, A.W., Dunn, M.A., Dean, D.A., and Duvall, R.H. (1983). Differences in hepatic fibrosis in ICR, C3H, and C57BL/6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 32, 1364-1369.
15. Cheever, A.W., Lenzi, J.A., Lenzi, H.L., and Andrade, Z.A. (2002). Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 917-940.
16. Fanning, M.M., Peters, P.A., Davis, R.S., Kazura, J.W., and Mahmoud, A.A. (1981). Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. *J Infect Dis* 144, 148-153.
17. Bosshardt, S.C., Freeman, G.L., Jr., Secor, W.E., and Colley, D.G. (1997). IL-10 deficit correlates with chronic, hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 19, 347-353.
18. Siles-Lucas, M., Uribe, N., Lopez-Aban, J., Vicente, B., Orfao, A., Nogal-Ruiz, J.J., Feliciano, A.S., and Muro, A. (2007). The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. *Vaccine* 25, 7217-7223.
19. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.

20. Pardo, J., Carranza, C., Turrientes, M.C., Perez Arellano, J.L., Lopez Velez, R., Ramajo, V., and Muro, A. (2004). Utility of *Schistosoma bovis* adult worm antigens for diagnosis of human schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot techniques. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 1165-1170.
21. Team, R.D.C. (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. (Vienna, Austria).
22. Friedman, J.F., Kanzaria, H.K., and McGarvey, S.T. (2005). Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. *Trends Parasitol* 21, 386-392.
23. Cheever, A.W., Duvall, R.H., Hallack, T.A., Jr., Minker, R.G., Malley, J.D., and Malley, K.G. (1987). Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 37, 85-97.
24. Shariati, F., Perez-Arellano, J.L., Carranza, C., Lopez-Aban, J., Vicente, B., Arefi, M., and Muro, A. (2011). Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. *Experimental parasitology* 128, 44-49.
25. Rutitzky, L.I., and Stadecker, M.J. (2011). Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma. *European journal of immunology* 41, 2677-2687.
26. Ji, F., Liu, Z., Cao, J., Li, N., Zuo, J., Chen, Y., Wang, X., and Sun, J. (2008). B cell response is required for granuloma formation in the early infection of *Schistosoma japonicum*. *PLoS One* 3, e1724.
27. Lawrence, R.A., Allen, J.E., Osborne, J., and Maizels, R.M. (1994). Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice. *J Immunol* 153, 1216-1224.
28. Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., and Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7, 975-987.
29. Davies, S.J., Grogan, J.L., Blank, R.B., Lim, K.C., Locksley, R.M., and McKerrow, J.H. (2001). Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. *Science* 294, 1358-1361.
30. Rutitzky, L.I., Mirkin, G.A., and Stadecker, M.J. (2003). Apoptosis by neglect of CD4+ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 171, 1859-1867.

31. Gessner, A., Mohrs, K., and Mohrs, M. (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* 174, 1063-1072.
32. Mohrs, K., Wakil, A.E., Killeen, N., Locksley, R.M., and Mohrs, M. (2005). A two-step process for cytokine production revealed by IL-4 dual-reporter mice. *Immunity* 23, 419-429.
33. Rumbley, C.A., Sugaya, H., Zekavat, S.A., El Refaei, M., Perrin, P.J., and Phillips, S.M. (1999). Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J Immunol* 162, 1003-1009.
34. Kovacovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.
35. Bevan, M.J. (1995). Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 182, 639-641.

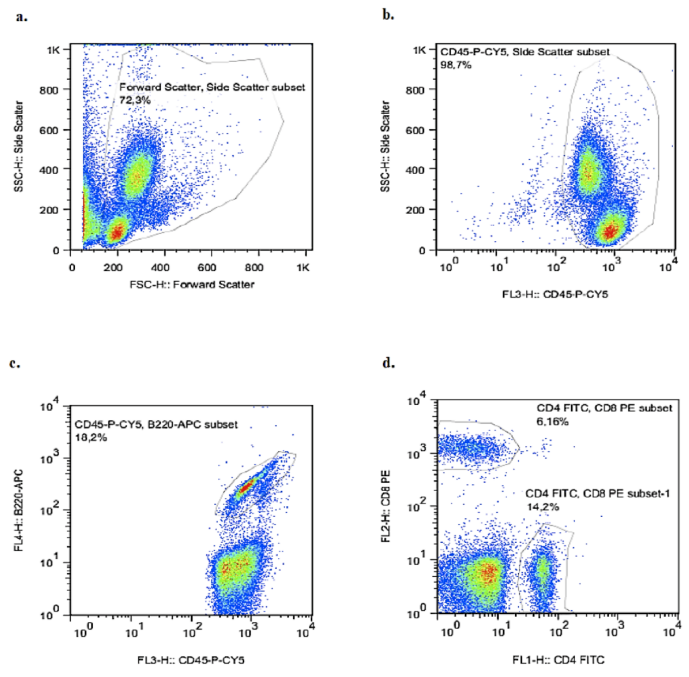


Figure 1: a. Forward and side scattering selected profiles b. complete lymphocytes populations c. B-Lymphocytes d. T-CD4+ and T-CD8+ Lymphocytes. Inside the gate displays the frequency of the gated population.

Table 1: Worms recovery and eggs counts in hepatic and intestinal tissues of SPRET/Ei and CD1 mice

Sex	Mice	Worm recovery			Total	Egg density			Lesions/cm <sup>2</sup>
		Male	Female			Liver	Intestine		
Female	SPRET/Ei	21.0 (9.8)*	31.8 (18.1)*		52.8 (27.8)*	11571.3 (5731.5)*	15154.8 (8830.4)*		44.5 (1.4)
	CD1	4.8 (1.7)	5.2 (2.0)		10.0 (3.7)	4185.2 (1585.3)	2600.6 (1367.5)		38.6 (4.7)
Male	SPRET/Ei	18.0 (6.1)	21.0 (7.5)		38.3 (13.4)	17749.3 (5048.9)	33206.3 (14678.7)		49.6 (2.0)*
	CD1	10.2 (2.3)	11.4 (2.4)		21.6 (4.7)	6693.6 (940.5)	6440.2 (2314.5)		35.8 (2.1)

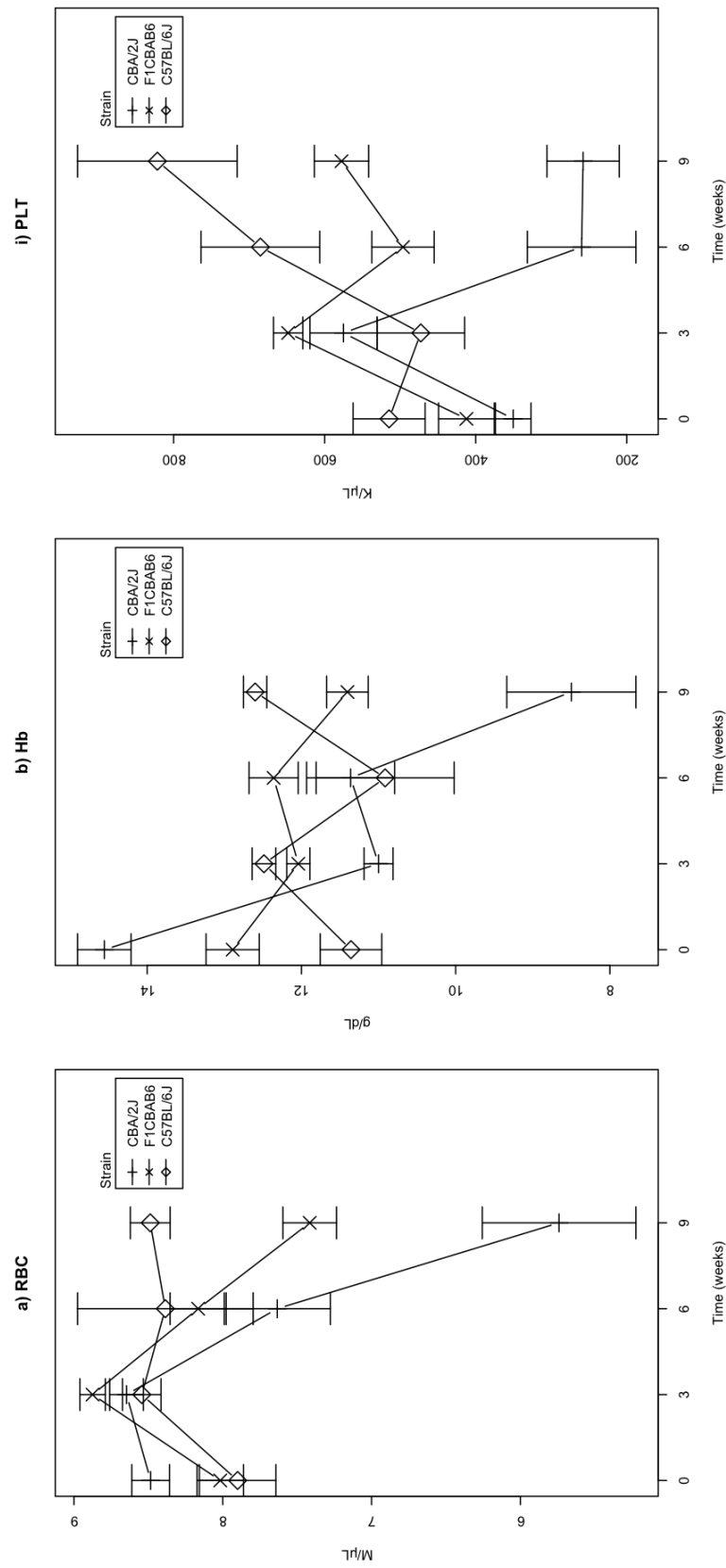


Figure 2: Assessment of red blood parameters related with anaemia during *S. mansoni* infection in CBA/2J, C57/BL6 and F1CBAB6 hybrid mice. A) RBC: Red blood cells; B) Hb: Haemoglobin; C) PLT: Platelets. Results are plotted as mean  $\pm$  SE.



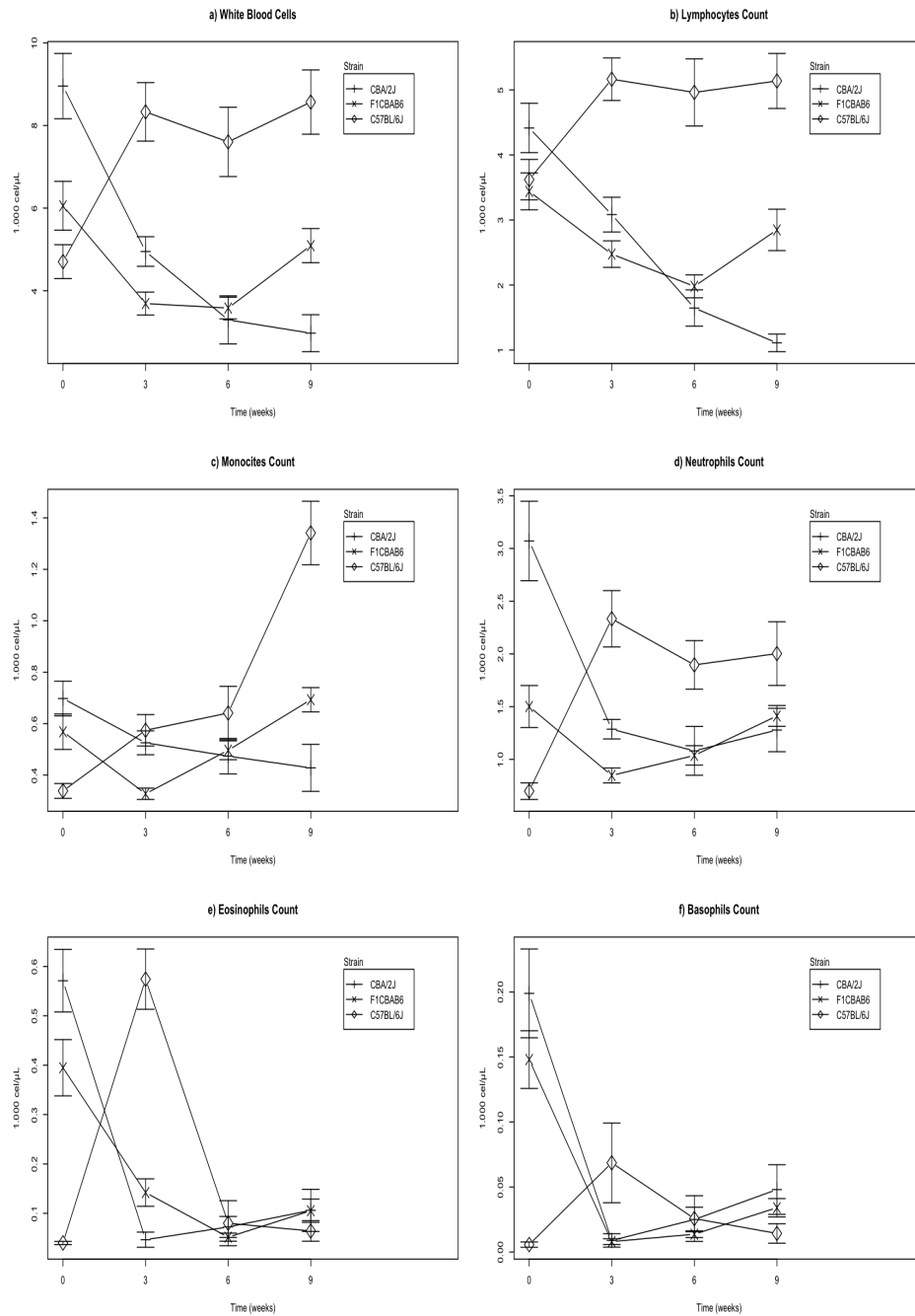


Figure 3: Variation of white cells counts in response to *S. mansoni* infection in CBA/2J, C57/BL6 and F1B6CBA mice. a) White Blood Cells, b) Lymphocytes count, c) Monocytes count, d) Neutrophils counts, e) Eosinophils count, f) Basophils count. Results are plotted as mean  $\pm$  SE.

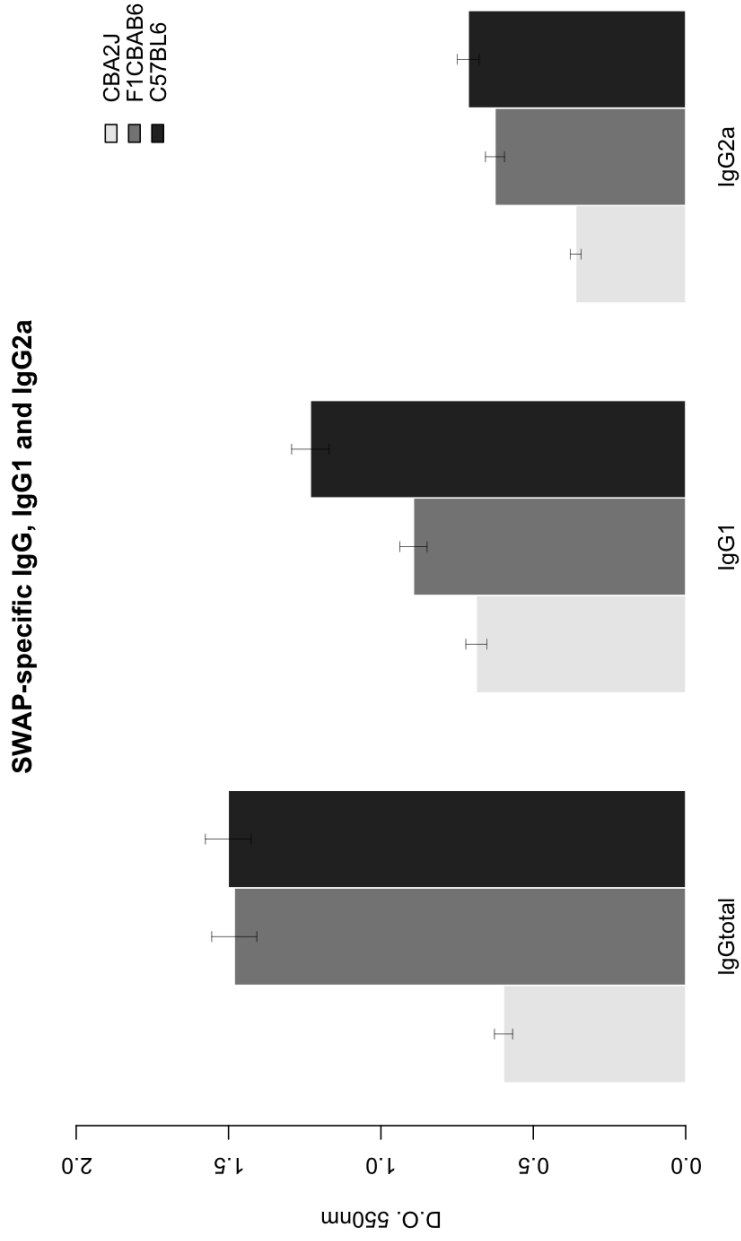


Figure 4: Total serum profile of anti-*Schistosoma mansoni* antibodies (IgG, IgG1 and IgG2a) expressed as optical density in CBA/2J C57/BL6 and F1CBAB6 against soluble worm antigens preparation (SWAP) of *S. mansoni*.

