

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



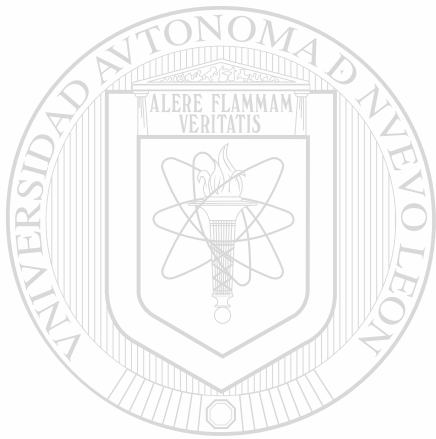
*Echinococcus granulosus*: PARTICIPACION DE  
CITOCINAS EN LA REGULACION DE LA RESPUESTA  
INMUNE EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL

POR

MARIA DEL CARMEN MONDRAGON DE LA PEÑA

Como requisito parcial para obtener el GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Microbiología

ENERO DEL 2003



**Echinococcus granulosus: PARTICIPACION DE  
CITOCINAS EN LA REGULACION DE LA RESPUESTA  
INMUNE EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL**

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

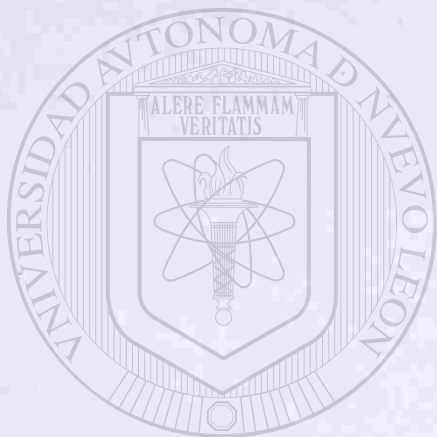
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
RC184  
.T6  
M65  
2003  
c.1

2003



1080124473



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Chino  
LA REG  
PARTICIPACIÓN DE CITOCINAS EN  
DE LA RESPUESTA INMUNE EN HIDATIDOSIS  
EXPERIMENTAL

Por  
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
MARÍA DEL CARMEN MONDRAGÓN DE LA PEÑA

®

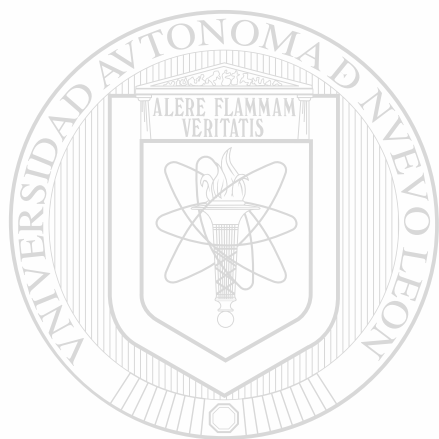
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito parcial para obtener el GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Enero del 2003



TD  
RC184  
.T6  
M65  
2003



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



***Echinococcus granulosus*: PARTICIPACIÓN DE CITOCINAS EN  
LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN HIDATIDOSIS  
EXPERIMENTAL**

**Aprobación de Tesis:**



A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Rodríguez Padilla".

---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
**Directora de Tesis**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rafael Herrera Esparza".

---

**Dr. Rafael Herrera Esparza**  
**Co-Director de Tesis**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "María Julia Verde Star".

---

**Dra. María Julia Verde Star**  
**Subdirectora de Investigación y Postgrado**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



***Echinococcus granulosus*: PARTICIPACIÓN DE CITOCINAS EN  
LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN HIDATIDOSIS  
EXPERIMENTAL**

Presenta

M en C. María del Carmen Mondragón de la Peña

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
COMITÉ DE TESIS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA  
Directora

DR. RAFAEL HERRERA ESPARZA  
Secretario (Co-Director)

DR. REYES S. TAMEZ GUERRA  
Co - Director

DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZÁLEZ  
Vocal

DR. EDGAR MENDOZA GAMBOA  
Vocal



**COMITÉ DOCTORAL**

**LOS SUSCRITOS INTEGRANTES DEL COMITÉ DOCTORAL, COMUNICAMOS QUE DESPUÉS DE HABER ANALIZADO Y REVISADO LA TESIS DOCTORAL DE LA M.C. MA. DEL CARMEN MONDRAGÓN DE LA PEÑA , Y TOMANDO EN CUENTA LA OPINIÓN DEL COMITÉ DE TESIS RESPECTIVO, DECIDIMOS:**

