

# Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental

## Comparative study on carbohydrate expression in hepatic egg-granuloma system in human and experimental schistosomiasis

RIALA6/1152

Mariana Tavares GUIMARÃES<sup>1\*</sup>, Mario Ribeiro de MELO-JUNIOR<sup>1,2</sup>, Rodrigo Bacelar da COSTA SILVA<sup>1</sup>, Carmelita Bezerra de Lima CAVALCANTE<sup>1</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro BELTRÃO<sup>1,3</sup>

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Av. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário, CEP 50670-910, Recife, PE/ Brasil.

Fone/Fax: (081) 3271-8484 / 3271-8485 e-mail: mariormj@gmail.com

<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, PE/ Brasil.

<sup>2</sup>Associação Caruaruense de Ensino Superior - ASCES;

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica - CCB/ Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, PE/ Brasil.

Recebido: 19/11/2007 – Aceito para publicação: 17/03/2008

### RESUMO

Em virtude das lesões granulomatosas em animais e humanos aparentemente demonstrarem as mesmas alterações histológicas, poucos dados existem sobre as alterações patobioquímicas relacionadas aos carboidratos expressos pelos tecidos parasitados pelo *S. mansoni*. Neste trabalho, os resultados indicam que todas as lectinas testadas evidenciaram padrões de marcação diferenciados no tegumento do ovo do parasita e no granuloma periovular. A lectina WGA (Wheat germ agglutinin) apresentou uma intensa marcação do sistema ovo-granuloma (SOG) na esquistossomose experimental, enquanto que nas amostras teciduais humanas a WGA, LTA (*Lotus tetragonolobus* agglutinin) e PNA (Peanut agglutinin) marcaram apenas o ovo de *S. mansoni*. A lectina UEA-I (*Ulex europaeus* agglutinin) marcou de forma incipiente e inespecífica o SOG; por outro lado, a LTA marcou preferencialmente os anéis de fibrose do granuloma hepático em humanos. Houve intensa marcação da WGA no SOG e no ovo de *S. mansoni*, enquanto que a PNA marcou apenas o ovo do parasita, o qual indica a presença de resíduos de n-acetil-glucosamina e galactose, respectivamente. As lectinas WGA, PNA e Con A (Concanavalin agglutinin) falharam na distinção de tipos celulares encontrados no granuloma tanto experimental como humano. Conclui-se que a análise histoquímica com o uso de lectinas é uma ferramenta útil na investigação de alterações bioquímicas específicas que caracterizam a esquistossomose humana e experimental.

**Palavras-chave.** lectinas, histoquímica, granuloma, esquistossomose.

### ABSTRACT

Some granulomatous lesions in animals and in humans show the same histological pattern. However, there is no complete information on patho-biochemical alterations related to carbohydrate expression in *Shistosoma mansoni*-infected tissues. In the present study, it was shown that all tested lectins presented distinct staining patterns on both parasite egg-tegument and peri-ovular granuloma. The wheat germ agglutinin (WGA) lectin showed an intense staining on egg-granuloma system (EGS) in the experimental schistosomiasis, whereas the WGA, *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) and peanut agglutinin (PNA) lectins stained only the *S. mansoni* egg in human patients material. The *Ulex europaeus* I agglutinin (UEA-I) showed a weak and nonspecific staining pattern on EGS in both human and experimental models. On the other hand, the LTA lectin only stained the fibrosis ring of human hepatic granuloma. The intense staining pattern on both EGS and *S. mansoni* egg by WGA, and the solely *S. mansoni* egg staining by PNA lectin indicated the presence of n-acetil-glycosamine and galactose moieties, respectively. WGA, PNA, and Concanavalin agglutinin (Con A) failed to discriminate the cells type found in granuloma. In conclusion, lectin using-histochemical analysis is an important tool for investigating the specific biochemical alterations in experimental and human schistosomiasis.

**Key words.** lectin, schistosomiasis, granuloma, histochemistry.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a esquistossomose foi detectada em 19 das 27 unidades federadas e o número estimado de portadores de esquistossomose no país é de 2,5 milhões, com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco, segundo pesquisa da Fundação Nacional de Saúde<sup>1</sup>.

A Esquistossomose é uma doença granulomatosa crônica onde as lesões inflamatórias são imunorreguladas por substâncias secretadas pelos ovos do parasita nos tecidos do hospedeiro induzindo o surgimento das principais manifestações patológicas da doença<sup>2</sup>.