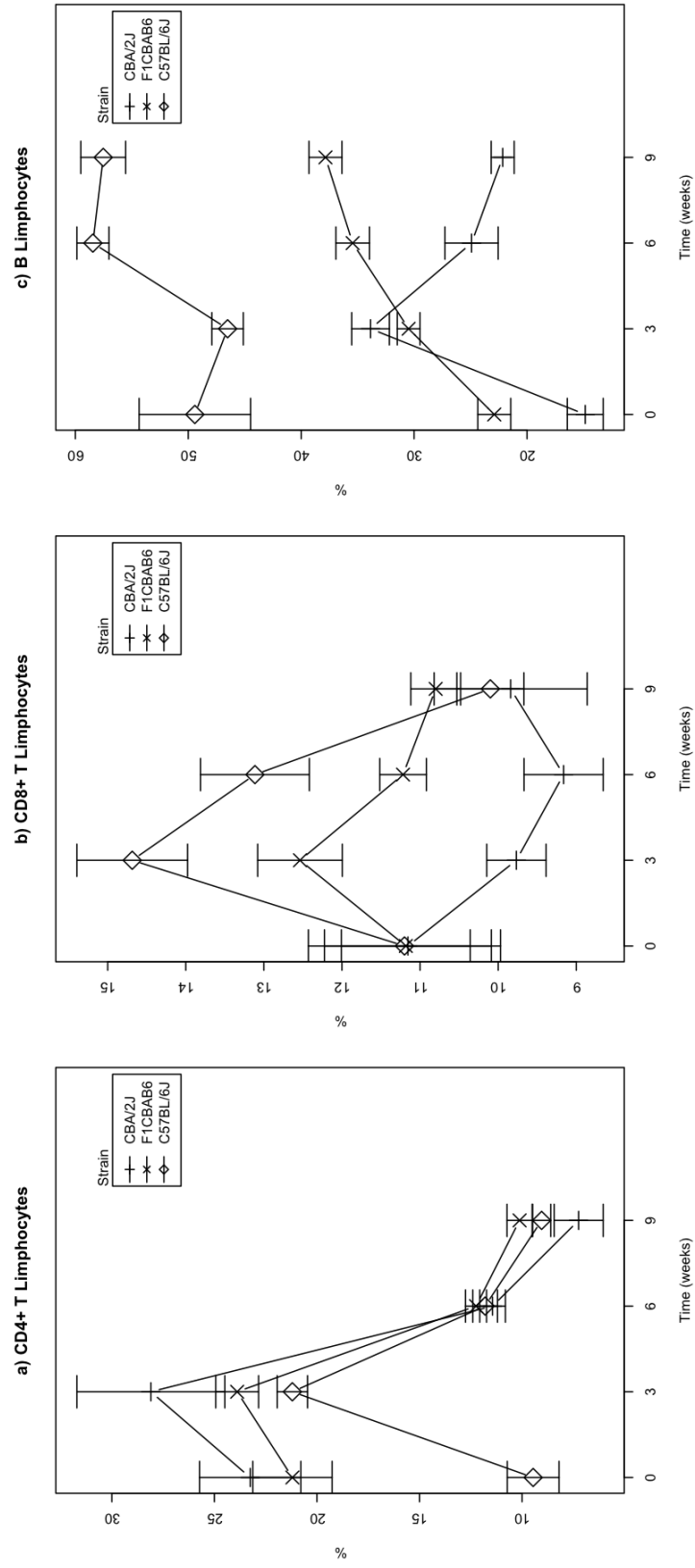


Figure 5: Lymphocyte subpopulation during *S. mansoni* infection in CBA/2J C57/BL6 and F1CBAB6. a) %CD4 T lymphocytes, b) %CD8 T lymphocytes, c) %B lymphocytes. Results are plotted as mean  $\pm$  SE.

**4.4. Systematic review and meta-analysis of Artemisinin based therapies for the treatment and prevention of schistosomiasis**

# Systematic Review and Meta-Analysis of Artemisinin Based Therapies for the Treatment and Prevention of Schistosomiasis

Luis Pérez del Villar<sup>1\*</sup>, Francisco J. Burguillo<sup>2</sup>, Julio López-Abán<sup>1</sup>, Antonio Muro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, IBSAL-CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>2</sup> Departamento Química Física, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

## Abstract

**Background:** Chemotherapy based on repeated doses of praziquantel is still the most effective control strategy against Schistosomiasis, however artemisinin derivatives emerged as a family of compounds with schistocidal activity. The aim of the present work is to compare the efficacy of artemisinin-based therapies in the treatment and prophylaxis of human schistosomiasis. The design of this work involved a quantitative systematic review and meta-analysis.

**Methodology/Principal Findings:** Retrieval of published studies was carried out through an electronic search of the PubMed (MEDLINE), EMBASE, Cochrane Library and CINAHL databases. This included reports comparing the therapeutic efficacy of artesunate alone, artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and a combination of artemisinin derivatives plus praziquantel against praziquantel alone on different types of schistosomiasis. Moreover, studies on artesunate and artemether used as preventive drugs were also analyzed against placebo. The primary outcome measure for schistosomiasis treatment was "parasitological cure", whereas for the prophylaxis the outcome evaluated was "infection rate". Our results show that patients treated with artesunate alone have significantly lower cure rates than those treated with praziquantel (OR = 0.27 (95% C.I. 0.13–0.53;  $p < 0.001$ )) and that the combined therapy of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine is also significantly less effective than praziquantel treatment (OR = 0.14 (95% C.I. 0.02–0.92;  $p = 0.04$ )). However, the combination of an artemisinin derivatives plus praziquantel showed a higher cure rate than praziquantel monotherapy with OR = 2.07 (95% C.I. 1.27–3.36;  $p = 0.003$ ). Finally, chemoprophylaxis with either artesunate (RR = 0.11 (95% C.I. 0.06–0.22;  $p < 0.001$ )) or artemether (RR = 0.25 (95% C.I. 0.16–0.40;  $p < 0.001$ )) was significantly better than a placebo in both cases.

**Conclusions/Significance:** This meta-analysis confirms that artemisinin derivatives used in combination with praziquantel have the potential to increase the cure rates in schistosomiasis treatment, but not artesunate alone. It is also confirmed that repeated doses of artemisinin derivatives play a prophylactic role, significantly reducing the incidence of *Schistosoma japonicum* infections compared with placebo.

**Citation:** Pérez del Villar L, Burguillo FJ, López-Abán J, Muro A (2012) Systematic Review and Meta-Analysis of Artemisinin Based Therapies for the Treatment and Prevention of Schistosomiasis. PLoS ONE 7(9): e45867. doi:10.1371/journal.pone.0045867

**Editor:** Jennifer Keiser, Swiss Tropical and Public Health Institute, Switzerland

**Received:** March 2, 2012; **Accepted:** August 22, 2012; **Published:** September 21, 2012

**Copyright:** © 2012 Pérez del Villar et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Fundación Ramón Areces (2010–13) and Junta de Castilla y León (Orden EDU/330/2008). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: luispmoro@usal.es

## Introduction

Schistosomiasis continues to be one of the most prevalent parasitic diseases. An estimated 779 million people - more than 10% of the world's population - were at risk of schistosomiasis in mid-2003 and approximately 207 million people were infected [1]. The causative agent of schistosomiasis is a trematode worm of the genus *Schistosoma*. Three main species parasitize humans: *S. haematobium*, *S. japonicum*, and *S. mansoni*. Additionally, *S. intercalatum* arises in some parts of Central Africa and *S. mekongi* as well as *S. malayensis* occur in Southeast Asia [2–4]. An alarming 201.5 million cases of schistosome infections (mainly by *S. haematobium* and *S. mansoni*) have been estimated to occur in Africa, accounting for more than 97% of the estimated number of infections worldwide [5]. The highest prevalence of this illness is usually found in school-age children and adolescents, where it represents

the main cause of iron deficiency anaemia [6]. The World Health Organization (WHO) reports the effect of schistosomiasis on world health as the loss of 1.7 and 4.5 million disability-adjusted life years [7,8]. However, a recent systematic review has shown that schistosomiasis-related disability is underestimated [9]. The treatment of this chronic and debilitating disease relies on the use of praziquantel, a broad-spectrum schistosomicidal drug that combines safety and low price [10]. Praziquantel is active against the adult stages of schistosomes. Thus, the main limitation to the use of praziquantel is the lack of therapeutic efficacy against early-stage schistosomiasis which could be the main reason for the many treatment failures observed and high rates of re-infection [11,12]. Moreover, current control programmes against schistosomiasis depend on the wide-scale use of praziquantel. Consequently, this drug pressure could favor the emergence of praziquantel-resistant

parasites [11]. Thus, it is not appropriate to rely on a single drug regimen for the control of schistosomiasis.

The antischistosomal activity of the artemisinin derivatives was discovered in the early 1980's leading this family of compounds to become used as broad-spectrum antischistosomal drugs [13]. Artemisinin derivatives act against the developmental stages of the parasite and are therefore complementary to praziquantel activity [14]. The incorporation of artemisinin derivatives into schistosomiasis treatment in combination with praziquantel may therefore represent a good strategy. However, several reviews have suggested that artemisinin derivatives exert only a moderate degree of efficacy against schistosomiasis [7,14,15]. Meanwhile, artemisinin derivatives have been used in successfully combination with other compounds for the treatment of malaria, reducing the probability of selecting drug-resistant parasites [16,17]. Moreover, synthetic artemisins (e.g. trioxolanes) are also active against juvenile and adult schistosomes [18], but no schistosome-specific clinical trials with synthetic artemisinins have been undertaken so far.

The aim of the present systematic review is to analyse the data available from clinical trials that compare the efficacy of artemisinin derivatives for the treatment and prophylaxis of schistosomiasis. We hope to provide clinicians and policy-makers with a convenient and evidence-based summary of the primary literature on which to base their decisions.

## Methods

### Searching

We carried out a systematic search of published studies of clinical trials that compare anti-helminthic therapies and chemoprophylaxis based on artemisinin derivatives against schistosomiasis, with no date or language restrictions. We used PubMed (MEDLINE), EMBASE, the Cochrane Library and CINAHL, up to July 2012. We incorporated the following search terms: “schistosomiasis”, “praziquantel”, “artesunate”, “artemether” and “artemisinin derivatives”. A customized form was used to record the name of the authors and journal, the year of publication, the location of the trial, the intensity of infection, the study design, the inclusion criteria, dosage, population characteristics, and outcomes.

### Inclusion Criteria and Outcomes

Published reports evaluating artemisinin derivatives in schistosomiasis treatment were included if they fulfilled all of the following selection criteria according to PRISMA guidelines [19]. **(1) Population:** Patients infected with *S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. japonicum* diagnosed through Kato-Katz thick smears (*S. mansoni* and *S. japonicum*) or filtration of 10 ml of urine (*S. haematobium*). *S. intercalatum*, *S. mekongi* and *S. malayensis* were not considered since there were no clinical trials focused in these species. **(2) Study design and interventions:** We included randomized trials comparing the efficacy of artemisinin-based therapies against praziquantel alone, the reference treatment option for all types of schistosomiasis. **(3) Types of outcomes measures:** As the main outcome, we considered “parasitological cure”, defined as the absence of eggs over a short period of time (3 to 8 weeks after treatment). Furthermore, adverse events were defined as secondary outcome to be considered in the systematic review.

To evaluate schistosomiasis chemoprophylaxis based on artemisinin derivatives, we included articles if they fulfilled all of the following selection criteria. **(1) Population:** healthy villagers that lived in endemic areas of schistosomiasis. **(2) Study design and**

**interventions:** we included randomized clinical trials, comparing the prophylactic effect of artesunate or artemether *vs.* placebo against *S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. japonicum* infections. The preventive effect of the artemisinin derivatives was assessed by Kato-Katz thick smears or by the filtration of 10 mL of urine for *S. japonicum* and *S. haematobium*, respectively. **(3) Types of outcomes measures:** the main outcome was measured in terms of “infection rate”, defined as number of patients infected with *Schistosoma spp.* against total number of patients included in any branch of the study, over a short period of time (3 to 4 weeks after treatment). Adverse events were also defined as secondary outcome measure.

### Data Extraction and Synthesis

Two authors (L.P.V. and J.L.A.) independently extracted the data using a data extraction sheet designed by authors. Extraction sheets for each study were crosschecked for consistency, and any discrepancies resolved by discussion. Disagreements between reviewers were resolved by consensus or input from a third author (A.M.).

### Quality Assessment within Individual Studies

We performed an evaluation of the risk of bias for each publication based on four elements of study design and reporting: (1) a description of randomization method and masking of patient and practitioner; (2) a description of allocation sequence generation; (3) reported allocation concealment, masking of participants, study personnel and outcome assessors; (4) reported avoidance of incomplete outcome data (dropouts/withdrawals). A score of 4 was considered high quality, 2–3 moderate quality, 0–1 poor quality according to a modified Jadad score [20]. We also evaluated any additional information related with inclusion and exclusion criteria like sample size calculation, baseline comparability of age, gender and relevant clinical characteristics (follow up and diagnoses).

### Quantitative Data Synthesis

To compare efficacy of schistosomiasis treatments, the outcome measure was expressed as the odds ratio (OR) between the alternative treatment and the control, together with its 95% confidence interval (95% C.I.). Regarding studies that have evaluated the chemoprophylaxis activity of artemisinin derivatives in schistosomiasis, we used “infection rate”, instead of “cure rate”, and the data were referred to relative risk (RR) instead of OR since the RR index is more informative in terms of prevention studies. All p-values reported for OR and RR were calculated using a Z-test for the null hypothesis (i.e. OR = 1 and RR = 1) [21].

To assess the heterogeneity between studies a Cochran's Chi-square test (Q-test) was made under the null hypothesis of homogeneity (significant heterogeneity if  $p < 0.05$ ). Additionally, the  $I^2$  statistic was calculated and values greater than 50% were considered as high heterogeneity. The fixed-effect model, using the inverse variance method, was used where there was no evidence of heterogeneity and a common effect size could be assumed. However, the random-effects model was chosen when heterogeneity was detected and the true effect size varied between studies. To estimate the between studies variance ( $\tau$  squared) the DerSimonian and Laird approach was used [22].

When several groups (species of parasites) were included in a comparison, a subgroup analysis was performed. In the fixed-effect case, a fixed-effect model was used within subgroups and a fixed-effect summary was also calculated ignoring subgroups membership. In the random-effects model, a meta-analysis was performed over to combine studies within each subgroup using separate estimates of tau-squared. Then the mean effects of

subgroups were compared by the Q test to analyse if the difference was significant. Finally, a global combined effect across subgroups was calculated by a separate random-effect meta-analysis including all the studies and ignoring subgroups membership since this option may be the more logical [21].

To assess the presence of publication bias, a funnel plot of effect size against standard error was analysed for each meta-analysis. Complementary to the funnel plot, the Egger's regression asymmetry test was performed to quantify significance of publication bias [23]. All the above statistical analyses and graphs were performed with meta R-package [24].

## Results

### Study Selection

Reports from 261 published articles were screened for evidence of clinical trials that evaluated the efficacy of artemisinin derivatives in schistosomiasis treatment or prophylaxis. Of them, 50 articles were selected for more detailed evaluation and finally twenty-four published articles were included in the meta-analysis. Some published reports included in the meta-analysis are multicenter or evaluated the intervention with separate doses and protocols of treatment and they were included as different studies. A study is therefore considered as the main unit of the meta-analysis (see tables 1,2,3,4); The study selection process is outlined in Figure 1. When different endpoints were assessed in the same subjects we only considered the value reported for the first period of time of the follow up, since the other endpoints using the same subjects were not truly independent trials and data from a trial can only appear once in a specific analysis. Details of the included studies focused on the treatment and prophylaxis of schistosomiasis are given in table S1 and table S2, respectively. In addition, table S3 shows the 27 checklist items pertain to the content of a systematic review and meta-analysis according to PRISMA guidelines [19].

### Characteristics and Methodological Quality

Regarding schistosomiasis treatment using artemisinin based therapies, we defined three units of analysis: (1) artesunate in monotherapy *vs.* praziquantel (seven trials described in six published studies); (2) artemisinin derivative *plus* praziquantel *vs.* praziquantel alone (five trials described in four published studies); (3) artesunate *plus* sulfadoxine-pyrimethamine *vs.* praziquantel (three published studies). All published studies were performed in Africa [25–30], except one study focused on *S. japonicum*, which was performed in China [31]. There were no studies that examined the efficacy of artemisinin derivatives in the American continent. The pediatric population was the target of trials focused on *S. haematobium*, whereas the studies on *S. mansoni* and *S. japonicum* focused on adult populations. In all studies both sexes were enrolled and patients were followed up over a short period of time (4 to 24 weeks). The studies on schistosomiasis treatment varied in sample size from 83 to 800 participants. In general, the quality of the reporting and design of the clinical trials that evaluated the artemisinin derivatives in the treatment of schistosomiasis was medium (see supplementary table S1). One study was an open labelled exploratory trial [28] and five were randomized controlled clinical trials with an adequate generation of allocation sequence [25,30–33]. The majority of studies provide a sample size framework and a scientific rationale for the sample size determination. The remaining four studies were scored as having a high risk of bias mainly because of inadequate methods to generate the sequence of randomization (alternation), lack of allocation concealment, and/or incomplete outcome data.

Respecting artemisinin derivatives in the prophylaxis of schistosomiasis, we performed the meta-analysis in two main units according to the artemisinin derivative used: (1) artesunate *vs.* placebo and (2) artemether *vs.* placebo. The chemoprophylaxis doses for artesunate and artemether were 6 mg/kg at 1 or 2 week intervals for up to 13 doses during the high transmission period (two to six months). In both cases, all patients enrolled in the trials were initially treated with praziquantel prior to random assignment. In all trials, the infection rate was the outcome measure, and the RR, including 95% C.I. was estimated. Tables 4 and 5 summarize the key features of the prophylactic effect of artesunate and artemether, respectively. With regard to artesunate, a group of 5 published reports (including 13 different studies) were suitable for the meta-analysis. These studies were performed in different endemic areas of schistosomiasis in China investigated the efficacy of artesunate as a chemoprophylactic agent against *S. japonicum* infections [34–38]. These reports were published in Chinese language with abstracts and tables in English but some translation was required. The design of these studies were randomized double blind. Some of them were multicenter including different doses and intervals of treatment [35,37,38]. The retrieved studies that included artesunate as chemoprophylactic drug in schistosomiasis japonica reported insufficient information (see supplementary table S2). In fact, the quality score range from 0 to 2. Furthermore, it was identified two additional studies Li *et al.* 1996 [39] and Tian *et al.* 2001 [40] but access to the full publications were not possible and they were excluded from the meta-analysis. No published reports evaluated artesunate prophylaxis for *S. mansoni* and *S. haematobium* infections. In respect of artemether, 10 articles (including 12 different studies) were considered eligible for the meta-analysis. Seven of those articles were dealing with *S. japonicum* and were published in Chinese language [41–47] and the other 3 articles focused on *S. japonicum*, *S. haematobium* and *S. mansoni* were published in English language [48–50]. Seven articles of the above studies were carried out between 1996 and 2006 in Jiangxi, Anhui, Hunan, and Yunnan provinces of China including individuals aged between 5 and 60 years who were in frequent contact with infested water [41–44,46–48]. One additional report was conducted among flood-relief workers aged between 18–40 in Jiangxi province [45]. Finally, 2 further reports focused on *S. haematobium* and *S. mansoni* infections were developed in Africa [49,50]. With regard to the quality of the artemether reports, the score values range from 1 to 3 (table S2). Thus, the quality of studies was higher than those retrieved studies focused on artesunate prophylaxis.