**DAMOS FE**

**DR. LUIS J. GALÁN WONG** \_\_\_\_\_

**DRA. ADRIANA E. FLORES SUÁREZ** \_\_\_\_\_

**DR. JUAN MANUEL ALCOCER GZZ.** \_\_\_\_\_

**DR. CARLOS E. HERNÁNDEZ LUNA** \_\_\_\_\_

**DR. ROBERTO MENDOZA ALFARO** \_\_\_\_\_

**DR. JESÚS ANGEL DE LEÓN GONZÁLEZ** \_\_\_\_\_

**DR. RAHIM FOROUGBAKHCH P.** \_\_\_\_\_

**CD. UNIVERSITARIA, 11 DE DICIEMBRE DEL 2002.**

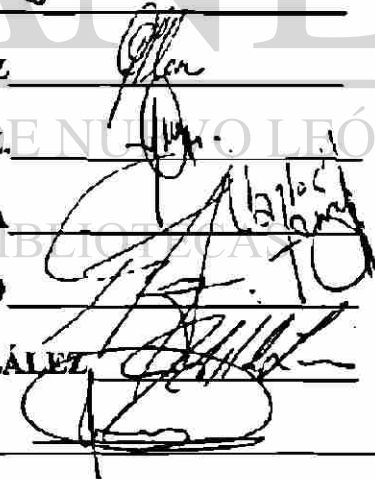
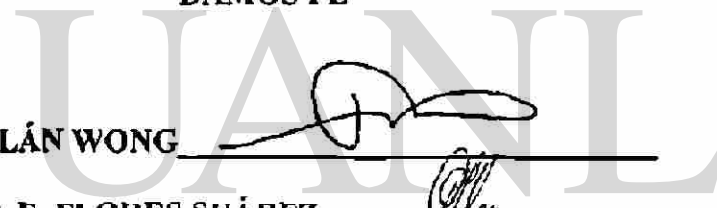
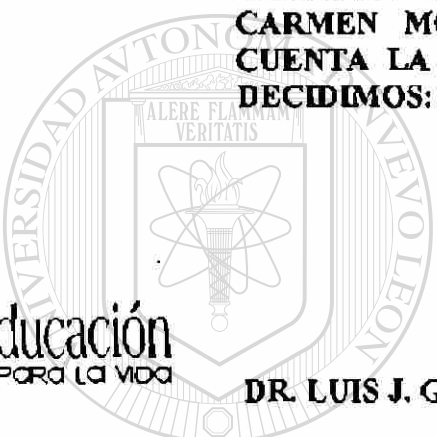
A.P. F-16

Ciudad Universitaria C.P. 66450

San Nicolás de los Garza,

Nuevo León, México

☎ y Fax: 8352 4245





## **ESTA INVESTIGACIÓN FUE APOYADA:**

**POR LA DIRECCIÓN DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y POR EL PROGRAMA UANL-PAICyT CLAVE CN-320-00 DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.**

**POR CONACyT Y PROMEP. SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA.**

**POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

**POR EL PROYECTO DE CONACyT N° 1877, DEL DR. RAFAEL HERRERA ESPARZA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS.**

## **EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN:**

**El Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**



# UANL

**Departamento de Ecología e Inmunobiología de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.**



## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Departamento de Biología Molecular del Centro del Centro de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.**

# DEDICATORIAS

## PATRICIO

**Solo tu conoces mi alma, mis sentimientos y mis  
anhelos.**

**Gracias por existir y por ser mi maestro.**



## VIOLETA, MARINA Y ANASOL

**Son el motor de mis días y mi existencia, por ustedes mi  
vida y todo lo que soy.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**DAVID PATRICIO (Paf)**

**Eres un rayo de luz, que Dios hizo que estuvieras con nosotros.**

## EDUARDO

**Gracias por estar en nuestras vidas.**

# **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

## **DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA**

**Cristy, gracias por creer en mí, por tu paciencia a pesar de todas tus responsabilidades, siempre estarás en mi vida como mi amiga y como ejemplo de entereza, valentía y audacia.**



**DR. RAFAEL HERRERA ESPARZA**

**Rafael, siempre has sido mi amigo y mi maestro, gracias por tus enseñanzas, conocimientos, consejos y tolerancia, que nuestra amistad dure siempre.**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

## **DR. REYES S. TAMEZ GUERRA**

**Gracias por darme la oportunidad de conocer la trayectoria de un gran hombre y por demostrar que la excelencia no se esconde.**



## AGRADECIMIENTOS

**GRACIAS** a toda mi familia por su ayuda en los momentos difíciles, por su comprensión, por su cariño y por estar conmigo siempre que los necesité.