O granuloma é uma reação inflamatória crônica focal caracterizado por uma coleção de células do sistema fagocítico-monocitário com ou sem a adição de outros tipos celulares<sup>3</sup>. As células do sistema fagocítico-monocitário são organizadas e compactadas e células epitelióides predominam uma das formas de granuloma<sup>4</sup>.

O tegumento dos ovos de *Schistosoma mansoni* tem uma estrutura complexa ancorada em um citoesqueleto externo rico em carboidratos com características extremamente dinâmicas permitindo diversas interações entre o parasita e o hospedeiro<sup>5,6</sup>.

Lectinas são glicoproteínas, de origem não-imunológica, que se ligam especificamente a carboidratos reconhecendo carboidratos livres ou conjugados nas superfícies celulares através de sítios específicos de ligação<sup>7</sup>.

Devido ao fato das lectinas geralmente apresentarem alta especificidade para determinados carboidratos, elas são utilizadas como instrumentos de apoio ao diagnóstico microbiológico<sup>8</sup> e no monitoramento dos ciclos de desenvolvimento de parasitas<sup>9</sup>. Evidências a partir da utilização da histoquímica com lectinas indicam a presença de glicoconjugados na membrana superficial do *Schistosoma* nos vários estágios de vida (ovo, esquistossômulo e verme adulto)<sup>10</sup>. Mesmo assim, muitas das mudanças patobioquímicas que ocorrem nas populações celulares de órgãos como o fígado e o intestino durante a infecção por *S. mansoni*, ainda são desconhecidas<sup>11</sup> e pouca atenção tem sido dada à fisiologia do ovo deste parasita enquanto residente nos granulomas hepáticos<sup>12</sup>.

Mudanças qualitativas e quantitativas nos glicoconjugados das membranas celulares tornam-se altamente significativas no desenvolvimento e evolução de muitas doenças<sup>13</sup>, e as lectinas podem ser ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico<sup>14</sup>. As interações lectina-carboidratos tem sido aplicadas no entendimento de muitas parasitoses, desde os estágios iniciais da infecção até o desencadeamento da resposta imune dos hospedeiros. Devido ao fato das lesões granulomatosas em animais e humanos aparentemente demonstrarem o mesmo padrão de alterações, pouco ainda se sabe sobre a ativação do sistema imune a partir de antígenos carboidratados expressos pelo *S. mansoni*.

Desta forma, este estudo visou comparar os padrões de marcação de diferentes lectinas do sistema ovo-granuloma

hepático, durante a esquistossomíase humana e experimental em camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Modelo experimental

Oito camundongos albinos foram expostos a uma cepa local (São Lourenço da Mata) de *S. mansoni* isolada da *Biomphalaria glabrata*. A infecção dos animais foi efetuada através da imersão da cauda (2h), em solução aquosa contendo uma suspensão com 50 cercárias previamente contadas com auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ60). Aos 40 dias após a infecção foram perfundidos e sacrificados, sendo imediatamente removidos os fragmentos de fígado, totalizando 40 seções.

### Modelo Humano

Foram selecionados 10 blocos de parafina dos arquivos do Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) provenientes de pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica, submetidos a biópsia hepática de rotina no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

### Preparação Histológica

Foram selecionados três fragmentos do fígado (0,8x0,8x0,8cm), preservados em solução de formalina a 10% tamponada. Em seguida, foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina a fim de se obter cortes histológicos (4µm) que posteriormente foram corados pela hematoxilina-eosina, sendo examinados em microscópio óptico.

### Histoquímica com Lectinas

Os novos cortes teciduais montados em lâminas histológicas albuminizadas foram tratados com solução de tripsina (0,1%) a 37°C, em seguida expostas a uma solução de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubados a 4°C por 2 horas com lectinas (*Ulex europaeus* agglutinin, UEA-I; *Tetragonolobus purpureae* agglutinin, LTA; Peanut agglutinin, PNA; Wheat Germ agglutinin, WGA; e Concanavalin A, Con A (Sigma-USA) conjugadas a peroxidase e numa concentração final de 100 µg/ml. A reação da peroxidase foi visualizada após incubação em PBS contendo diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina (Sigma-USA) e analisadas através de microscopia óptica. Para controle da marcação, as lectinas foram inibidas utilizando metil-±-D-manose para Con A, D-galactose para PNA, N-acetil-glicosamina para WGA e ±-frutose para UEA-I e LTA (Sigma-USA).