### Meta-analysis

**Artesunate in monotherapy *vs.* praziquantel.** A total of 7 studies (n=800) included in six published reports [25–30] compared the efficacy of artesunate alone *vs.* praziquantel alone in sub-Saharan Africa. Four studies performed on populations of schoolchildren evaluated artesunate alone in *S. haematobium* infections, and two additional studies on adult populations assessed the efficacy of oral artesunate for the treatment of *S. mansoni*. Regarding to the doses of artesunate used, it must be noted that five reports used artesunate 4 mg/kg daily for three consecutive days; one additional report used eight tablets of artesunate 50 mg over five days; (i.e. 3,2,1,1,1). All these details were described in table 1. None of the studies evaluated the efficacy of artesunate on *S. japonicum* infection. There was significant heterogeneity in the effect size among all the studies ( $Q = 24.8$  ( $p < 0.001$ ),  $I^2 = 75.8\%$  ( $> 50\%$ )). We therefore performed a subgroup random-effects meta-analysis (Figure 2). The results revealed that patients treated with artesunate alone had a significantly lower cure rate than those treated with praziquantel, both with *S. haematobium*, showing an

**Table 1.** Artesunate monotherapy vs. praziquantel in schistosomiasis treatment.

Citation	Year (trial)	Parasite	Location (Country)	Study Population (age)	Time point analysed (weeks)	Treatment	N <sup>c</sup> Cured/N <sup>t</sup> Treated
Borrmann <i>et al.</i> 2001 [25]	2000	<i>S. haematobium</i>	Moyen-Ogooué Province (Gabon)	Children (5–13)	8	ART <sup>1</sup>	24/89
						PZQ <sup>2</sup>	65/89
De Clercq <i>et al.</i> 2002 (study 1) [26]	2000	<i>S. haematobium</i>	Lampsar village (Senegal)	Children (7–14)	5	ART <sup>3</sup>	18/90
						PZQ <sup>2</sup>	26/88
De Clercq <i>et al.</i> 2002 (study 2) [26]	2000	<i>S. haematobium</i>	Makhana village (Senegal)	Children (7–14)	5	ART <sup>3</sup>	21/44
						PZQ <sup>2</sup>	34/45
Inyang-Etoh <i>et al.</i> 2009 [27]	2005	<i>S. haematobium</i>	Adim village (Nigeria)	Children (4–20)	8	ART <sup>1</sup>	33/44
						PZQ <sup>2</sup>	31/42
Keiser <i>et al.</i> 2010 [28]	2008	<i>S. haematobium</i>	Guéssigué (Côte d'Ivoire)	Children (8–16)	4	ART <sup>1</sup>	5/20
						PZQ <sup>2</sup>	23/26
De Clercq <i>et al.</i> 2000 [29]	1999	<i>S. mansoni</i>	L. T. Salane village (Senegal)	Adults (n.d.)	5	ART <sup>1</sup>	8/35
						PZQ <sup>2</sup>	16/36
De Clercq <i>et al.</i> , 2000b [30]	1998	<i>S. mansoni</i>	Richard Toll village (Senegal)	Adults (6–61)	5	ART <sup>1</sup>	35/114
						PZQ <sup>2</sup>	29/38

<sup>1</sup>ART (artesunate 4 mg/kg) daily for three consecutive days;

<sup>2</sup>PZQ (praziquantel 40 mg/kg once);

<sup>3</sup>ART (artesunate 8 tablets of 50 mg over 5 days; i.e. 3,2,1,1,1); n.d.: data not described.  
doi:10.1371/journal.pone.0045867.t001



**Table 2.** Artemisinin derivatives + praziquantel vs. praziquantel in the treatment of schistosomiasis.

Citation	Year (trial)	Parasite	Drug	Location (Country)	Study Population (age)	Time point analysed (weeks)	Treatment	N <sup>o</sup> Cured/N <sup>o</sup> Treated
Borrmann <i>et al.</i> , 2001 [25]	2000	<i>S. haematobium</i>	Artesunate	Moyen-Ogooué Province (Gabon)	Children (5–13)	8	PZQ <sup>1</sup> +ART <sup>2</sup>	71/88
Inyang-Etoh <i>et al.</i> 2009 [27]	2005	<i>S. haematobium</i>	Artesunate	Adim Village (Nigeria)	Children (4–20)	8	PZQ <sup>1</sup>	65/89
De Clercq <i>et al.</i> , 2000 [29]	1999	<i>S. mansoni</i>	Artesunate	L. T. Salane village (Senegal)	Adults (n.d.)	5	PZQ <sup>1</sup> +ART <sup>4</sup>	39/44
Hou <i>et al.</i> , 2008 (study 1) [31]	2003	<i>S. japonicum</i>	Artemether	Hunan Province (China)	Adults (10–60)	6	PZQ <sup>1</sup>	32/44
Hou <i>et al.</i> , 2008 (study 2) [31]	2003	<i>S. japonicum</i>	Artemether	Hunan Province (China)	Adults (10–60)	6	PZQ <sup>5</sup> +ART <sup>6</sup>	27/39
							PZQ <sup>5</sup>	16/36
							PZQ <sup>7</sup> +ART <sup>6</sup>	50/51
							PZQ <sup>7</sup>	53/55
								43/44
								44/46

<sup>1</sup>PZQ (praziquantel 40 mg/kg once);

<sup>2</sup>ART (artesunate 4 mg/kg/day, given once per day over 3 days);

<sup>3</sup>ART (artesunate 4 mg/kg) daily for three consecutive days;

<sup>4</sup>ART (artesunate 200mg) on the first day and (100 mg) daily for a further 4 days;

<sup>5</sup>PZQ (praziquantel 1 day, 3 × 20 mg/kg);

<sup>6</sup>ART (artemether 6 mg/kg once); <sup>7</sup>PZQ (praziquantel 6 days, 3 × 20 mg/kg). n.d.: data not described.

doi:10.1371/journal.pone.0045867.t002

**Table 3.** Artesunate + sulfadoxine-pyrimethamine vs. praziquantel in the treatment of schistosomiasis.

Citation	Year (trial)	Parasite	Location (Country)	Study Population (age)	Time point analysed (weeks)	Treatment	N° Cured/N° Treated
Sissoko <i>et al.</i> , 2009 [32]	2007	<i>S. haematobium</i>	Bamako (Mali)	Children (6–15)	4	ART+SP <sup>1</sup>	172/392
						PZQ <sup>2</sup>	206/389
Mohamed <i>et al.</i> , 2009 [51]	2008	<i>S. mansoni</i>	New Halfa (Sudan)	Children (8–17)	4	ART+SP <sup>3</sup>	27/46
						PZQ <sup>2</sup>	46/46
Obonyo <i>et al.</i> , 2010 [33]	2009	<i>S. mansoni</i>	Rarieda (Kenya)	Children (6–15)	4	ART+ SP <sup>4</sup>	15/106
						PZQ <sup>2</sup>	69/106

<sup>1</sup>ART: (artesunate 100 mg/day) + S (sulfadoxine 250 mg/day) + P (pyrimethamine 12.5 mg/day) over three days;

<sup>2</sup>PZQ (praziquantel 40 mg/kg once);

<sup>3</sup>ART (artesunate 4 mg/kg/day over three days) + SP (sulfadoxine-pyrimethamine 25mg/kg );

<sup>4</sup>ART(artesunate 4 mg/kg/day over three days) + S (sulfadoxine 25mg/kg) + P (pyrimethamine 12.5 mg/day).

doi:10.1371/journal.pone.0045867.t003

OR = 0.28 (95% C.I. 0.11–0.71;  $p = 0.007$ ), and with *S. mansoni* infections, giving an OR = 0.22 (95% C.I. 0.08–0.57;  $p = 0.002$ ). Subgroup difference using the Q test was no significant ( $p = 0.69$ ). Overall, the combined OR was 0.27 (95% C.I. 0.13–0.53;  $p < 0.001$ ), clearly showing that at least from the studies reviewed artesunate alone is significantly less effective than praziquantel treatment.

**Artemisinin derivative plus praziquantel vs. praziquantel alone.** With respect to combination therapies, four published reports [25,27,29,31] described five studies ( $n = 536$ ) in which the effectiveness of artemisinin derivatives in combination with praziquantel was compared against praziquantel alone. This comparison included two studies involving *S. haematobium* and a single study with *S. mansoni*, all using artesunate as the drug. Furthermore, two additional studies for *S. japonicum* were incorporated in which artemether was used instead of artesunate. The different dosages used for combination therapies were described in table 2. No significant heterogeneity was identified among all of the studies ( $Q = 1.43$  ( $p = 0.839$ ),  $I^2 = 0\%$  ( $< 50\%$ )). According to that, a subgroup fixed-effect meta-analysis was performed (Figure 3). Patients treated with artesunate plus praziquantel in *S. haematobium* infections showed a significantly higher cure rate than patients treated with praziquantel alone, with an OR = 1.84 (95% C.I. 1.01–3.36;  $p = 0.047$ ). In *S. mansoni* infections, patients treated with combined therapy using artesunate and praziquantel also showed higher cure rates than patients treated with praziquantel alone, with OR = 2.81 (95% C.I. 1.09–7.24;  $p = 0.03$ ). Similar higher cure rates were found in *S. japonicum* infection trials, with an overall OR = 1.92 (95% C.I. 0.34–10.74;  $p = 0.457$ ). Subgroups difference using the Q test was no significant ( $p = 0.76$ ). The summary odds ratio, regardless of the helminth species in question, was found to be OR = 2.07 (95% C.I. 1.27–3.36;  $p = 0.004$ ), significantly favoring the combined therapy against praziquantel alone.

**Artesunate combined with sulfadoxine-pyrimethamine vs. praziquantel.** Three published reports ( $n = 1085$ ) performed in Mali, Kenya and Sudan compared standard antimalarial treatment consisting on artesunate combined with sulfadoxine-pyrimethamine against praziquantel alone for schistosomiasis treatment [32,33,51]. Two of these reports referred to treatment for *S. mansoni* and one to treatment for *S. haematobium* infections (table 3). All studies that evaluated this approach including children that were followed up until 4 weeks post-treatment. We detected significant heterogeneity in the size of the effect among all the studies ( $Q = 36.2$  ( $p < 0.001$ ),  $I^2 = 94\%$  ( $> 50\%$ )). Therefore,

subgroup random-effects meta-analysis was performed (Figure 4). The cure rate for *S. haematobium* in the combined therapy trial is statistically lower compared with praziquantel alone: OR = 0.69 (95% C.I. 0.52–0.92;  $p = 0.01$ ). Similarly, for *S. mansoni* infections the combined therapy had significantly lower cure rates than those of praziquantel showing an overall OR of 0.06 (95% C.I. 0.02–0.24;  $p < 0.001$ ). Subgroups difference using the Q test was significant ( $p < 0.001$ ), as expected, taking into account that one OR was 0.69 for *S. haematobium* against 0.06 value for *S. mansoni*. Nevertheless, it could be valuable to report a summary effect of all the studies. Thus, regardless of the schistosome species in question, an overall odds ratio significantly less than one was found: OR = 0.14 (95% C.I. 0.02–0.92;  $p = 0.04$ ). Therefore, the results do not appear to be in favor of the assayed antimalarial therapy as compared with praziquantel in schistosomiasis treatment.

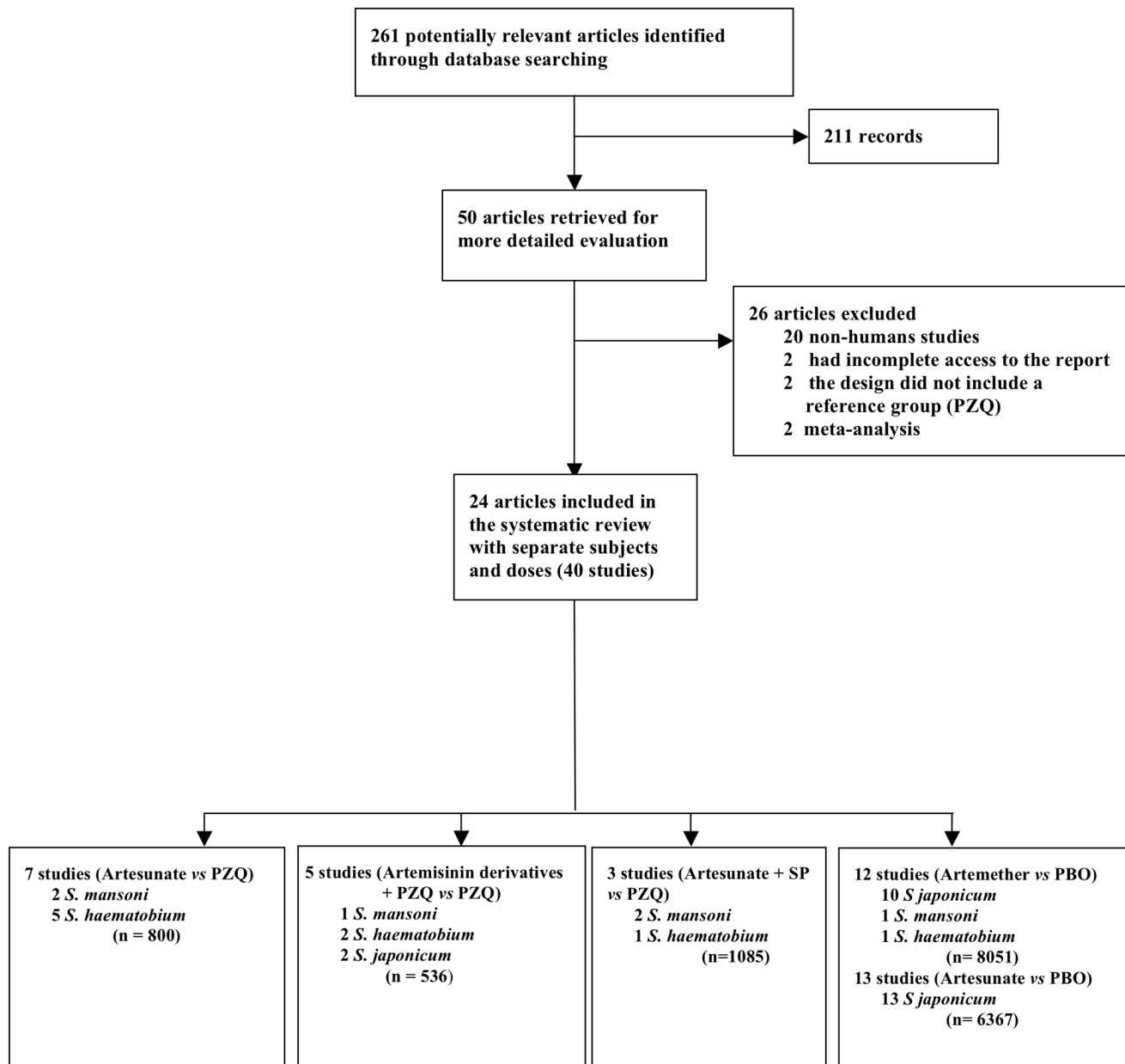
**Artesunate vs. placebo for the prevention of schistosomiasis.** A group of 5 published reports including 13 studies ( $n = 6367$ ) were performed in different endemic areas of schistosomiasis in China investigating the efficacy of artesunate as a chemoprophylactic agent against *S. japonicum* infections [34–38]. Table 4 summarizes the key features, doses and outcomes of the studies included. We found significant heterogeneity among these studies ( $Q = 21.8$  ( $p = 0.04$ ),  $I^2 = 45\%$  (near 50%)) and hence we used random-effects meta-analysis to estimate the prophylactic effect of artesunate (figure 5), which yielded a combined RR value of 0.11 (95% C.I. 0.06–0.22;  $p < 0.001$ ), pointing to a significant degree of schistosomiasis protection of artesunate in comparison with placebo.