**A LA DOCTORA PATRICIA TATO.** Paty, gracias por creer en mi línea de investigación y haberme inducido hacia un campo molecular tan rico. Gracias por ser mi amiga.

**MARISA,** gracias por tu amistad, por creer en nuestros proyectos y por estar siempre con nosotros y dispuesta a ayudarnos.

**SANDRA,** gracias por ayudarme incondicionalmente, ojalá te realices en la vida como siempre lo has deseado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**MARISOL,** gracias por creer en la hidatidosis y seguir con esta aventura.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**GRACIAS** a las autoridades, personal académico y administrativo de la Universidad Autónoma de Zacatecas, que en su momento me han apoyado para realizar mi superación, dándome las facilidades en todo momento.

**GRACIAS** a las autoridades, personal académico y administrativo de la de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que me han apoyado para lograr mi Doctorado, en especial le agradezco a Nancy Gutiérrez Puente, su ayuda incondicional siempre que se lo solicité.

# CONTENIDO

IMPORTANCIA	1-2
INTRODUCCIÓN	3-6
ANTECEDENTES	7-19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y METODOS	21-26
Animales	21
Quistes Hidatídicos	21
<i>Echinococcus granulosus</i> (protoescolices)	21
Modelo animal	21-22
Antígeno Hidatídico (AgLH)	22
SDS-PAGE, Electrotransferencia ( <i>Western blotting</i> )	22
ELISA	23
Extracción de ARN de Hígado de ratones hidatídicos y ratones normales.	23
Medición de ARN por Análisis de Densidad Óptica.	23
Reverso Transcriptasa/Reacción en Cadena de la Polimerasa RT-PCR.	24
Oligonucleótidos	25
Hibridación in situ (FISH).	25-26
RESULTADOS	27-40
DISCUSIÓN	41-50
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52-68

# RESUMEN

La enfermedad hidatídica es causada por el metacéstodo de *Echinococcus granulosus*. Se han probado diferentes modelos experimentales para entender la enfermedad hidatídica. En este estudio se utilizaron ratones BALB/c, para evaluar la respuesta inmune humoral y la respuesta celular hepática. La enfermedad hidatídica evaluó que epítopes de *E. granulosus* manejan la respuesta inmune humoral en infecciones experimentales. Los ratones BALB/c fueron infectados intraperitonealmente con protoescolices (PSC) de *E. granulosus*. Muestras de suero fueron tomadas a las 0, 4, 8, 12 y 16 semanas y probados por *Western blot* y ELISA. La IgA reaccionó exclusivamente contra epítopes de 61 kDa o epítope A, esta proteína fue reconocida por todos los animales infectados. Los sueros controles fueron negativos. Los quistes hidatídicos aparecieron en el hígado 8 semanas después de la inoculación. Se extrajo RNA de secciones hepáticas, las cuales fueron utilizadas para amplificación con RT-PCR con primers de IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$  y G3PDH. La expresión de citocinas *in situ* fue probada con FISH. Los quistes del parásito completos en la superficie del hígado fueron observados a las 16 semanas después de la infección; los controles fueron negativos. La expresión de IL-6 y TNF $\alpha$ , fue normal y manteniéndose hasta declinar progresivamente 8 semanas después de la infección; en algunos animales tal expresión decayó hasta desaparecer a las 16 semanas después de la infección. Por otro lado IL-10 y TGF $\beta$ , fueron incrementando progresivamente. Los controles expresaron normalmente las citocinas. Los resultados de este estudio sugieren que *E. granulosus* induce una inmunosupresión local, probablemente mediada por IL-10 y TGF $\beta$ ; además se vio que es posible que tal mecanismo pueda estar involucrado en la evasión del parásito de la respuesta celular mediada por el huésped. La respuesta inmune primaria ocurre en la cuarta semana de infección y el switch a IgG e IgA ocurre hacia la octava semana. Se observó que la IgA, puede ser un marcador específico de la infección activa en la hidatidosis experimental. Son diversos los mecanismos que pueden mediar el escape del parásito como el que controla la respuesta de los genes de citocinas, los que son probablemente inhibidos por productos del parásito.