### Análise de Imagem

A análise morfométrica foi executada quantificando-se as intensidades de marcação das lectinas no Sistema Ovo-Granuloma (5 campos aleatórios por lâmina de cada animal) e

ovos de *S. mansoni* (3 campos aleatórios por lâmina) presentes no parênquima hepático, através de um sistema computacional de análise de imagens (softwares TCI-Pro® e OPTIMAS 6.1®). As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se os Testes t de student e de Tukey, com  $p < 0,05$ , através do software PRISMA 3.0®. O controle da marcação com as lectinas inibidas foi utilizado para minimizar as distorções nos valores para presença de células não-marcadas. Utilizamos um Fator de Correção (FC) de acordo com a equação  $FC = a/A$ , onde “a” significa o valor da área relativa e “A” o valor da área total medida<sup>15</sup>.

## RESULTADOS

A lectina Con A (Figura 1) não marcou nenhuma estrutura do sistema ovo-granuloma (SOG) hepático, tanto nos casos humanos como nos experimentais, enquanto a UEA-I (Figura 2) apenas marcou a cutícula do ovo nos casos de esquistossomose humana.

As demais lectinas reconheceram os glicoconjugados no tegumento do ovo e as células que compõem o granuloma. A lectina WGA apresentou o mais intenso padrão de marcação, em comparação com a PNA e LTA (Tabela 1).

A WGA marcou uniforme e intensamente o SOG, mostrando que esta lectina, dentre as testadas, é a melhor para caracterizar o granuloma periovular esquistossomótico em humanos.

A LTA reconhece preferencialmente o anel de fibrose dos granulomas e o parênquima hepático adjacente no modelo experimental. A WGA e PNA indicaram a presença de N-acetilglucosamina e galactose, respectivamente, nos ovos de *S. mansoni* contidos no SOG de camundongos.

A marcação celular distinta das lectinas WGA e PNA nos granulomas de ambos os modelos estudados (humano e

animal), indicam a participação de diferentes tipos de sacarídeos durante o desenvolvimento da esquistossomose e subsequente formação do SOG.

A análise digital comparativa dos padrões de marcação das lectinas (área medida =  $12234 \mu\text{m}^2$ ) indicou um maior número de células marcadas no SOG em camundongos, marcados pela LTA ( $259 \pm 35$ ) e PNA ( $238 \pm 22$ ), quando comparado aos casos humanos marcados pela WGA ( $123 \pm 14$ ).

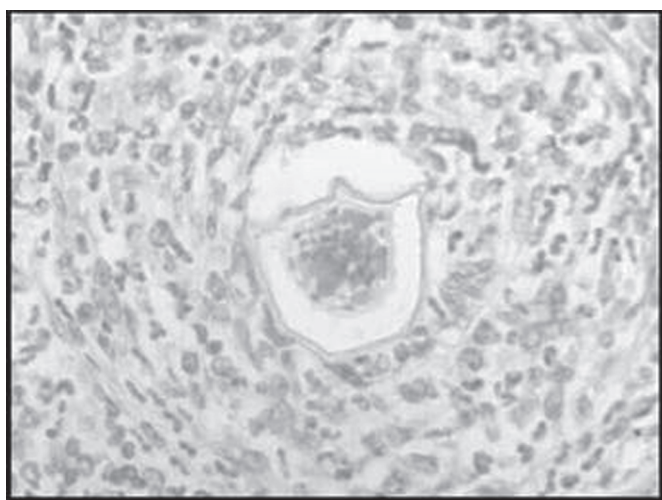
## DISCUSSÃO

A partir da caracterização de carboidratos superficiais de parasitas durante o desenvolvimento da infecção<sup>10,16</sup> e através do mapeamento dos açúcares residuais expostos na superfície dos ovos de *S. mansoni*<sup>10,17</sup>, foram obtidas importantes informações sobre a resposta imune do hospedeiro contra esse tipo de parasita<sup>18</sup>.