**Artemether vs. placebo for the prevention of schistosomiasis.** A group of 10 published reports described 13 studies ( $n = 8051$ ) in which it was assessed the efficacy of artemether for the prevention of schistosomiasis. Eight reports focused on *S. japonicum* infections in China [41–48] and 2 additional articles focused on *S. haematobium* [49] and *S. mansoni* [50] infections in Côte d'Ivoire. The key features, doses and outcomes of the included studies were described in table 5. We detected significant heterogeneity among all the studies ( $Q = 95.7$  ( $p < 0.001$ ),  $I^2 = 89\%$  ( $> 50\%$ )). Therefore, subgroup random-effects meta-analysis was performed to estimate the prophylactic effect of artemether (Figure 6). In *S. haematobium* and *S. mansoni* infections, a decrease in risk was observed: RR = 0.75 (95% C.I. 0.62–0.92;  $p = 0.006$ ) and RR = 0.50 (95% C.I. 0.35–0.75;  $p < 0.001$ ), respectively, although these decreases are in fact significant more studies should be carried out because only one study of each parasite species is not sufficient. In addition, with *S.*

**Table 4.** Artesunate prophylaxis trials focused on *Schistosoma japonicum* infections in endemic areas of China.

Citation	Year (trial)	Parasite	Location (Country)	Study Population (age)	Time point analysed (weeks)	N° of doses (interval in weeks)	Treatment	N° Positive/ N° Treated
Wu <i>et al.</i> , 1995 [34]	1993	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (5–60)	4	8 (1)	ART <sup>1</sup>	0/346
							PBO	15/323
Xu <i>et al.</i> , 1999 (study 1) [35]	1997	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (6–65)	4	4 (2)	ART <sup>1</sup>	2/273
							PBO	11/289
Xu <i>et al.</i> , 1999 (study 2) [35]	1997	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (6–65)	4	4 (2)	ART <sup>1</sup>	0/107
							PBO	7/111
Li <i>et al.</i> , 1999 [36]	1997	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (5–60)	4	12 (2)	ART <sup>1</sup>	0/43
							PBO	4/58
Zhang <i>et al.</i> , 2000 (study 1) [37]	1993	<i>S. japonicum</i>	Anhui province	Residents (6–65)	4	6 (2)	ART <sup>1</sup>	2/380
							PBO	18/400
Zhang <i>et al.</i> , 2000 (study 2) [37]	1993	<i>S. japonicum</i>	Anhui province	Residents (6–65)	4	12 (2)	ART <sup>1</sup>	1/323
							PBO	31/323
Zhang <i>et al.</i> , 2000 (study 3) [37]	1993	<i>S. japonicum</i>	Hubei province	Residents (6–65)	4	3 (1)	ART <sup>1</sup>	2/168
							PBO	22/200
Zhang <i>et al.</i> , 2000 (study 4) [37]	1993	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (6–65)	4	8 (1)	ART <sup>1</sup>	0/467
							PBO	41/397
Zhang <i>et al.</i> , 2000 (study 5) [37]	1993	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (6–65)	4	5 (2)	ART <sup>1</sup>	5/283
							PBO	20/304
Zhang <i>et al.</i> , 2000 (study 6) [37]	1993	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province	Residents (6–65)	4	3 (2)	ART <sup>1</sup>	6/51
							PBO	12/64
Lu <i>et al.</i> , 2000 (study 1) [38]	1999	<i>S. japonicum</i>	Anhui province	Residents (5–60)	4	3 (2)	ART <sup>1</sup>	0/210
							PBO	13/208
Lu <i>et al.</i> , 2000 (study 2) [38]	1999	<i>S. japonicum</i>	Anhui province	Residents (5–60)	4	5 (2)	ART <sup>1</sup>	0/311
							PBO	17/312
Lu <i>et al.</i> , 2000 (study 3) [38]	1999	<i>S. japonicum</i>	Anhui province	Residents (5–60)	4	13 (2)	ART <sup>1</sup>	1/209
							PBO	18/207

<sup>1</sup>ART: artesunate (6 mg/kg); PBO: placebo.  
doi:10.1371/journal.pone.0045867.t004



**Figure 1. Flow diagram showing the selection process of studies included in the meta-analysis.**  
doi:10.1371/journal.pone.0045867.g001

*japonicum* infections we also found a significant prophylactic effect of artemether, with a RR = 0.19 (95% C.I. 0.11–0.34,  $p < 0.001$ ). Subgroups difference for the three parasites was significant by Q test ( $p < 0.001$ ), probably because the RR for *S. japonicum* is substantially lower than the other ones. The overall combined RR, regardless of the parasite species in question, was RR = 0.25 (95% C.I. 0.16–0.40,  $p < 0.001$ ), which is significantly in favor of schistosomiasis prevention by artemether.

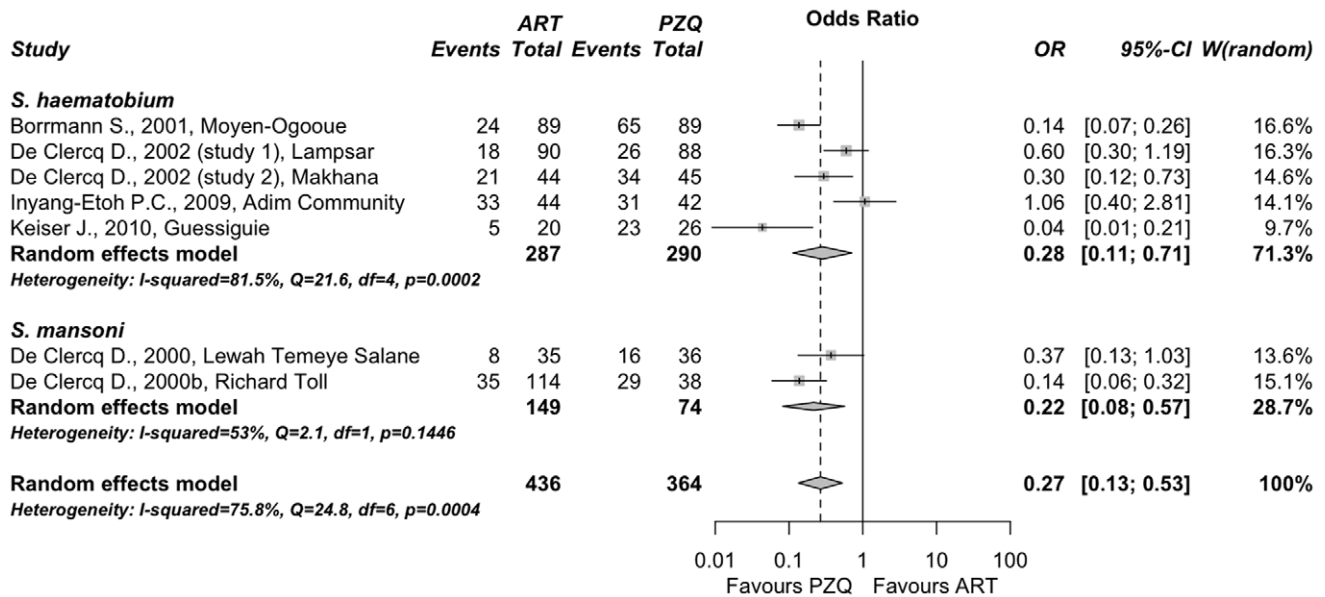
**Adverse effects.** Regarding to artemisinin derivatives treatment, data for adverse events possibly related to artesunate in monotherapy compared with praziquantel were described in the 6 included publications in the present meta-analysis [25–30]. Those trials were not designed to evaluate differences in adverse events but some information can be extracted. Thus, the adverse effects were similarly distributed between artesunate and praziquantel

treatment and the most frequently adverse reactions were the incidence of gastric pain, headache, nausea and vomiting. With respect to the therapy with artesunate *plus* praziquantel *vs.* praziquantel alone, all the studies described that both drugs in combination were well tolerated and the most studies emphasized that the number of adverse effects were similar in both treatment regimens [25,27,29,31]. In addition, none of studies included in this comparison revealed any additional side-effects caused by possible interactions between praziquantel and artemisinin derivatives. Interestingly, the three studies that evaluate the schistosomiasis treatment using the standard antimalarial combination of artesunate *plus* sulfadoxine pyrimethamine *versus* praziquantel reported a significant lower incidence of side effects for the combined therapy compared with praziquantel treatment [32,33,51].

**Table 5.** Artemether prophylaxis vs. placebo in schistosomiasis due to *S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. japonicum*.

Citation	Year (trial)	Parasite	Location (Country)	Study Population (age)	Time point analysed (weeks)	N° of doses (Interval in weeks)	Treatment	N° Positive/ N° Treated
Goran <i>et al.</i> , 2001 [49]	2000	<i>S. haematobium</i>	Taabo village (Côte d'Ivoire)	Children (5–15)	3	6 (4)	ART <sup>1</sup> PBO	76/156 97/150
Utzing <i>et al.</i> , 2000 [50]	1998	<i>S. mansoni</i>	Fagnamplu village (Côte d'Ivoire)	Schoolchildren (n.d.)	3	6 (3)	ART <sup>1</sup> PBO	31/128 68/140
Xiao <i>et al.</i> , 1995 [41]	1994	<i>S. japonicum</i>	Hunan province (China)	Residents (4–65)	4	3 (2)	ART <sup>1</sup> PBO	20/365 51/376
Xiao <i>et al.</i> , 1996 [42]	1995	<i>S. japonicum</i>	Yunnan province (China)	Residents (4–65)	4	4(2)	ART <sup>1</sup> PBO	13/307 46/306
Xu <i>et al.</i> , 1997 [43]	1996	<i>S. japonicum</i>	Anhui province (China)	Residents (6–65)	4	11(2)	ART <sup>1</sup> PBO	0/433 40/452
Tian <i>et al.</i> , 1997 [44]	1996	<i>S. japonicum</i>	Hunan province (China)	Residents (5–60)	4	10 (2)	ART <sup>1</sup> PBO	5/290 82/305
Song <i>et al.</i> , 1998 (study 1) [45]	1996	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province (China)	Flood relief workers (18–40)	6	3 (2)	ART <sup>1</sup> PBO	4/99 44/110
Song <i>et al.</i> , 1998 (study 2) [45]	1996	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province (China)	Flood relief workers (18–40)	6	2 (2)	ART <sup>1</sup> PBO	0/103 4/102
Wang <i>et al.</i> , 1997 [46]	1997	<i>S. japonicum</i>	Yunnan province (China)	Residents (3–60)	4	10 (2)	ART <sup>1</sup> PBO	23/789 87/717
Li <i>et al.</i> , 2005 [48]	2004	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province (China)	Residents (6–60)	4	11(2)	ART <sup>1</sup> PBO	3/373 56/361
Song <i>et al.</i> , 2006 (study 1) [47]	2004	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province (China)	Residents (6–65)	6–8	7 (4)	ART <sup>1</sup> PBO	42/402 79/587
Song <i>et al.</i> , 2006 (study 2) [47]	2004	<i>S. japonicum</i>	Jiangxi province (China)	Residents (6–65)	6–8	13 (2)	ART <sup>1</sup> PBO	14/413 79/587

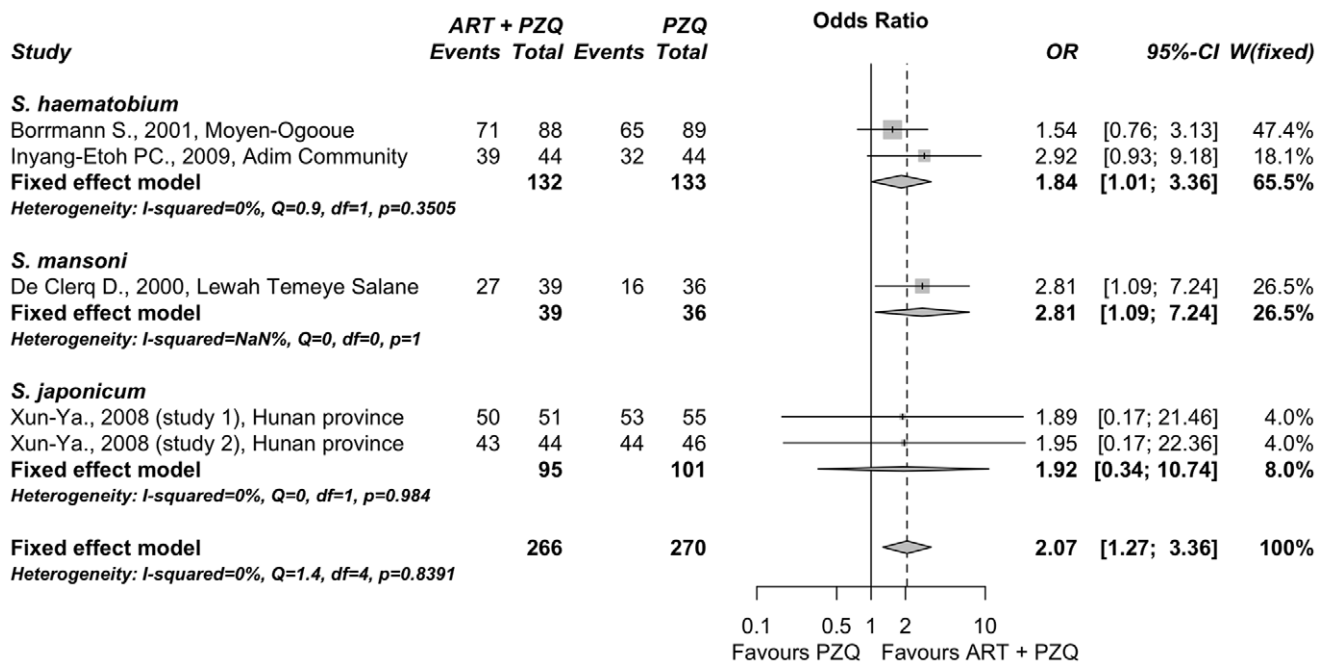
<sup>1</sup>ART: artemether (6 mg/kg); n.d.: data not described.  
doi:10.1371/journal.pone.0045867.t005



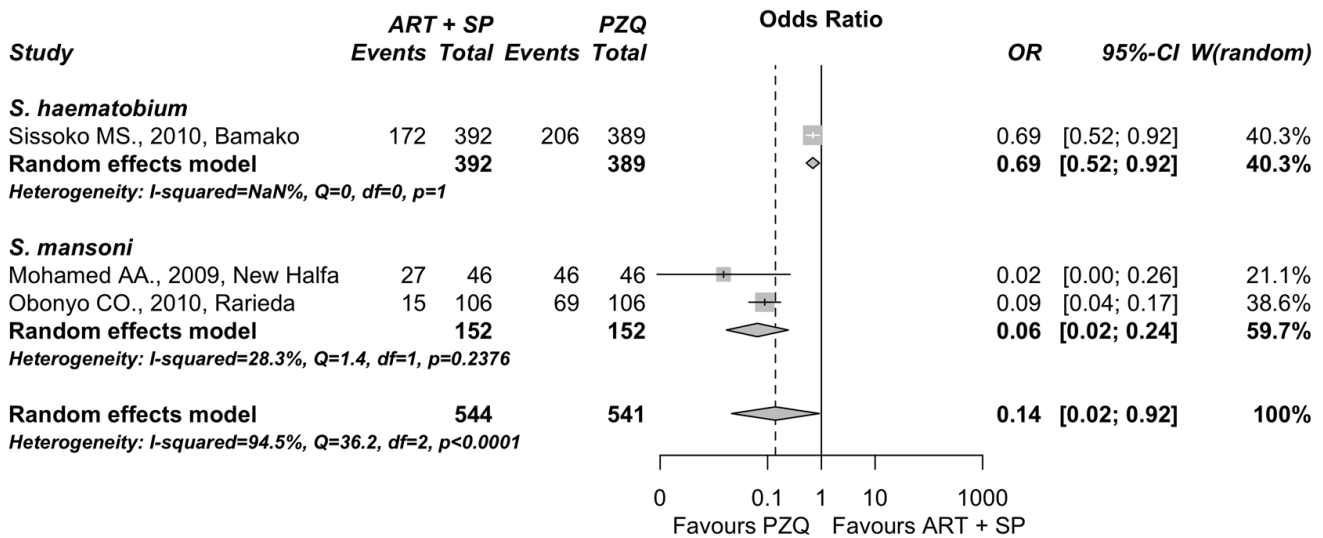
**Figure 2. Forest plot of a random-effects subgroup meta-analysis comparing parasitological cure by artesunate as monotherapy vs. praziquantel.** Points represent odds ratios with their corresponding 95% C.I. Intermediate diamonds are combined odds ratios for each subgroup and the diamond at the bottom is the overall combined odds ratio. The vertical line emphasizes an odds ratio = 1 (no difference) and the dashed vertical line shows the value of the overall combined odds ratio. The original reports are labeled with author name, year and location (for details see table 1).  
doi:10.1371/journal.pone.0045867.g002

Regarding the use of artemisinin derivatives as chemoprophylactic drug, artemether and artesunate were both well tolerated and no severe adverse events were recorded in the studies included in the meta-analysis. Only a few participants reported mild

abdominal pain, headache, dizziness or slight fever, as other previous reviews mentioned [14,52]. In addition, no significant changes in routine blood and urine tests, ECG, hepatic and renal



**Figure 3. Forest plot of fixed-effect subgroup meta-analysis comparing parasitological cure after treatment with an artemisinin derivative plus praziquantel vs. praziquantel.** Points represent odds ratios with their corresponding 95% C.I. Intermediate diamonds are combined odds ratios for each subgroup and the diamond at the bottom is the overall combined odds ratio. The vertical line emphasizes an odds ratio = 1 (no difference) and the dashed vertical line shows the value of the overall combined odds ratio. The original reports are labeled with author name, year and location (for details see table 2).  
doi:10.1371/journal.pone.0045867.g003

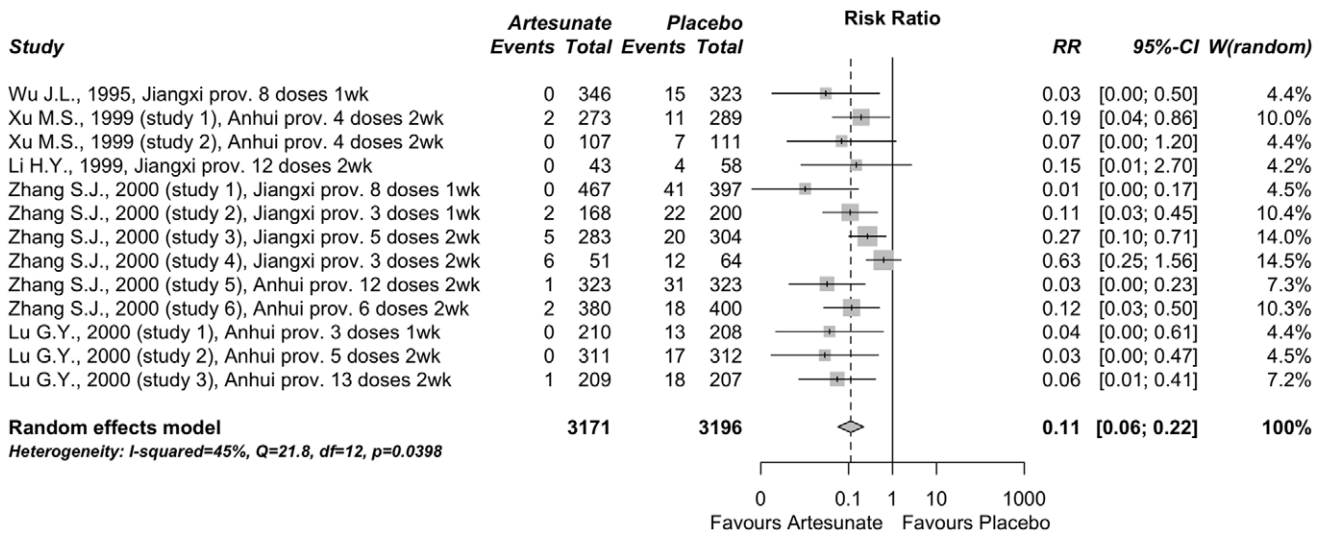


**Figure 4. Forest plot of the random-effects subgroup meta-analysis comparing parasitological cure by artesunate plus sulfadoxine/pyrimethamine vs. praziquantel.** Points represent odds ratios with their corresponding 95% C.I. Intermediate diamonds are combined odds ratios for each subgroup and the diamond at the bottom is the overall combined odds ratio. The vertical line emphasizes an odds ratio = 1 (no difference) and the dashed vertical line shows the value of the overall combined odds ratio. The original reports are labeled with author name, year and location (for details see table 3). doi:10.1371/journal.pone.0045867.g004