# SUMMARY

Hydatid disease is caused by the metacestode of *Echinococcus granulosus*. Different experimental models have been used to understand hydatid disease. In current studies BALB/c mice were used to evaluate the humoral immune and hepatic cellular response. The hydatid disease evaluate what epitops of *Echinococcus granulosus* drives the humoral immune response in experimental infections. BALB/c mice were intraperitoneally infected with protoscoleces of *E. granulosus*. Serum samples were taken at 0, 4, 8, 12 and 16 weeks and evaluated by *Western blot* and ELISA. The IgA reacted exclusively against 61 kDa or A epitop, this protein was recognized by all infected animals. Control sera was negative. The hydatid cysts appeared on the liver eight weeks after inoculation. The RNA extracted from hepatic sections was used for RT-PCR amplification with primers for IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ , and G3PDH. *In situ* cytokine expression was assessed by FISH. Complete parasite cysts on the liver surface were observed 16 weeks after infection; controls were negative. The expression of IL-6 and TNF $\alpha$  was normal at baseline and declined progressively eight weeks after infection; in some animals such expression was abrogated 16 weeks after infection. On the other hand IL-10 and TGF $\beta$  were increased progressively. Controls expressed the cytokines normally. Present results suggest that *E. granulosus* induces a local immunosupression probably mediated by IL-10 and TGF $\beta$ ; therefore it seems possible that such a mechanism would assist the parasite in escaping the harmful host cell-mediated response. The primary immune response, the IgG and IgA switch have been shown by the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week of infection, respectively. The IgA response might be an specific maker for the active infection in the experimental hydatidosis. The parasitic evasion mechanisms could modulate the cytokines gene expression, inhibited by parasit's metabolic products.



# IMPORTANCIA

La hidatidosis es una parasitosis de importancia mundial dentro de la salud pública humana y animal, es un problema en países con gran actividad en la explotación y utilización de diferentes especies de animales domésticos y económicamente representa pérdidas cuantiosas en países endémicos. Afecta además al hombre, en el cual puede llegar a ser mortal. En México esta enfermedad no obstante que ya ha sido reportada, no se le ha dado la importancia que tiene y por lo tanto no cuenta con estudios epidemiológicos formales. La presencia de esta parasitosis se ha reportado en diversas ocasiones en congresos nacionales, internacionales y publicaciones locales y nacionales. Además se han reportado casos en humanos aunque en muy poca frecuencia, sin embargo se había ya hecho una recomendación a las autoridades sanitarias sobre brotes que podían aparecer en humanos, al haber una introducción de ganado ovino en pie, procedente del Continente Australiano y pudiendo ser esta la forma más directa de importar la cepa ovina de *Echinococcus granulosus* que es altamente patógena para el humano, en comparación de la cepa porcina existente en nuestro país que es de baja infectividad para el hombre.

No se tienen métodos cotidianos de detección de la parasitosis, ya que los médicos generalmente están desinformados sobre esta enfermedad confundiéndola con otro tipo de padecimiento y con tratamientos inadecuados que a la larga son más perjudiciales para el paciente. Hemos comenzado a trabajar con métodos estandarizados de producción de antígenos y aplicándose la técnica de ELISA Y WB, con buenos resultados de diagnóstico. Esto nos alienta a seguir investigando sobre esta interesante parasitosis que comienza a aparecer en humanos en nuestro país.

Uno de los principales problemas con las parasitosis, es la evasión de la respuesta inmune por el parásito a las defensas generadas por el huésped, y la enfermedad hidatídica no es la excepción, ya que es una parasitosis crónica y difícil de tratar, y como ya se menciono pudiendo llegar a ser mortal.