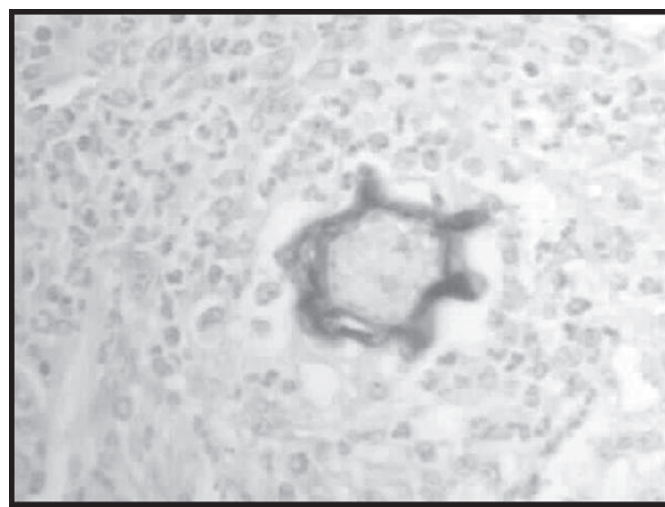
Para este tipo de mapeamento dos carboidratos celulares, diversos trabalhos têm sugerido a utilização de lectinas vegetais como ferramentas de fácil aplicabilidade e de alta sensibilidade nos resultados de estudos em tecidos humanos ou animais experimentais<sup>19,20</sup>.

Todo o sistema ovo-granuloma foi especificamente evidenciado pela marcação das lectinas WGA em humanos e pela LTA nos animais experimentais. Uma possível explicação para o padrão de marcação é que estas lectinas reconheceram glicoconjugados presentes na superfície do ovo<sup>6,9</sup> ou o ovo secretaria glicoproteínas que se difundem e/ou ancoram-se nos tecidos que constituem o granuloma, caracterizando a expressão desses glicoconjugados<sup>12</sup>.

A reação granulomatosa em torno do ovo de *S. mansoni*, controlada em sua formação e regulação por mecanismos imunocelulares, tem sido estudada profundamente não se conhecendo a totalidade dos antígenos e dos mecanismos



**Figura 1.** Sistema Ovo-Granuloma esquistossomótico hepático em humano, demonstrando ausência de reatividade para lectina Con A. (Magnificação, 100x).



**Figura 2.** A lectina UEA-1 exibiu forte marcação apenas no tegumento do ovo de Schistosoma em modelo humano. (Magnificação, 100x).

**Tabela 1.** Reatividade de marcação de lectinas no Sistema Ovo-Granuloma e Ovo-Schistossoma no parênquima hepático em hospedeiro humano e experimental.

LECTINA	MODELO		Experimental	
	Humano SOG <sup>1</sup>	OS <sup>2</sup>	SOG	OS
WGA	+	+	-	+
UEA-I	-	+	-	-
LTA	-	-	+	-
PNA	-	-	-	+
Con A	-	-	-	-

1: Sistema Ovo-Granuloma; 2: Ovo-Schistossoma

envolvidos na indução, formação e regulação da reação granulomatosa<sup>21</sup>.

Evidências experimentais sugerem que os açúcares da superfície das células estão envolvidos no processo de reconhecimento entre parasita e hospedeiro, e esta mudança na ordem dos carboidratos superficiais induz modificações estruturais e funcionais nas células do hospedeiro<sup>5</sup>.

As interações lectina-carboidratos tem sido aplicadas no entendimento de muitas parasitoses, desde os estágios iniciais da infecção até o desencadeamento da resposta imune dos hospedeiros. Devido ao fato das lesões granulomatosas em animais e humanos aparentemente demonstrarem o mesmo padrão de alterações, pouco ainda se sabe sobre a ativação do sistema imune a partir de antígenos carboidratados expressos pelo parasita de *S. mansoni*.

Estudos moleculares e imunohistoquímicos têm investigado o desenvolvimento do ovo de esquistossoma e o papel das suas secreções na iniciação, desenvolvimento e ativação da resposta imune do organismo do hospedeiro<sup>12</sup>. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o papel dos carboidratos expressos durante o desenvolvimento de parasitoses como a esquistossomose<sup>5</sup>.

De modo geral, nas infecções causadas por helmintos, a patogenicidade está diretamente relacionada com a carga parasitária. Em se tratando do *S. mansoni*, a carga parasitária é de importância relativa, uma vez que a patogênese das infecções por este trematódeo está também relacionada com a presença de reações granulomatosas em torno dos ovos do parasita e, portanto, com a capacidade de oviposição dos vermes<sup>21</sup>.

Em indivíduos infectados, a infecção granulomatosa crônica e a fibrose podem causar hepato-esplenomegalia, hipertensão portal e o desenvolvimento de varizes esofageanas, que podem romper e causar hemorragia fatal, a principal causa de morte por esta doença<sup>22,23</sup>.