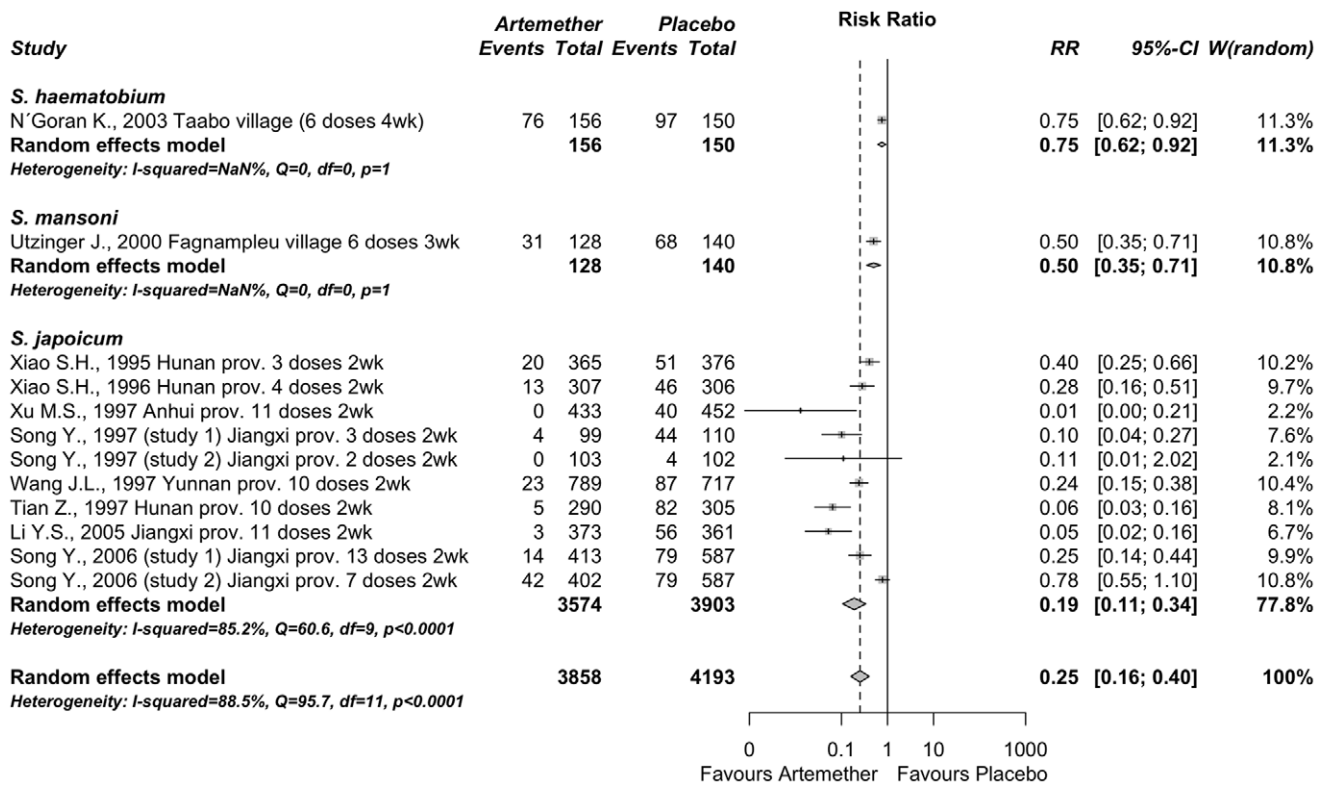
functions before and after artemisinin derivatives administration [37].

**Publication bias analysis.** We assayed the possibility of publication bias evaluating the asymmetry of funnel plots (figure 7) and using the Egger’s regression test. We did not detect the presence of bias in the two meta-analysis of schistosomiasis treatment comparing artemisinin derivatives vs. praziquantel (Figure 1A) and artemisinin derivatives plus praziquantel vs. praziquantel alone (Figure 1B). Studies in both funnel plots show a symmetrical aspect. These visual findings were confirmed with the Egger’s test, which reported values of -0.38 (p = 0.7) and 0.49

(p = 0.7), respectively. However, presence of publication bias was detected in trials included in the two meta-analysis on schistosomiasis prophylaxis, the one related to artesunate vs. placebo (Figure 1C) and that of artemether vs. placebo (figure 1D). Both funnel plots show evidence of bias, more notable in the analysis including artemether. These visual asymmetries are confirmed by the Egger’s test that gave values of -5.29 (p<0.001) and -5.14 (p<0.001), respectively. We did not perform any assessment of publication bias in the meta-analysis focused on artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine vs. praziquantel due to low number of studies included in that sub-unit of analysis.



**Figure 5. Meta-analysis comparing artesunate vs. placebo for chemoprophylaxis against schistosomiasis japonica.** The mid-points of the lines represent the relative risk and the end-points of the lines show the corresponding 95% C.I. The diamond at the bottom is the overall relative risk. The vertical line emphasizes an relative risk = 1 (no difference) and the dashed vertical line shows the value of the overall relative risk. Relative risk <1 indicates a protective effect of artesunate. The original reports are labeled with author name, year, and location, number of dosis and interval of administration (for details see table 4). doi:10.1371/journal.pone.0045867.g005



**Figure 6. Subgroup meta-analysis comparing Artemether vs. placebo for chemoprophylaxis against schistosomiasis.** The mid-points of the lines represent the relative risk and the end-points of the lines show the corresponding 95% C.I. Intermediate diamond symbols are combined relative risks for each subgroup and the diamond at the bottom is the overall combined relative risk. The vertical line emphasizes an relative risk = 1 (no difference) and the dashed vertical line shows the value of the overall relative risk. Relative risk < 1 indicates a protective effect of artemether. The original reports are labeled as follows: author name, year, and location, number of doses and interval of administration, for details see table 5. doi:10.1371/journal.pone.0045867.g006

## Discussion

Schistosomiasis continues to be an important debilitating illness, in particular when associated with other potential causes of morbidity in tropical regions. Environmental changes, international travel and migratory populations increase the prevalence of schistosomiasis. The failure to develop an effective vaccine and the failure to eliminate snail populations mean that the control of schistosomiasis must rely on large-scale chemotherapy. The administration of praziquantel in a regimen of 40 mg/kg body-weight in a single dose has been useful for controlling this disease in several countries such as Egypt, China, Brazil, the Philippines, Puerto Rico, Tunisia, Morocco, and Saudi Arabia [53]. However, rapid reinfection, incomplete cure rates, and evidence of praziquantel-tolerant schistosomes in the laboratory suggest a high risk of the development of praziquantel resistance [12].

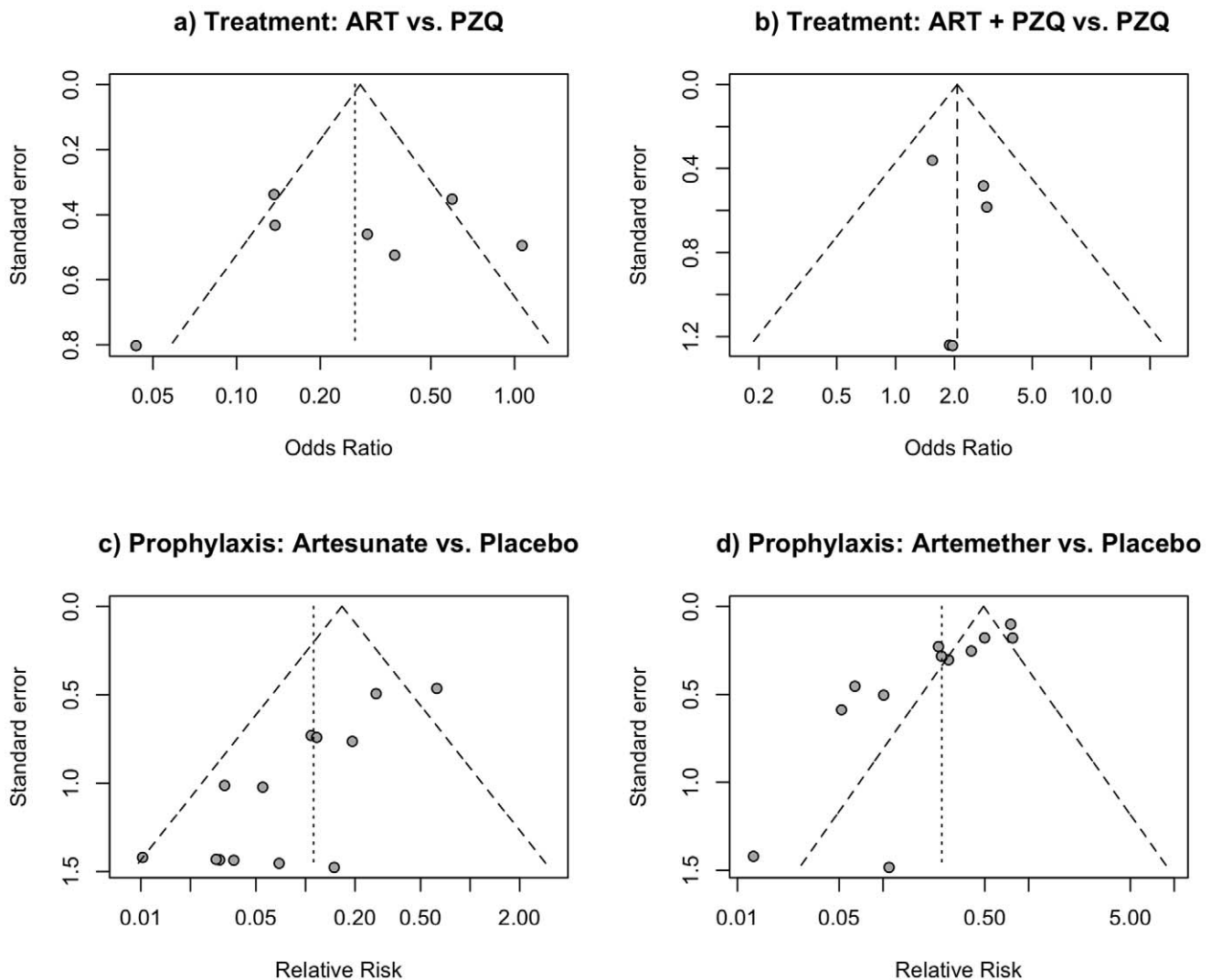
Artemisinin derivatives currently offer the most important alternative for schistosomiasis treatment. They are effective against the juvenile stages of *S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*, but are less effective against adult worms. Our results demonstrate that artesunate in monotherapy does not offer an alternative for schistosomiasis treatment; none of the trials included in our meta-analysis seemed to significantly favor artesunate over praziquantel as monotherapy. Artesunate monotherapy may not be beneficial because its activity only affects the early stages of the parasite. In contrast, praziquantel acts against the mature forms of the parasite, curing 60 to 90 percent of patients. We measured efficacy of artemisinin derivatives at earliest after treatment in the context of continued disease transmission, in this sense some

researchers have suggested that 3 weeks might be best [54]. However, more studies are needed to assess the effect of the evaluation period on the treatment outcome in those patients infected with schistosomiasis and treated with artemisinin derivatives.

Despite the incomplete efficacy of artemisinin derivatives alone in terms of cure rates, their pharmacological activities provide an excellent opportunity to combine with praziquantel. Our study confirms the Liu *et al.* [55] meta-analysis that support that artemisinin derivative *plus* praziquantel used in combination significantly increase the cure rates of schistosomiasis in comparison with praziquantel alone. The rationale for choosing combination treatments is to ensure rapid and reliable cures and to avoid the development of resistance to praziquantel. However, these estimated results cannot be regarded as definitive because they are based on diverse populations and the sample size of the trials included is small. Nevertheless, meta-analysis methodology may help to improve the power of small exploratory trials, including the broadest range of data (over multiple locations).

The adverse effects related with artemisinin derivatives were mild, artemether and artesunate were both well tolerated. Furthermore, studies that evaluated the antimalarial combination of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine efficacy in schistosomiasis presented significant less adverse effects compared with praziquantel. Finally, no additional side-effects caused by possible interactions between praziquantel and artemisinin derivatives were detected across the studies. Taken together, these results indicate





**Figure 7. Funnel plots of different subunits of analysis representing effect size against standard error.** A vertical line indicates the estimate summary effect based on each particular model. A pseudo confidence interval region is drawn around this value with bounds equal to  $\pm 1.96 \cdot SE$ , where SE is the standard error value from the vertical axis. doi:10.1371/journal.pone.0045867.g007

that the incorporation of artemisinin derivatives do not present any limitation related with the increase of adverse effects.

However, the incorporation of artemisinin derivatives in mass praziquantel administration has three important limitations: first, the cost-effectiveness implications; second, owing to the sub-optimal biopharmaceutical properties (very short half-life) of artemisinin derivatives repeated treatments are required [56], and third the use of artemisinin derivatives in mass administration could contribute to the emergence of artemisinin-resistant malaria [57]. Our meta-analysis shows that artesunate *plus* sulfadoxine-pyrimethamine does not offer a benefit over praziquantel-based therapy for *S. mansoni* and *S. haematobium* infections. Note that, to date no studies were carried out to evaluate changes on schistosomiasis endemicity as a function of the large-scale use of artemisinin based therapy in malaria control programmes.

Praziquantel is a poor choice for chemoprophylaxis because of its short half-life (1 to 1.5 hours) and because it cannot kill the schistosomula stage of the parasite [58]. However, a better option for schistosomiasis prophylaxis could be the use of artemisinin derivatives because they are active against schistosomula stage

[18]. In fact, our results have shown the prophylactic activity of artesunate and artemether. This is in accordance with some previous published reviews [13,14,52,55] and a former meta-analysis performed by Wu *et al.* in 2003 [59]. Despite various levels of endemicity, different ecological settings and the diverse backgrounds of the participants, the prophylactic effect of artemisinin derivatives was demonstrated in each trial. It may be concluded that the prophylactic effect of artemisinin derivatives should be considered highly relevant in *S. japonicum* infection. Many clinical trials which focused on *S. japonicum* have shown that artesunate and artemether administered in multiple doses reduce the incidence of the infection to a significant extent, especially in those studies in which the target population was exposed to the infection at a specific moment because of flooding. However, the quality of the reports that evaluate the role of artemisinin derivatives as prophylactic drug was not optimal. In addition, we detected the presence of publication bias for artesunate and artemether prophylaxis meta-analysis. Thus, the quantitative RR found might be affected in some extension by publication bias. New schistosomiasis trials focused on the prophylactic effect of

artemisinin derivatives should be conducted paying attention to quality issues. In this sense, a previous report described the methodological limitations linked to clinical trials focused on schistosomiasis [60]. Finally, the meta-analysis of artemisinin derivatives focused on chemoprophylactic activity against schistosomiasis has also two key limitations: first, the difficult access to some trials published in Chinese language and second the lack of studies reporting efficacy of artemisinin derivatives as chemoprophylactic drug in *S. mansoni* and *S. haematobium* infections.

In sum, the combination of artemisinin derivatives with praziquantel seems to be the best option for the treatment of schistosomiasis, reflecting their complementary pharmacological profiles against this disease. In addition, the auxiliary benefit of artemisinin combination treatment administered to malaria patients should be evaluated in schistosome endemic areas. We also confirm the prophylactic effect of artemisinin derivatives across the different trials performed in China. Finally, we hope to provide clinicians and policy-makers with a convenient and evidence-based summary of the primary literature on which to base their decisions.

## Supporting Information

### Table S1 Summary characteristics and quality assessment of the published studies focused on schistosomiasis treatment.

## References

- 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. *Lancet Infect Dis* 6: 411–425.
- Tchuem Tchuenté LA, Southgate VR, Jourdan J, Webster BL, Vercruyse J (2003) *Schistosoma intercalatum*: an endangered species in Cameroon? *Trends Parasitol* 19: 389–393.
- Muth S, Sayasone S, Odermatt-Biays S, Phompida S, Duong S, et al. (2010) *Schistosoma mekongi* in Cambodia and Lao People's Democratic Republic. *Adv Parasitol* 72: 179–203.
- Greer GJ, Ow-Yang CK, Yong HS (1988) *Schistosoma malayensis* n. sp.: a *Schistosoma japonicum*-complex schistosome from Peninsular Malaysia. *J Parasitol* 74: 471–480.
- Utzinger J, Raso G, Brooker S, De Savigny D, Tanner M, et al. (2009) Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology* 136: 1859–1874.
- Guyatt HL, Brooker S, Kihamia CM, Hall A, Bundy DA (2001) Evaluation of efficacy of school-based anthelmintic treatments against anaemia in children in the United Republic of Tanzania. *Bull World Health Organ* 79: 695–703.
- Danso-Appiah A, Utzinger J, Liu J, Olliaro P (2008) Drugs for treating urinary schistosomiasis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000053.
- Utzinger J, Keiser J (2004) Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother* 5: 263–285.
- King CH, Dickman K, Tisch DJ (2005) Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* 365: 1561–1569.
- Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH (2003) Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol* 19: 509–515.
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J (2008) Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 21: 659–667.
- Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guisse F, et al. (2001) Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health* 6: 864–873.
- Xiao SH, Keiser J, Chen MG, Tanner M, Utzinger J (2010) Research and development of antischistosomal drugs in the People's Republic of China: a 60-year review. *Adv Parasitol* 73: 231–295.
- Xiao SH, Booth M, Tanner M (2000) The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. *Parasitol Today* 16: 122–126.
- Utzinger J, Tanner M, Keiser J (2010) ACTs for schistosomiasis: do they act? *Lancet Infect Dis* 10: 579–581.
- Adjuik M, Babiker A, Garner P, Olliaro P, Taylor W, et al. (2004) Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet* 363: 9–17.
- White NJ (2008) Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 320: 330–334.