La importancia de estudiar moléculas del metacésto de *Echinococcus granulosus* que pudieran estar regulando la respuesta inmune del huésped ayuda a conocer los factores que intervienen en la relación existente entre el parásito y el huésped y comprender los factores que intervienen en la permanencia crónica del parásito en el organismo, para esto utilizamos un modelo experimental conocido que es el ratón BALB/c, ampliamente utilizado en algunos estudios inmunológicos. Por lo tanto nuestra justificación se apoya en que:

Hasta ahora la información disponible para el entendimiento de la evasión de la respuesta inmune del huésped por el parásito es escasa o no existe; se desconocen muchos aspectos sobre la relación huésped-parásito en hidatidosis, como la regulación de citocinas y los epítopes principales, que despiertan la respuesta mediada por citocinas regulatorias. Es necesario conocer el papel que juegan algunas citocinas en la fisiopatología de la enfermedad ya que su conocimiento daría nuevas expectativas para estrategias terapéuticas en hidatidosis.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# INTRODUCCIÓN

La equinococosis, la enfermedad hidatídica, y la hidatidosis son términos utilizados para referirse a la parasitosis causada por el adulto y el estado larvario (metacéstodo) del género *Echinococcus* (Familia Taeniidae) respectivamente. El término hidatidosis o enfermedad hidatídica se restringe a la infección con el metacéstodo o larva, mientras equinococosis es aplicada para la parasitosis con los gusanos adultos. En el primer caso, el huésped es intermediario y en el segundo definitivo. Existen cuatro especies reconocidas dentro del género de *Echinococcus*, Rudolphi, 1801 (Grove DJ, 1991): *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*, las cuales son céstodos ciclofilídeos pertenecientes a la familia *Taeniidae*, con una amplia distribución en el mundo. La infección depende de condiciones sanitarias en los rastros o mataderos. La enfermedad en animales, produce bajas económicas por la destrucción de órganos infectados que afectan al ganado (Torgerson P; R; & Dowling P:M: . 2001; Shamesh M.A. et al, 1999; Carmona C. Et al, 1999). En México *E granulosus* afecta a la especie porcina principalmente. La hidatidosis porcina era desconocida como problema de salud animal en Zacatecas y en México, actualmente esta enfermedad se reconoce como un problema de salud animal y eventualmente se ha encontrado en humanos (Tavizón GJP, et al, 1981). Mondragón-de la Peña, MC. et al. 1991, 1993, 1995, Martínez CF, et al, 1994). Así mismo se han observado particularidades en el ciclo del parásito relacionadas con las condiciones ambientales, se conoce la cepa porcina como la causante de la Hidatidosis en el Estado de Zacatecas y no la ovina como es reportada en otros países (Eckert J. et al. 1989,1993, Thompson et al. 1995). Las principales especies involucradas en la patogenia del humano son las dos primeras, producen respectivamente hidatidosis unilocular e hidatidosis multilocular. La hidatidosis unilocular es una enfermedad zoonótica causada por el metacéstodo de *E. granulosus*.

Existen reportes aislados desde 1880, en una amplia revisión citándose pocos casos en humanos, en cirugías o autopsias pero son poco conocidos por no ser

publicados y sólo notificados por comunicación verbal (Flores-Barroeta L, 1955). Actualmente esta enfermedad se ha manifestado como un problema de salud pública y animal en nuestro Estado, así mismo se han observado particularidades como variantes biológicas y bioquímicas relacionadas con las condiciones ambientales y la permanencia en diferentes huéspedes, en el ciclo del parásito, conociéndose la cepa o raza porcina como la principal causante de la Hidatidosis en el Estado de Zacatecas (Mondragón-de la Peña, MC. *et al*, 1991, 1993. Tavizón GJP *et al*, 1981, Martínez MJJ. *et al*, 1994), y no la ovina como es reportada en otros países de Sudamérica (Eckert J. *et al*. 1993).