Especificamente, no que se refere à fibrose, neste trabalho foi evidenciado que a lectina LTA reconhece preferencialmente o anel de fibrose dos granulomas no modelo experimental e não nos casos humanos estudados, o que

demonstra alterações específicas na resolução dos granulomas nesses dois modelos investigados.

Pode-se, então, concluir que a histoquímica com lectinas demonstrou ser uma ferramenta útil na investigação do sistema ovo-granuloma hepático, ajudando a elucidar alterações patobioquímicas específicas na expressão de carboidratos durante a evolução da esquistossomose experimental e humana.

## REFERÊNCIAS

1. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) – Esquistossomose Mansônica [cited 2003 Oct 13]. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/pub/GBDIP/Gbdip024.pdf>
2. Cass CL, Johnson JR, Califf LL, Xu T, Hernandez HJ, Stadecker MJ, Yates JR, Williams DL. Proteomic analysis of Schistosoma mansoni egg secretions. *Mol Biochem Parasitol* 2007; (2)155: 84-93.
3. Baptista AP, Andrade ZA. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(2): 183-5.
4. Amorim FMS. Patomorfologia e estudo estereológico do jejuno, na primoinfecção crônica de camundongos desnutridos, infectados com Schistosoma mansoni. [Dissertação de Mestrado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2000.
5. Abdul-Salam F, Mansour MH. Identification and localization of a schistosome-associated fucosyllactose determinant expressed by Fasciola hepática. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000; 23(2): 99-111.
6. Robijn ML, Koeleman CA, Hokke CH, Deelder AM. Schistosoma mansoni eggs excrete specific free oligosaccharides that are detectable in the urine of the human host. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 151(2): 162-72.
7. Melo-Junior MR, Telles AMS, Albuquerque FEB, Beltrão EIC. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40(2): 123-125.

8. Melo-Junior MR, Araujo-Filho JLS, Patu VJR, Beltrão EIC, Carvalho Jr LB. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(6): 455-60.
9. Jacobson RL, Doyle RJ. Lectin-parasite interactions (Review). *Parasitol Today* 1996; 12(2): 55-61.
10. Astoul CH, Peumans WJ, Van Damme EJ, Rouge P. Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274 (2): 455-60.
11. Muller E, Rosa Brunet L, Fried B, Sherma J. Effects on the neutral lipid contents of the liver, ileum and serum during experimental schistosomiasis. *Int J Parasitol* 2001; 31(3): 285-7.
12. Aston PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA. The schistosome egg: development and secretion. *Parasitology* 2201: 122(Pt3) 329-39.
13. Takano Y, Teranishi Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T. Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion. *Surg Today* 2000; 30(12): 1073-82.
14. Petrossian K, Banner LR, Oppenheimer SB. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta histochem* 2007; 109(6): 491-500.
15. Van Bommel JH, Musen MA. Biostatistical Methods. In: *Handbook of medical informatics*. Springer-Verlag (Ed.) Germany; 1997. p. 387-96.
16. Restrepo BI, Obregón-Henao A, Mesa M, Gil DL, Mesa JS, Vilota GE et al. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *Int J Parasitol* 2000; 30(6): 689-96.
17. Jarroll EL, Macechko TP, Steimle PA, Bulik D, Karr CD, van Keulen H et al. Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *J Eukariot Microbiol* 2001; 48(1): 22-6.
18. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA Jr. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 1999; 163(12): 6712-7.
19. Beltrão EIC, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCBB, Carvalho-Jr LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem* 2003; 47(2): 139-42.
20. Mansour MH, Abdul-Salam F, Al-Shemary T. Distinct binding patterns of fucose-specific lectins from *Biomphalaria alexandrina* and *Lotus tetragonolobus* to murine lymphocyte subsets. *Immunobiology* 2005; 210 (19): 335-48.
21. Yoshioka L, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Linhares AX. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35 (3): 203-7.
22. Cleva R, Saad WA, Herman P. Portal hyperflow in patients with hepatosplenic mansonic schistosomiasis. *Rev Hosp Clin* 2004; 59(1): 10-4.
23. Melo-Júnior MR, Figueiredo JL, Araújo-Filho JLS, Machado MCFP, Brandt CT, Pontes-Filho NT. Portal hypertension in mansonic schistosomiasis: profile of the gastric mucosa. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1): 71-5.