(DOC)

### Table S2 Summary characteristics and quality assessment of the published studies focused on schistosomiasis prophylaxis.

(DOC)

### Table S3 PRISMA Checklist.

(DOC)

## Acknowledgments

The authors thank the Library staff of the University of Salamanca, in particular Mrs. Elena Martín-Rodero for her assistance in retrieving the articles. Finally, we gratefully acknowledge Dr. Jesús Pérez-Losada and Dr. Bernardo Foth for reviewing the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LPV FJB JLA AM. Performed the experiments: LPV FJB. Analyzed the data: LPV FJB. Contributed reagents/materials/analysis tools: LPV FJB JLA AM. Wrote the paper: LPV FJB AM.

- Keiser J, Utzinger J (2007) Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. *Curr Opin Infect Dis* 20: 605–612.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 6: e1000097.
- Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, et al. (1996) Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 17: 1–12.
- Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR (2009) *Introduction to Meta-Analysis*. Chichester U.K.: John Wiley and Sons Ltd.
- DerSimonian R, Laird N (1986) Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 7: 177–188.
- Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C (1997) Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 315: 629–634.
- Schwarzer G (2012) *meta: Meta-Analysis with R*.
- Borrmann S, Szlezak N, Faucher JF, Matsiegui PB, Neubauer R, et al. (2001) Artesunate and praziquantel for the treatment of *Schistosoma haematobium* infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 184: 1363–1366.
- De Clercq D, Vercruyse J, Kongs A, Verle P, Dompnier JP, et al. (2002) Efficacy of artesunate and praziquantel in *Schistosoma haematobium* infected schoolchildren. *Acta Trop* 82: 61–66.
- Inyang-Etoh PC, Ejezie GC, Useh MF, Inyang-Etoh EC (2009) Efficacy of a combination of praziquantel and artesunate in the treatment of urinary schistosomiasis in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 38–44.
- Keiser J, N'Guessan NA, Adoubryn KD, Silue KD, Voumatsou P, et al. (2010) Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, and praziquantel against *Schistosoma haematobium*: randomized, exploratory open-label trial. *Clin Infect Dis* 50: 1205–1213.
- De Clercq D, Vercruyse J, Verle P, Kongs A, Diop M (2000) What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? *Trop Med Int Health* 5: 744–746.
- De Clercq D, Vercruyse J, Verle P, Niassé F, Kongs A, et al. (2000b) Efficacy of artesunate against *Schistosoma mansoni* infections in Richard Toll, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 90–91.
- Hou XY, McManus DP, Gray DJ, Balen J, Luo XS, et al. (2008) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of safety and efficacy of combined praziquantel and artemether treatment for acute schistosomiasis japonica in China. *Bull World Health Organ* 86: 788–795.
- Sissoko MS, Dabo A, Traore H, Diallo M, Traore B, et al. (2009) Efficacy of artesunate + sulfamethoxy-pyrazine/pyrimethamine versus praziquantel in the treatment of *Schistosoma haematobium* in children. *PLoS One* 4: e6732.
- Obonyo CO, Muok EM, Mwinzi PN (2010) Efficacy of artesunate with sulfalene plus pyrimethamine versus praziquantel for treatment of *Schistosoma mansoni* in Kenyan children: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 10: 603–611.

34. Wu LJ, Li SW, Xuan YX, Xu PS, Liu ZD, et al. (1995) Field application of artesunate in prophylaxis of schistosomiasis: an observation of 346 cases. *Chin J Schisto Control* 7: 323–327.
35. Xu MS, Zhang SQ, Li SW, Wang TP, Chen JR, et al. (1999) Field application of oral artesunate for preventing *Schistosoma japonicum* infection. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Disease* 17: 241–243.
36. Li HY, Liu ZD, Hu LS, Liu YM, Hu F, et al. (1999) Observation on the prevention of schistosomiasis japonica by administration of artesunate long term. *Chin J Parasit Dis Control* 12: 412.
37. Zhang SJ, Lin DD, Xu MS, Yi ZH, Zhang SQ, et al. (2000) Clinical trials on preventive effect of artesunate on schistosomiasis japonica. *Med Diagn Treat* 11: 68–72.
38. Lu GY, Lin GJ, Sun MX, Cui JE, Wu QZ (2000) Probe on scheme with oral artesunate protecting people from infection of schistosome. *Chin J Parasitol Parasit Dis Contr* 13: 212–214.
39. Li SW, Wu LJ, Liu ZD, Hu LS, Xu YX, et al. (1996) Studies on prophylactic effect of artesunate on schistosomiasis japonica. *Chin Med J* 109: 848–853.
40. Tian ZY, Liu DS, Xiao ZW, Zhou YC, Qu GS, et al. (2001) A cost-effectiveness study of artesunate in the prophylaxis of schistosomiasis in an endemic area. *Chin J Schisto Control* 13: 299–300.
41. Xiao SH, Shi ZG, Zhou SJ, Wang CZ, Zhang ZG, et al. (1995) Field studies on the preventive effect of oral artemether against schistosomal infection. *Chin J Parasitol Parasit Dis* 13: 170–173.
42. Xiao SH, Wang JL, Wang Z, Yang Z, Chu B, et al. (1996) Protection of the residents from schistosome infection using oral artemether in mountainous endemic area. *Chin J Parasitol Parasit Dis* 14: 11–14.
43. Xu MS, Xiao SH, Song Q, Tao CG, Xia CG, et al. (1997) Observation on the effect of artemether on controlling schistosomiasis japonica in an endemic area of marshland. *Chin J Parasitol Parasit Dis* 15: 212–215.
44. Tian ZY, Xiao SH, Xiao JW, Zhou YC, Liu DS, et al. (1997) Reduction of *Schistosoma japonicum* infection in an endemic area in islet with embankment after prophylaxis with oral artemether throughout the transmission season. *Chin J Parasitology Parasit Dis* 15: 208–211.
45. Song Y, Xiao SH, Wu W, Zhang SJ, Xie H, et al. (1998) Preventive effect of artemether on schistosome infection. *Chin Med J* 111: 123–127.
46. Wang JL, Xiao SH, Yang Z, Wang MK, Yang H, et al. (1997) Effect of oral artemether on controlling schistosomiasis in Yunnan mountainous endemic area. *Chin J Parasitol Parasit Dis* 15: 138–142.
47. Song Y, Bao ZP, Gao ZL, Hu QL, Nin A, et al. (2006) Effect of oral artemether in controlling schistosomiasis in a heavy endemic area of Nanji town, Xinjiang county, Jiangxi province. *J Trop Med* 6: 1182–1185.
48. Li YS, Chen HG, He HB, Hou XY, Ellis M, et al. (2005) A double-blind field trial on the effects of artemether on *Schistosoma japonicum* infection in a highly endemic focus in southern China. *Acta Trop* 96: 184–190.
49. N'Goran EK, Utzinger J, Gnaka HN, Yapi A, N'Guessan NA, et al. (2003) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral artemether for the prevention of patent *Schistosoma haematobium* infections. *Am J Trop Med Hyg* 68: 24–32.
50. Utzinger J, N'Goran EK, N'Dri A, Lengeler C, Xiao S, et al. (2000) Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. *Lancet* 355: 1320–1325.
51. Mohamed AA, Mahgoub HM, Magzoub M, Gasim GI, Eldein WN, et al. (2009) Artesunate plus sulfadoxine/pyrimethamine versus praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in eastern Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1062–1064.
52. Xiao SH (2005) Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. *Acta Trop* 96: 153–167.
53. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006) Human schistosomiasis. *Lancet* 368: 1106–1118.
54. Scherrer AU, Sjoberg MK, Allangba A, Traore M, Lohourignon LK, et al. (2009) Sequential analysis of helminth egg output in human stool samples following albendazole and praziquantel administration. *Acta Trop* 109: 226–231.
55. Liu R, Dong HF, Guo Y, Zhao QP, Jiang MS (2011) Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors* 4: 201.
56. Gautam A, Ahmed T, Batra V, Paliwal J (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of endoperoxide antimalarials. *Curr Drug Metab* 10: 289–306.
57. McManus DP, Loukas A (2008) Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21: 225–242.
58. Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, et al. (2002) Schistosomiasis. *N Engl J Med* 346: 1212–1220.
59. Wu TX, Liu GJ, Zhang MM, Wang Q, Ni J, et al. (2003) [Systematic review of benefits and harms of artemisinin-type compounds for preventing schistosomiasis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83: 1219–1224.
60. Danso-Appiah A, Garner P, Olliaro PL, Utzinger J (2009) Treatment of urinary schistosomiasis: methodological issues and research needs identified through a Cochrane systematic review. *Parasitology* 136: 1837–1849.

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES

1. El proceso inflamatorio, desarrollado en nuestro modelo de variabilidad genética controlada a partir de un retrocruce *Mus musculus x Mus spretus*, se correlaciona positivamente con el grado de infiltración celular y el porcentaje de linfocitos B circulantes.
2. La variabilidad en la respuesta inflamatoria en dicho modelo se asocia a una región genómica localizada en el cromosoma 2. Además, la heterogeneidad de los niveles basales de leucocitos y de la proliferación leucocitaria de sangre periférica presenta una posible asociación con otras catorce regiones genómicas. Ello sugiere un complejo control genético de la variabilidad de estos procesos fisiológicos.
3. El fenotipo sanguíneo más relevante asociado con una mayor tolerancia a la infección por *Schistosoma mansoni* en *Mus spretus* es el incremento del número de neutrófilos detectado en la fase aguda de la infección.
4. El elevado número de granulocitos en la fase aguda de la esquistosomosis, así como el aumento del número de monocitos, neutrófilos y linfocitos B en la fase crónica de la enfermedad, son los fenotipos relacionados a una mayor resistencia a la esquistosomosis en el ratón híbrido F1B6CBA.
5. La combinación de praziquantel y derivados de la artemisinina es el tratamiento más eficaz de la esquistosomosis en áreas endémicas.
6. Se confirma el efecto profiláctico de los derivados de la artemisinina a través de los diferentes ensayos clínicos realizados en China. Sin embargo, se identifica un sesgo de publicación en los estudios incluidos.

Apéndice A

## ANEXO METODOLÓGICO

## **A.1. Material parasitario y animales de experimentación**

### **A.1.1. Obtención de cercarias a partir de caracoles infectados**

Antes de la infección de los ratones se deben de obtener las cercarias suficientes a partir del vector, *Biomphalaria glabrata*, que las libera por la acción de un foco de luz intensa.

Se debe extremar las precauciones en esta fase del ciclo, para evitar que las cercarias entren en contacto con el investigador. Los guantes, gafas, y la bata correctamente abrochada son de uso obligatorio.

#### **Materiales:**

- Caracoles *Biomphalaria glabrata* infectados.
- Agua mineral.
- Foco de luz.
- Placa de Petri.
- Microscopio de disección.

#### **Procedimiento:**

1. Para recoger las cercarias para fines experimentales, colocar los caracoles que las emiten en un volumen de agua correspondiente a 2ml/caracol.
2. Colocar el recipiente con los caracoles infectados bajo una fuente intensa de luz durante 1-2h. Mantener la temperatura del agua a 30°C.
3. Con unas pinzas y de forma cuidadosa se retiran los caracoles del vaso de precipitados y se colocan en su acuario.
4. Hacer pasar el contenido del vaso a través de un filtro de 100µm, ello permite el paso de las cercarias y limpia la suspensión de cercarias de las heces de los caracoles.
5. Colocar 1ml de la suspensión de cercarias repartidas en alícuotas sobre la placa de Petri y contar las cercarias intactas con ayuda de un microscopio de disección, se deben realizar al menos tres recuentos o contajes.
6. Utilizar las cercarias para infectar los animales de laboratorio.

### **A.1.2. Infección del hospedador definitivo**

La infección en todos los experimentos se realizará mediante exposición percutánea abdominal. El uso de este método de infección posee claras ventajas sobre otros métodos como el baño en agua con cercarias en suspensión o la infección por vía subcutánea. En primer lugar, al pipetear el mismo volumen

de la suspensión de cercarías, homogéneamente disueltas, se controla que cada animal reciba el mismo número de cercarías; en segundo lugar, se delimita una superficie de contacto; y, en tercer lugar, nos aseguramos que cada cercaría tenga una gran probabilidad de penetrar en la piel, puesto que por la influencia de la gravedad se facilita que cada cercaría se deposite y penetre a través de la piel.

### **Materiales**

- Anestésico disociativo: constituido por Ketamina (Imalgene1000®), 100mg/ml), Diazepam (Valium10®), ampollas de 10mg/2ml) y Atropina (Atropina Braun ampollas 1mg/ml). La dosis utilizada fue de 50/5/1 mg/ml a cada ratón.
- Anillos de un diámetro de 1,5cm.
- Cinta de carroceros.

### **Procedimiento**

1. Afeitar cada animal en la parte del abdomen bajo.
2. Inducir una correcta y profunda anestesia.
3. Colocar al animal en posición de decúbito supino y fijarlo a una superficie sólida.
4. Humedecer el abdomen con una gasa.
5. Fijar al animal firmemente y colocar un anillo sobre su abdomen.
6. Pipetear dentro del anillo un volumen de agua que contenga el número de cercarías requerido, (según nuestro diseño experimental 150 cercarias).

#### **A.1.3. Recogida de sangre periférica y suero en el animal de experimentación**

Esta técnica debe ser llevada a cabo únicamente cuando no exista método alternativo, y siempre por personal cualificado debido al elevado riesgo de dañar estructuras adyacentes al globo ocular, lo que puede originar infecciones severas, ceguera, etc.

### **Materiales**

- Capilares tratados con anticoagulante (EDTA, heparina. . . ) para la obtención de sangre total o sin anticoagulante para la generación de suero.
- Anestesia: isoflurano 5% (Forane®).
- Pomada oftálmica (Lubrifilm®).

- Tubos Eppendorf (1.5ml).
- Tubos Vacutainer® (Cat. 367841) con anticoagulante.

### **Procedimiento**

1. Una vez anestesiado el ratón y comprobado que se ha alcanzado el plano quirúrgico, sujetar al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración.
2. Insertar el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aprox.) y girar suavemente hasta que la sangre fluya por ella misma.
3. Recoger la muestra y retirar el capilar.
4. Oprimir ligeramente la zona de punción con una gasa o papel para detener la hemorragia.
5. Aplicar pomada oftálmica (Lubriform®) al ojo.
6. Comprobar que la recuperación de la anestesia se produce adecuadamente aportando las medidas que se consideren necesarias para ello (p.e. aporte de calor).
7. Observar al animal los días posteriores al sangrado para detectar la aparición de posibles complicaciones: protrusión de tejido adyacente al ojo, infecciones, hemorragias, etc.
8. Extraer el suero a partir del tubo sin anticoagulante, dejando la sangre a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente centrifugando a 3000 r.p.m. durante 20min. Almacenar a -80°C hasta el momento de su uso.

#### **A.1.4. Necropsia, recuperación de formas adultas y contaje de huevos**

Las formas adultas del parásito fueron recuperadas de la vena porta de cada ratón mediante perfusión después de la 9ª semana post-infección.

### **Materiales**

- Ratones CD1 infectados por *S. mansoni*.
- Pentobarbital sódico (P3761, Sigma).
- Solución salina con heparina (1000 U.I.).
- Jeringuilla de 20ml.
- Microscopio de disección.



- Placa de Petri.
- Material quirúrgico.

### **Procedimiento**

1. Anestesiarse los animales con Pentobarbital inyectado de forma intraperitoneal. Dosis: 30mg/kg.
2. Verificar que el animal esté profundamente anestesiado.
3. Abrir el abdomen y la caja torácica dejando accesible tanto el corazón como la vena porta.
4. Antes de iniciar la perfusión se procede a fotografiar la superficie hepática. Se toman fotografías de tres partes diferentes del hígado de ratón, con el objetivo de valorar el grado de fibrosis hepática.
5. Se procede a perforar la vena porta, se introduce la aguja de una jeringuilla en el ventrículo derecho del corazón y se inyecta cuidadosamente, pero de forma constante, solución salina heparinizada (0,85 % NaCl, 1000U.I. de heparina).
6. La perfusión dura alrededor de 5 minutos por ratón y si se ha llevado a cabo correctamente, se puede observar cómo todos los órganos del ratón toman un color pálido. 6. Recuperar y pesar hígado, bazo e intestino.
7. Realizar una digestión con KOH 5% durante 16-24h.
8. Contaje de huevos procedentes de los tejidos digeridos con ayuda de una cámara McMaster. Presentar los resultados como huevos por gramo de tejido.

## A.2. Técnicas hematológicas (Hemavet®)

### Breve descripción del equipo

El equipo Hemavet M-950HV® es un hemocitómetro que nos proporciona magnitudes sanguíneas de la serie blanca, roja y plaquetaria a partir de volúmenes pequeños de sangre periférica.

### Especificaciones del sistema

- Kit de reactivos: FS-PAK™ Multispecies Reagent Kit. Contains MULTI-CELL3™ DILUENT, CELLYSE XI3™, CELLYSE XII3™ and C D Clean™.
- Volumen de muestra requerido: mínimo 20 µL.
- Tiempo que necesita para realizar el “START-UP” = 5 minutos.
- Tiempo del ciclo corto de limpieza: 15 minutos.
- Tiempo del ciclo largo de limpieza: 30 minutos.
- Tiempo del análisis por muestra: 2 minutos.