El poco conocimiento de esta enfermedad cíclica ha hecho que no se tenga el cuidado suficiente en los rastros municipales y menos en mataderos clandestinos, para poder controlar tanto la equinocosis en los cánidos, como la hidatidosis en el cerdo y su posible riesgo de infección para el hombre, ya que en el medio rural zacatecano, las vísceras parasitadas de los cerdos que se sacrifican se les dan como alimento a los perros o se entierran, o se desechan en los basureros a cielo abierto (el arroyo), donde son consumidas por perros u otros cánidos que funcionan como huéspedes definitivos del parásito. De esta manera, el ciclo se convierte en silvestre, y la infección se propaga indefinidamente (Thompson *et al*. 1983, 1985, 1988, 1995). La tenia adulta sólo se desarrolla en el intestino delgado (yeyuno e ileon) del huésped definitivo, cánidos como el perro doméstico (*Canis familiaris*), la zorra roja (*Vulpes vulpes*) y el dingo (*Canis familiaris dingo*), (Thompson RCA, *et al*, 1985, Eckert J. *et al*. 1989), mientras que las larvas o protoescólicas (PSC) se asientan en mamíferos y herbívoros, estos últimos probablemente se infecten mediante la ingestión de huevos que se encuentran en pasturas contaminadas. Entre los huéspedes intermediarios se encuentran el hombre, el cerdo, la oveja, el caballo, la vaca, el camello, el canguro, el alce (Thompson RCA, *et al*, 1984, 1985, 1988, 1995; Baldock FC, *et al*. 1985; Eckert J, *et al*; 1989; Hobbs RP, *et al*. 1990) y en éstos casi en todos los órganos: cerebro, médula ósea, riñones, vesículas seminales, corazón y pericardio, vías biliares, glándulas maxilares y principalmente en hígado y pulmones (Farmer MP, *et al*. 1990, Frydman CP, *et al*. 1989. Ming-Gian X, 1985, Sierra J, *et al*.



1985, Cesbron JY, *et al.* 1986, Abid-A, *et al.* 1991, Majul EJ, 1991), la implantación del parásito en un órgano blanco varía según el huésped, produciendo quistes hidatídicos o hidátides.

Para poder comprender la relación huésped parásito y los eventos que suceden a la infección por hidatidosis, se han desarrollado varios modelos experimentales de cultivos celulares hasta animales por ejemplo borregos, cuyas, ratas y ratones (Allan D. *Et al.* 1981. Baldock F. C. *et al.* 1985. Bout D. *et al.* 1974); en algunos se ha demostrado la capacidad de algunos parásitos para evadir la respuesta inmune celular y humoral (Lancer M. 1997). El desarrollo de *E. granulosus* en los tejidos del huésped puede inducir tolerancia inmunológica específica a ciertos antígenos o inmunosupresión no específica (Annen *et al.* 1981), lo cual lleva al parásito a una larga sobrevivencia en el órgano blanco, por lo tanto ésta es una de las formas como este agente infeccioso evade la respuesta inmune del huésped.

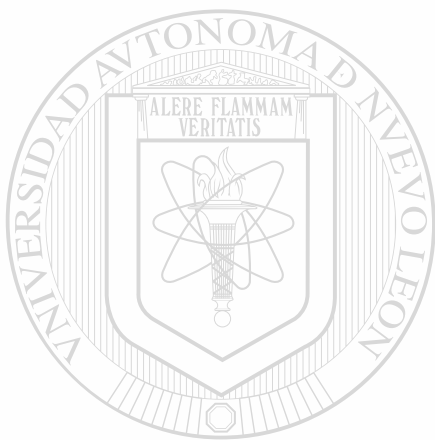
Se ha demostrado que el género de *Echinococcus* posee diferentes antígenos (Kagan I. G. *et al.* 1968.). Algunos de ellos son timo-independientes (Cox D. A. *et al.* 1989.). Respecto a la respuesta inmune celular, el parásito es capaz de desplegar una respuesta granulomatosa en diferentes órganos como hígado, pulmones y otros órganos. (Allan D. *et al.* 1981, Jenkins P. *et al.* 1986 ).

Los antígenos de *E. granulosus*, al entrar en contacto con los tejidos del huésped, inducen una respuesta inmune, pero el contacto crónico induce tolerancia inmunológica específica o inmunosupresión no específica (Annen *et al.* 1981), lo cual lleva al parásito a una larga sobrevivencia en el órgano blanco, por tanto ésta es una de las formas de evadir la respuesta inmune del huésped.

Se ha demostrado que el modelo murino es excelente para reproducir la hidatidosis en forma similar a la hidatidosis hepática de otros mamíferos y que el implante del quiste desencadena una respuesta inflamatoria mediada principalmente

por células mononucleares y macrófagos (Ganguly NK, *et al.* 1986. Dempster RP, *et al.* 1991. Playford MC, *et al.* 1992. Mondragón-de-la P, 1995).