### Operaciones previas al análisis

- Se toman al menos 20µL de sangre total.
- Utilizar tubos con EDTA-K3 o heparina como anticoagulante.
- Colocarlos en Speci-Mix blood rocker, mínimo durante 10 minutos. o Sacar los tubos y realizar un movimiento de inversión manual mínimo 3 veces.
- Observar cuidadosamente las muestras, en caso de existir coágulos desechar la muestra.

### Procedimiento

1. Realizar un ciclo largo de limpieza: 30 minutos.
2. Homogenizar la muestra en los tubos con anticoagulante.
3. Transvasar 20 µL a un tubo de 1,5 mL (Eppendorf®).
4. Colocar el tubo en el soporte.
5. Cuando aparezca en la pantalla “MIX SAMPLE”.
6. Teclear la especie animal que corresponda ej: “MOUSE” para comenzar el análisis.

### **A.3. Técnicas inmunológicas, respuesta inmune humoral**

#### **A.3.1. Preparación del antígeno somático de *S. mansoni***

##### **Materiales**

- Inhibidores de proteasas: EDTA (E6758, Sigma), PMSF (P7626, Sigma), Pepstatin A (P5318, Sigma), Aprotinina (A6279, Sigma).
- PBS estéril.
- Material biológico del parásito.
- Sonicador.
- Kit BCA (23235, Pierce) para medir la concentración de proteínas.

##### **Procedimiento**

1. Se parte de la cantidad de antígeno procedente de 20 parejas de parásito/ml; trabajar siempre sobre hielo.
2. Lavar los vermes 3-4 veces en PBS pH 7,2 estéril.
3. Incorporar los siguientes inhibidores de proteasas a las concentraciones indicadas en la tabla.
4. Macerar con una varilla estéril.
5. Someter al homogenizado a tres ciclos de congelación/descongelación.
6. Centrifugar a 30.000 g durante 30 minutos. Recoger el sobrenadante.
7. Realizar una electroforesis.
8. Determinar la concentración de proteína mediante el kit BCA: Se basa en el método de Bradford, la concentración proteica se calcula por colorimetría en un espectrofotómetro.

#### **A.3.2. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos**

##### **Materiales**

- Placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (COSTAR 3369).
- Tampón carbonato, pH 9.6.
- Tampón citrato, pH 5.
- PBS-tween-20 0.005 % (PBST).
- BSA 2 % (A2153, Sigma).

- OPD (o-Phenylenediamine P1526, Sigma).
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (141076, Panreac).
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.
- Anti-IgG total (A-5906, Sigma), anti-IgG1 (5037, Nordic Immunology) y anti-IgG2a (5018, Nordic Immunology).

### **Procedimiento**

1. Tapizar cada pocillo de una placa de poliestireno de fondo plano con 100 µl del antígeno somático (AgSo) de *S. mansoni* en tampón carbonato, pH 9.6, con una concentración de 5 µg/ml.
2. Incubar durante 24 horas a 4<sup>o</sup> C.
3. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150 µL PBST durante 4 min.
4. Se incorpora 100 µl por pocillo de una solución BSA 2 %. Cubrir la placa con papel aluminio e incubar (60 min. a 37 °C).
5. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150 µL PBST durante 4 min.
6. Diluir los sueros a 1/100 en PBST y dispensarlos por duplicado (100 µl/pocillo). Cubrir la placa con papel aluminio e incubar (60 min., T<sup>a</sup> 37 °C).
7. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150µL PBS-tween-20 0.005 % durante 4 min.
8. Añadir 100 µl en cada pocillo de la anti-inmunoglobulina a una dilución adecuada en PBST. Cubrir la placa con papel aluminio e incubar (60 min., T<sup>a</sup> 37 °C).
9. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150µL PBST durante 4 min.
10. Añadir 100 µl de solución de revelado que consta de 10 ml de tampón citrato pH 5,4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.028 mg de OPD.
11. Incubar en oscuridad durante 10 min.
12. Parar la reacción con 50µl por pocillo de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y leer la placa en un lector de ELISA a 450nm (SLT- labinstruments, EAR 400 FT).

## A.4. Técnicas inmunológicas, respuesta inmune celular

### A.4.1. Citometría de flujo

#### Material

- Solución A de descongelación (almacenar a 4°C); para preparar 100ml añadir: 20ml FCS (12138C, Sigma), 1000 UI Heparina sódica (Laboratorios Rovi), 25mg DNase (D5319, Sigma), 75ml DMEM (D5396, Sigma).
- Buffer de lavado: PBS 2% FCS.
- Buffer de lisis (almacenar a 4°C, pH 7,4): 154mM NH<sub>4</sub>Cl (A9438, Sigma), 10mM (P9144, Sigma), 0.082mM de EDTA (E6758, Sigma).
- Buffer de fijación: 2% de p-formaldehído en PBS.
- Anticuerpos (AB): CD-45-PERCP-Cy5. (550994), CD8b-PE (550798), CD-4 FITC (553047), B220-APC (553092), GR-1-FITC (553127), Mac 1 CD11b PE (553311), CD16/CD32 (553141).

#### Procedimiento

1. Lisado de las células:
  - a) Incorporar 35 µL de sangre completa/pocillo.
  - b) Añadir 150µl de buffer de lisis, homogeneizar y esperar (30´).
  - c) Centrifugar (1000-2000rpm, T<sup>a</sup> ambiente, (3´), en centrífuga de placa).
  - d) Decantar de forma suave y repetir la operación.
  - e) Incorporar 150µl de solución de lavado, se homogeniza.
  - f) Centrifugar (1000-2000rpm, T<sup>a</sup> ambiente, (3´), en centrífuga de placa).
  - g) Decantar de forma suave.
2. Preparación de los tubos de compensación del citómetro:
  - a) Descongelar células de médula ósea (M.O.) de ratón (alícuota de 1 ml en 5-10% DMSO). Sacar una alícuota de la cámara de -80°C, se descongela y se incorpora a 10mL de la "solución A" precalentada a 37°C durante al menos 10 min. Homogeneizar suavemente, y dejar a 37°C durante 15´.
  - b) Centrifugar el tubo con las células de M.O. de ratón (1000-2000rpm 3´T<sup>a</sup> ambiente), se decanta y se diluye en 6mL de buffer de lavado.
  - c) Se alícuota en 5 tubos del citómetro: 2mL en el primer tubo, 1mL en los cuatro restantes.

- d) Se centrifuga (1000-2000rpm 3'T<sup>a</sup> ambiente) y se decantan los tubos.
3. Incorporar el anticuerpo de bloqueo CD16/32, (no es necesario oscuridad):
- a) Se añaden 25 µl/pocillo del AB de bloqueo a la dilución (0,5 µl AB/ 25 µl solución de lavado) a las placas y a los tubos de compensación del citómetro.
- b) Se homogeniza y se deja reposar aproximadamente 5' sobre hielo.
4. Preparación de MASTERMIX 1: Placa de la serie linfoide:

AB serie linfoide	Dilución	Nº de muestras	Vol
CD45	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>1</sub>
CD4	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>2</sub>
CD8	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>3</sub>
B220	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>4</sub>

- b) V ab:  $(V_1+V_2+V_3+V_4) = (n_1) \mu\text{l}$
- c) V final=  $((25 \mu\text{l}/\text{muestra} \times n^\circ \text{ de muestra}) - (n_1) \mu\text{l})$
- d)  $(n_1) \mu\text{l}$  se diluye en el volumen final de buffer de lavado.
5. Preparación de MASTERMIX 2: Placa de la serie mieloide:

AB serie mieloide	Dilución	Nº de muestras	Vol
Gr1	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>1a</sub>
Mac-1	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>2a</sub>
NK-Biot	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>3a</sub>
CD45	1µl/25 µl y muestra	n	V <sub>3a</sub>

- b) V ab:  $(V_{1a}+V_{2a}+V_{3a}+V_{4a}) = (n_2) \mu\text{l}$
- c) V final=  $((25 \mu\text{l}/\text{muestra} \times n^\circ \text{ de muestra}) - (n_2) \mu\text{l})$
- d)  $(n_2) \mu\text{l}$  se diluye en el volumen final de buffer de lavado.
6. Preparación de MASTERMIX 3: Tubos de calibración de citómetro:

- a) Se prepara con anterioridad para un N<sup>o</sup> de determinaciones. DILUCIÓN= (0,5 µl AB o isotipo / 25 µl solución de lavado).
- b) Indica qué colores y qué isotipos incorporamos a cada tubo de calibración. Se marca con una (XXX) el isotipo que se incorpora.

Tubo Cal.	AB (0,5µl)	Isotipos (0,5µl/isotipo)			
		FITC	PE	PerCP	APC
0	Sólo isotipos	XXX	XXX	XXX	XXX
1	GR-1-FITC		XXX	XXX	XXX
2	Mac-1-PE	XXX		XXX	XXX
3	CD45-PerCP	XXX	XXX		XXX
4	B220-APC	XXX	XXX	XXX	

- d)  $\text{Vol} = (25 \mu\text{l}/\text{TUBO y determinación})$ .
  - e)  $V \text{ AB (n)} \mu\text{l} = (0,5\mu\text{l AB} / \text{ tubo y determinación})$ .
  - f)  $V$  por cada ISOTIPO  $\mu\text{l} = (0,5\mu\text{l}/ \text{ isotipo y determinación})$ . Tanto el volumen del AB como el volumen correspondiente a los isotipos se incorporan a un volumen final de buffer de lavado.
  - g)  $V \text{ final} = \text{Vol} - (V \text{ AB} + V \text{ ISOTIPOS})/\text{determinación}$ .
  - h) Por lo tanto, tendremos un MASTERMIX 3 para cada tubo de compensación.
7. Una vez preparados los MASTERMIX se dejan sobre hielo hasta su utilización.
8. Incorporar el AB primario:
- a) No lavar las placas.
  - b) Se añaden 25  $\mu\text{l}$ /pocillo (MASTERMIX 1 a la placa de la serie linfoides, MASTERMIX 2 a la placa de la serie mieloides y MASTERMIX 3 a los tubos de compensación del citómetro).
  - c) Se homogeniza y se deja reposar de 20' a 30' sobre hielo (10' a T<sup>a</sup> ambiente) y oscuridad.
  - d) Las placas se lavan con 100  $\mu\text{l}$  de solución de lavado, se mezclan con la pipeta multicanal, se centrifugan (1000-2000 rpm 3'T<sup>a</sup> ambiente) y se decantan.
  - e) Los tubos de compensación se lavan con 2ml de solución de lavado, vórtex suave, se centrifugan (1000-2000rpm 3'T<sup>a</sup> ambiente) y decantan.
  - f) Si no existe ningún AB biotinilado, se añaden 100  $\mu\text{l}$  de solución de lavado, se mezcla y se introducen en tubos de FACS. Se deja en la oscuridad.
9. Se incorpora el AB secundario en caso de tener algún AB biotinilado:
10. Incorporación del AB secundario en caso de tener AB biotinilados:
- a) Se añade a la placa correspondiente y a los tubos de compensación: 25  $\mu\text{l}$ /muestra.
  - b) Preparar el AB a la dilución adecuada:  $\text{DILUCIÓN} = (0,5 \mu\text{l Biot-AB} / 25 \mu\text{l solución de lavado})$ .
  - c)  $V \text{ final} = 25 \mu\text{l}/\text{muestra} \times n^{\circ}$  de muestras.
  - d)  $V \text{ AB: } 0,5\mu\text{l}/\text{pocillo} \times n^{\circ}$  de muestras = (n)  $\mu\text{l}$ . Por lo tanto, (n)  $\mu\text{l}$  se diluye en el V final de buffer de lavado.
  - e) Se incuban de 20' a 30' sobre hielo o 10' a T<sup>a</sup> ambiente.

- f)* La placa se lava con 100  $\mu$ l de solución de lavado, se mezcla, se centrifuga (1000-2000rpm 3', T<sup>a</sup> ambiente) y se decanta.
- g)* Los tubos de compensación se lavan con 2 ml de solución de lavado, vórtex suave, se centrifugan (1000-2000rpm 3'T<sup>a</sup> ambiente) y se decantan.
- h)* Se añaden 100  $\mu$ l de solución de lavado, se mezclan y se introducen en tubos pequeños de 2 ml sobre caja-rack (Titertube).

11. Incorporar el fijador:

- a)* Se incorpora 100  $\mu$ l/muestra de fijador en las placas y en los tubos de calibración.
- b)* Se deja a 4<sup>o</sup>C y en oscuridad hasta el día siguiente.

12. Análisis de los resultados: El inmunofenotipo de los ratones se realizó mediante un citómetro FASC®Scalibur de cuatro colores del Servicio de Citometría de Flujo de la Universidad de Salamanca. El análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo v.7.6 para Windows.



## A.5. Técnicas estadísticas aplicadas a datos biológicos

### A.5.1. Análisis estadísticos de la matriz de datos genéticos

En genética, la correlación entre dos variables dicotómicas que no presentan una distribución continua se estima mediante el coeficiente  $\phi$ . Se calcula usando la misma fórmula que para el coeficiente de correlación de Pearson, y se relaciona con el estadístico chi-cuadrado para testar la asociación entre dos variables binarias [1]. De hecho, se demuestra que  $\phi = \sqrt{r^2}$  donde  $r^2$  es la medida de asociación definida como “*Desequilibrio de Ligamiento*”. En nuestro modelo experimental se usarán los estudios de correlación entre los distintos marcadores para comprobar que los eventos de recombinación genética ocurren entre marcadores cercanos.

### A.5.2. Análisis estadístico de la matriz de datos fenotípicos

#### Estudio de correlación

El primer paso para describir las relaciones fenotípicas existentes en un organismo es calcular una matriz de correlación entre todas las variables en estudio. El término correlación se utiliza frecuentemente para medir la asociación entre dos variables. Un coeficiente de correlación es una medida de asociación simétrica, e invariante a los cambios de escala, entre dos variables. Varía desde -1 a +1, que representarían una correlación perfecta positiva o negativa, mientras que un valor de 0 implicaría la no existencia de correlación. El signo negativo se interpreta cuando altos valores de una variable están asociados con valores pequeños de otra variable. Por otro lado, si dos variables tienden a aumentar simultáneamente presentarán un signo positivo.

El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) es la versión paramétrica del análisis de correlación, y viene definido por la fórmula:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

Se puede observar que el valor absoluto de  $r$  será menor de 1 a menos que se observe una “correlación lineal”, es decir, una correlación perfecta entre variables; además, es posible testar la significación estadística transformando el coeficiente de correlación en una distribución t-student.

#### Análisis de la Varianza (ANOVA)

Para comparar una variable cuantitativa entre varios grupos se realizó el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor, previa comprobación de la normalidad de los datos. El análisis se complementó con un análisis *a posteriori* mediante el procedimiento *Least Significant Difference* (LSD). Si los datos no cumplieron el supuesto de normalidad, entonces se aplicó la versión no paramétrica o test de *Kruskal Wallis*.

## Análisis multivariante: métodos Biplot

Los métodos Biplot son una representación gráfica de datos multivariantes. Su objetivo general es la aproximación de una matriz de datos, de tal forma que permita su modelización a partir de mapas geométricos construidos como proyecciones de nubes de puntos, filas y columnas sobre sub-espacios de ajustes óptimos [2].

Cuando la finalidad es descriptiva, se consideran los datos organizados en matrices rectangulares  $Y$  de orden  $(n \times p)$  y rango  $r$ , por otra de rango  $q$  ( $q < r$ ), a través de su Descomposición de Valores Singulares (DVS),  $Y \simeq U \Sigma V'$  donde  $U$  y  $V$  son matrices de vectores singulares ortonormales, tal que  $U'U = V'V = I$  (siendo  $I$  la matriz identidad) y  $\Sigma$  es una matriz diagonal que contiene los  $a_k$  mayores valores singulares. Para garantizar la unicidad en la representación se realiza una factorización tal que,  $Y \simeq (U \Sigma^s)(\Sigma^{1-s} V')$  =  $AB'$  siendo  $A$  y  $B$  las matrices que contienen las coordenadas de los  $(n+p)$  vectores o marcadores filas  $a_i$  y columnas  $b_j$  a utilizar simultáneamente sobre el gráfico ( $i=1, \dots, n$ ;  $j=1, \dots, p$ ). Dependiendo de los valores dados al escalar en esa factorización se pueden obtener los Biplot Clásicos, el GH ( $s=0$ ) o el JK ( $s=1$ ) [3]. Un HJ-Biplot es una representación gráfica multivariante alternativa para obtener simultáneamente altas calidades de representación para filas y columnas, seleccionando la factorización  $Y \simeq (U \Sigma)(\Sigma V')$  =  $AB'$ . La matriz de marcadores fila  $A = V \Sigma$  tiene las buenas propiedades del JK, y la de marcadores columna  $B = V \Sigma$  las del GH. Sin embargo, el HJ-Biplot presenta la desventaja que no permite reproducir los datos originales ya que  $Y = U \Sigma^2 V'$  [4].

Respecto a la representación gráfica, los individuos (marcadores fila) se observan como puntos y las variables (marcadores columna) como vectores, cuyo sentido representa la dirección en la que aumentan los valores de la variable correspondiente. La longitud de los marcadores columna aproxima la desviación estándar de las variables y el coseno del ángulo entre dos marcadores columna aproxima la correlación entre las variables correspondientes. Cuanto más distantes aparezcan los puntos que representan a los caracteres del centro de gravedad, más variabilidad habrán presentado esos caracteres en el estudio. Cuanto menor sea el ángulo que forman dos vectores que unen el centro de gravedad con los puntos que representan las variables, más correlacionados están los caracteres.

La limitación fundamental a la hora de trabajar con las técnicas multivariantes es la complejidad en la presentación de los resultados y la interpretación de los mismos, sobre todo cuando se tienen muchas variables, debido a las interrelaciones entre ellas y a la variabilidad de características asociadas a los modelos. Ésto ha conducido a muchos investigadores a realizar análisis univariantes para cada una de las variables por separado, con los consecuentes errores u omisiones en la interpretación de sus resultados.

Con el propósito de subsanar estos problemas se han usado los métodos Biplot para representar los resultados de un MANOVA. Así han nacido los denominados Manova-Biplot de una vía o Biplot Canónico, que permiten una representación ponderada de la matriz de medias que consigue las direcciones

con máximo poder discriminante entre grupos. Esta técnica permite poner de manifiesto las principales diferencias entre grupos, las variables responsables de las diferencias y realizar inferencias sobre las variables canónicas y originales mediante círculos de confianza situados sobre los puntos que representan a los grupos [5].

Todo el análisis correspondiente a los métodos biplot fue aplicado usando el programa estadístico MULTBILOT desarrollado en MATLAB por el Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca [6].

### A.5.3. Estadística aplicada a análisis de ligamiento

Los resultados de análisis de ligamiento se muestran de tres formas diferentes: Z-score, Lod-score y p-valor.

- Z-score: es el número de desviaciones estándar por la que la frecuencia de recombinación  $\theta$  excede su distribución bajo la hipótesis nula de 0.50 (independencia de caracteres). El Z-score presenta una distribución normal cuando el tamaño de la muestra es grande.
- LOD-score: se define como el logaritmo en base 10 de la Odd Ratio (o razón de riesgo) y ésta es el cociente de dos probabilidades: la probabilidad de que un QTL esté ligado a un rasgo genético, frente a la probabilidad de que no lo esté. Un Lod score=3 significa que el dato observado es  $10^3$  veces más probable bajo la hipótesis de ligamiento que bajo la hipótesis nula de independencia.
- p-valor: se refiere a una probabilidad única. Más específicamente, el p-valor se obtiene pasando el valor del LOD-score de escala logarítmica a una escala natural ( $\text{LOD} \times [2 \ln 10]$ ). Se demuestra que el valor de probabilidad que se obtiene para una población *backcross* se distribuye según una función chi-cuadrado con 1 grado de libertad.

Para determinar si existe o no asociación entre los distintos marcadores genéticos y un determinado fenotipo en la población *backcross* se adoptará el criterio de Lander & Kruglyak [7], este criterio implica un fuerte control sobre el riesgo de TIPO I, para asegurarse un amplio margen de confianza que limite la detección de regiones génicas “falsas”. A continuación se describen los límites establecidos en términos de LOD score y de p-valor, según estos criterios:

- Posible presencia de ligamiento (sugestivo): aquella región genética que presenta un lod score= 1.5 (p-valor= $3.4 \times 10^{-3}$ ).
- Presencia significativa de ligamiento: aquella región genética que presenta un lod score= 3.3 (p-valor= $1.0 \times 10^{-4}$ ).

Existen varios métodos descritos para realizar un rastreo genético de QTL. El método más simple para calcular el parámetro LOD score es el modelo de regresión [8]:

Partimos de la hipótesis nula de no existencia de QTL a lo largo del genoma. En este caso, se define para el individuo  $i$  el fenotipo  $y_i$  que sigue una distribución normal independientemente del genotipo  $y_{(i)} \sim N(\mu, \sigma^2)$ . Se estiman los valores de  $\mu$  y  $\sigma^2$  mediante el modelo de máxima verosimilitud, consideramos la función de verosimilitud como  $L_0(\mu, \sigma^2) = Pr(data | noQTL, \mu, \sigma^2) = \prod_i \phi(y_i; \mu, \sigma^2)$ , donde  $\phi$  es la densidad de la distribución normal. Para este modelo el valor de  $\mu$  es simplemente la media de los fenotipos y para la  $\sigma^2$  es  $RSS_0/n$  donde  $RSS_0 = \sum (y_i - \bar{y})^2$  es la suma de residuales al cuadrado y  $n$  es el tamaño de la muestra. Si se aplican logaritmos, el  $\log_{10}$  de la función máximo verosímil se reduce a la siguiente expresión  $-\frac{n}{2} \log_{10} RSS_0$ .

En segundo lugar, se considera la hipótesis alternativa que existe un QTL a lo largo del genoma. Se asume que  $y_i | g_i \sim N(\mu, \sigma^2)$  donde  $y_i$  es el fenotipo y  $g_i$  es el QTL para un individuo  $i$  en un determinado marcador,  $\mu_{AA}$  y  $\mu_{AB}$  son la media de los fenotipos para los dos grupos de genotipos y  $\sigma^2$  es la varianza residual (que se asume que es igual en los dos grupos). Del mismo modo que anteriormente se estima los parámetros mediante un modelo máximo de máxima verosimilitud. El valor de  $\mu_i$  es simplemente la media de los fenotipos dentro de los grupos de genotipos mientras que  $\sigma^2$  es la estimación de la es  $RSS_1/n$  donde  $RSS_1 = \sum_i (y_i - \hat{\mu}_{g_i})^2$  es la suma de residuales al cuadrado bajo la hipótesis alternativa de presencia de QTL. El  $\log_{10}$  de la función máximo verosímil bajo la hipótesis alternativa se reduce a la siguiente expresión:  $-\frac{n}{2} \log_{10} RSS_1$

Finalmente el LOD score es el cociente entre  $\log_{10}$  de la función máximo verosímil bajo la hipótesis alternativa y  $\log_{10}$  de la función máximo verosímil bajo la hipótesis nula, por lo que se obtiene la siguiente expresión:

$$LOD = \frac{n}{2} \log_{10} \left( \frac{RSS_0}{RSS_1} \right)$$

Los individuos con valores perdidos en la matriz de genotipo se deben omitir del cálculo de la hipótesis alternativa y, por lo tanto, del cálculo del LOD score. El LOD score es equivalente al estadístico F del ANOVA. En el caso particular de una población *backcross* si consideramos la existencia de un QTL a lo largo del cromosoma desde el punto de vista estadístico, lo podemos definir como un único factor con solo dos niveles (AA o AB) y podremos aplicar un test *t*-student para cada uno de los marcadores.

La principal ventaja de este método es su simplicidad: sólo tenemos que aplicar un t-test o un ANOVA para cada marcador y, además, podemos incluir covariables en el modelo. De hecho, a veces, en experimentos de cruces experimentales puede resultar interesante tener en cuenta covariables tales como el sexo, la edad o la dieta. Si las covariables introducidas en el análisis tienen un efecto en el fenotipo, su inclusión puede resultar en una reducción de la varianza residual y pueden aumentar la probabilidad de encontrar un QTL.

Toda la estadística correspondiente al análisis de ligamiento fue aplicada usando el paquete R/qtl desarrollado en R [8].

## A.6. Técnicas estadísticas empleadas en el meta-análisis

La ciencia es un proceso acumulativo, por lo tanto, no es sorprendente que varios trabajos describan o tengan por objeto resolver la misma cuestión. Han sido varios los autores se han estudiado cómo sintetizar toda esa información, proponiendo técnicas de ponderación de los estudios a combinar, habiendo cristalizado una metodología acuñada con el término de “meta-análisis” [9-10]. Desde un punto de vista genérico, un meta-análisis se puede describir como una revisión sistemática apoyada por diferentes métodos estadísticos donde el objetivo es combinar toda la información y contrastar las distintas conclusiones obtenidas a partir de diferentes estudios [11].

### A.6.1. Medidas del tamaño del efecto

En un meta-análisis, los resultados relevantes de cada estudio se cuantifican de forma que los valores resultantes se puedan agregar y comparar. Por ejemplo, mediante un meta-análisis se puede expresar los resultados de varios ensayos clínicos aleatorizados examinando la cura parasitológica cuando un tratamiento se compara un tratamiento frente a un grupo control.

En este contexto, el término “tamaño del efecto” se usa generalmente para definir la cuantía del resultado a observar. Por lo tanto, el tamaño del efecto es una familia de índices estadísticos que tienen como objeto cuantificar el grado o magnitud en el que se manifiesta el fenómeno en cuestión en cada estudio empírico. Dependiendo del resultado analizado se pueden usar diferentes tipos de medidas del tamaño del efecto, incluyendo *Odds Ratio*, Riesgo Relativo, Diferencias de Riesgos, coeficientes de correlación, etc.

En la comparación de la eficacia de los tratamientos de esquistosomosis, el resultado final de combinar los diferentes estudios se expresa como *Odds Ratio* (OR) entre la alternativa de tratamiento y el control, incluyendo su respectivo intervalo de confianza al 95 % (95 % C.I.). Respecto a los estudios que evalúan la actividad quimioproliférica de los derivados de la artemisina, se utilizó la tasa de infección en vez de tasa de cura, por lo tanto los datos se presentaron como Riesgo Relativo (RR) en vez de OR, ya que el riesgo relativo es más informativo en términos de estudios de prevención. En todos los casos, la significancia de los valores combinados de OR y el RR fueron calculados usando el test Z para contrastar la hipótesis nula de “no efecto” y se expresó con su correspondiente p-valor.

### A.6.2. Análisis de la heterogeneidad de los estudios a combinar

El análisis de la heterogeneidad entre los estudios se llevó a cabo mediante el test Chi-cuadrado de Cochran (test-Q) y mediante el estadístico  $I^2$ .

El test-Q nos mide la variabilidad observada intra-estudios frente a la variabilidad total o variabilidad inter-estudios.

$$Q = \sum_{i=1}^k W_i (y_i - y_p)^2$$

donde  $W_i$  es el peso de cada uno de los estudios calculado por el inverso de la varianza ( $W_i = 1/S_i^2$ ),  $y_i$  es el tamaño del efecto de cada estudio,  $y_p$  es el efecto combinado o promedio del conjunto de los estudios calculado como:  $y_p = \sum w_i y_i / \sum w_i$ . Es sabido que el estadístico Q sigue una distribución chi-cuadrado con  $k - 1$  grados de libertad, siendo k el numero de estudios. Se consideró la existencia de heterogeneidad si el p-valor  $< 0.05$ .

De forma adicional, se evaluó la heterogeneidad mediante el estadístico  $I^2$  que nos estima cuál es la proporción de la varianza explicada que refleja las diferencias reales en el tamaño del efecto [12]. El parámetro  $I^2$  indica la proporción de la variación entre estudios respecto de la variación total, es decir la proporción de la variación total que es atribuible a la heterogeneidad. Este estadístico se calcula de la forma siguiente:

$$I^2 = \left( \frac{Q - df}{Q} \right) \cdot 100$$

Se consideró que hubo evidencia de heterogeneidad cuando los valores obtenidos de  $I^2$  fueron  $>50\%$ . Dependiendo del resultado de los test de heterogeneidad arriba comentados se decidió el modelo de meta-análisis a utilizar. Así, cuando la heterogeneidad entre los estudios no era significativa, se asumió un modelo por efectos fijos mediante la ponderación por el inverso de la varianza. Por el contrario, cuando se detecta una heterogeneidad significativa entre estudios se procedió a realizar un meta-análisis por efectos aleatorios.

### A.6.3. Modelos de meta-análisis

En esta sección, se describe brevemente las características de un meta-análisis de efectos fijos y de uno de efectos aleatorios. También se realiza una descripción del análisis por subgrupos.

#### Modelo de efectos fijos:

En un modelo de efectos fijos, se asume que todos los estudios incluidos en el meta-análisis comparten un tamaño del efecto común ( $\theta$ ). Por lo tanto, la única variabilidad asumida en los estudios individuales es la debida al error de muestreo, que se cuantifica estimando la varianza observada en cada uno de los estudios  $S_i^2 (y_i)$ , donde  $y_i$  se refiere al i-esimo tamaño del efecto de un conjunto de k tamaños del efecto independientes que están estimando un mismo efecto poblacional ( $\theta$ ), que es el que trata de estimar el meta-análisis. Por lo tanto, el modelo matemático de efectos fijos se formula como:

$$y_i = \theta_i + \varepsilon_i$$

Donde  $y_i$  representa el efecto observado de cada uno de los estudios, ( $\theta$ ) el correspondiente tamaño del efecto poblacional y  $\varepsilon_i$  el error de la muestra que se distribuye según una función normal  $\varepsilon_i \sim N(0, S_i^2)$ .

### Modelo de efectos aleatorios:

La mayoría de los meta-análisis están basados en un conjunto de estudios que no son exactamente idénticos en cuanto a los métodos y características de las muestras incluidas. Esto implica que además de la variabilidad debida al error de muestreo intra-estudio hay que contemplar, frecuentemente, una variabilidad adicional entre-estudios. Una forma de estimar esta variabilidad es tratándola puramente como aleatoria. Esto lleva a que el modelo de efectos aleatorios se formula de la siguiente manera:

$$y_i = \theta + \varepsilon_i$$

Donde  $\theta_i$  es ahora el efecto poblacional del estudio “i”, que ya no es fijo para todos los estudios, y  $\varepsilon_i$  es el error de muestreo de dicho estudio que se distribuye, igual que en el modelo anterior, según una función normal  $\varepsilon_i \sim N(0, S_i^2)$ . A su vez, se asume que  $\theta_i$  se distribuye aleatoriamente respecto a un efecto global  $\mu$ , cuya distribución sigue la función normal  $\delta_i \sim N(0, \tau^2)$ , siendo  $\tau^2$  la varianza inter-estudios que es propiamente la diferencia que incluye el modelo de efectos aleatorios respecto al de efectos fijos. Esta varianza entre los estudios se calculó mediante la aproximación de *DerSimonian and Laird* [13], que viene dada por:

$$\tau^2 = \frac{Q - (k - 1)}{\sum_i^k w_i - \left( \frac{\sum_i^k w_i^2}{\sum_i^k w_i} \right)}$$

Donde los términos que aparecen tienen el mismo significado que los explicados más arriba.

Una vez calculada la varianza  $\tau^2$ , la combinación del efecto combinado o promedio se hace ahora ponderando cada estudio por el inverso de la varianza, que ahora incluye tanto la varianza habitual intra-estudios como la varianza inter-estudios, es decir:

$$w_i^* = \frac{1}{S_i^2 + \tau^2}$$

Calculándose ahora el efecto promedio como  $y_p = \sum w_i^* y_i / \sum w_i^*$ . Se debe de destacar que si  $\tau^2 = 0$ , entonces existe homogeneidad entre los estudios, es decir ( $\theta_1 = \dots = \theta_k \equiv \theta$ ), por lo tanto  $\mu = \theta$  y nos encontraríamos dentro del modelo de efectos fijos.

### Análisis por subgrupos

Cuando se analizaron varias especies de parásitos, se realizó primero un análisis por subgrupos haciendo los cálculos para cada parásito por separado y

luego se calculó un efecto global considerando todas las especies conjuntamente, ya que este efecto global podía tener también interés práctico. En el caso de utilizar el modelo de efectos fijos, se usó el modelo de efectos fijos para cada uno de los subgrupos y también para calcular el efecto promedio global considerando las distintas especies conjuntamente sin tener en cuenta su pertenencia a los subgrupos.

En el caso de optar por un meta-análisis de efectos aleatorios, se calculó un  $\tau^2$  para cada uno de los subgrupos de parásitos por separado y se determinaron sus respectivos valores promedio por subgrupo. Después, se compararon dichos efectos promedios por subgrupo mediante un test-Q, con el fin de determinar si las diferencias entre parásitos eran significativas ( $p < 0.05$ ). Finalmente, se calculó un efecto promedio global mediante un análisis de efectos aleatorios de todos los estudios conjuntamente sin tener en cuenta su pertenencia a los subgrupos.

#### **A.6.4. Análisis del sesgo de publicación**

Para hacer un análisis del sesgo de publicación se realizó una representación denominada gráfico de embudo (funnel plot). En este gráfico se representa el tamaño del efecto frente contra el error estandar, que tiene una forma de “embudo”, y a partir de la simetría de la distribución de los puntos se infiere de forma visual la ausencia o presencia de sesgo de publicación. Así, si hubieran existido estudios con efectos pequeños que no se hayan publicado y por tanto no incluidos en el meta-análisis, la forma del gráfico de embudo será asimétrica y se constataría el llamado “sesgo de publicación”. De forma complementaria, se midió el sesgo de publicación mediante el test de Egger, este test contrasta la hipótesis nula de la ausencia de dicho sesgo [14].

Los análisis estadísticos aplicados en el meta-análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico meta desarrollado en R [15].



## A.7. Bibliografía empleada en el Anexo metodológico

1. Foulkes AS. Applied Statistical Genetics with R. London, 2009.
2. Cárdenas O, P. Galindo, and J.L. Vicente-Villardón. Los métodos Biplot: Evolución y Aplicaciones. Revista Venezolana de Análisis de Coyuntura. 2007;13(1):279-303.
3. Gabriel KR. The biplot graphic display of matrices with application to principal components analysis. Biometrics 1971;58(3):453-467.
4. Galindo P. Una alternativa de representación simultánea: HJ-Biplot. Questílio 1986;10(1):13-23.
5. Amaro, I. R., Vicente-Villardón, J. L. y Galindo-Villardón, M. P., 2003. MANOVA Biplot para arreglos de tratamientos con dos factores basado en modelos Lineales Generales Multivariantes. (Manova-Biplot for two-way arrays based on Multivariate General Linear Models). Interciencia 29, 26-32.
6. A package for Multivariate Analysis using Biplots. [program], 2010.
7. Lander E, Kruglyak L (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet 11(3):241-7.
8. Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. (2003). R/qt1: QTL mapping in experimental crosses. Bioinformatics 19(7):889-90.
9. Shoemaker PJ, Tankard JW, Lasorsa DL (2003). How to Build Social Science Theories. Sage, Thousand Oaks, CA.
10. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR (2009) Introduction to Meta-Analysis. Chichester U.K.: John Wiley and Sons Ltd.
11. Glass GV (1976). "Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research." Educational Researcher, 5(10), 3-8.
12. Higgins JPT, Thompson SG (2002). "Quantifying Heterogeneity in a Meta-Analysis." Statistics in Medicine, 21(11), 1539-1558.
13. DerSimonian R, Laird N (1986). "Meta-Analysis in Clinical Trials." Controlled Clinical Trials, 7(3), 177-188.
14. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C (1997). "Bias in Meta-Analysis Detected by a Simple, Graphical Test." British Medical Journal, 315(7109), 629-634.
15. Schwarzer G (2012) meta: Meta-Analysis with R.