La inmunosupresión y la estimulación policlonal parecen estar mediadas por sustancias de secreción y excreción del parásito y modulan la expresión de citocinas o moléculas moduladoras de las citocinas, que inducen la situación la permanencia crónica del parásito ( Kizaki T *et al.* 1991, Finkelman FD, *et al.* 1992, Kobulej T *et al.* 1992, Heinzl FP, 1989, Tato P *et al.*, 1995, 1996. Torcal J *et al.* 1996).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# ANTECEDENTES

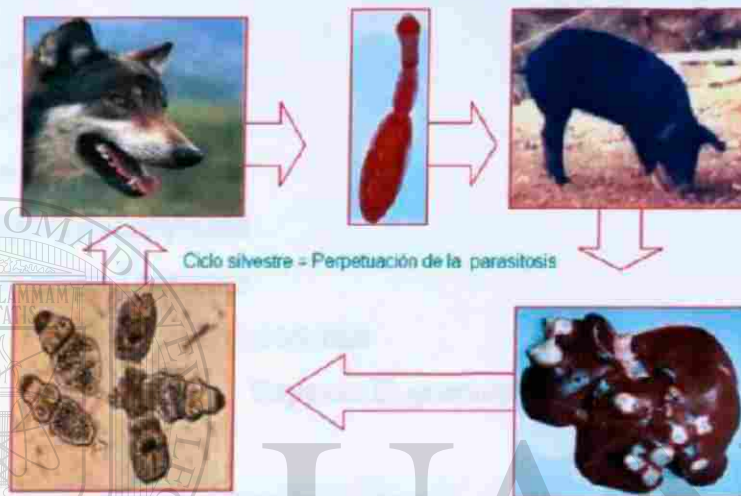
La hidatidosis es una zoonosis cosmopolita, ampliamente distribuida en el mundo y representa un problema médico y veterinario de relevancia en áreas endémicas por ejemplo en Europa, muchos casos de quistes hidatídicos en humanos, provienen de regiones donde la enfermedad es endémica y de las costas del Mediterráneo. Entre 1987 y 1991 la incidencia se incrementó de 30 a 45 nuevos casos por año. En España en 1990 la prevalencia de casos hospitalizados por 100000 habitantes varió de  $< 0.01$  a  $> 11$  casos en varios distritos. En Portugal entre 1983 y 1985, 37 a 45 nuevos casos fueron reportados cada año, (Eckert J y Thompson RCA, 1988; Van Knapen F, et al. 1982,1987.; Kortbeek LM, et al, 1993; Navarrete I, et al, 1991; Rombert C, and Trinca T, 1991). En China, datos colectados en 1985, señalan que en 21 provincias que representando cerca del 87% del territorio se a reportado la existencia de *E. Granulosus*, (Craig PS, et al, 1991). En África, la calidad y cantidad de datos disponibles sobre los ciclos de vida de *E. Granulosus*, las tasas de prevalencia y la importancia en la salud pública de la enfermedad por quistes hidatídicos varía grandemente entre los diferentes países siendo altamente endémica entre grupos nómadas, se considera que esta alta prevalencia se debe a los ciclos silvestres, a la diversidad de hospedadores y a la diversidad genética entre las especies de *E. granulosus*. (Macpherson CNL, 1986; Thompson R.C.A. and Lymbery J, 1995). En Nueva Zelanda y Australia, *E. granulosus* se introdujo con ancestros de los dingos, de Asia, tuvieron una segunda introducción ocurrida con la llegada de colonos y sus animales domésticos, y a la introducción de borregos merinos importados del norte y sur de África. El índice de infección en humanos en las áreas rurales de Nueva Zelanda fue alta (11.8 por 100,000 habitantes (Kumaratilake LM and Thompson RCA, 1982, 1984; Gemmell MA.1990, Gemmell MA, 1990). La hidatidosis ha surgido como enfermedad emergente en Kazakhstan donde su incidencia, se ha incrementado de 1.4 casos/100,000 en 1991 a 5.9 casos/100,000 en el año 2000. Esta situación sugiere que el incremento en el diagnóstico de echinococcosis es paralelo a un aumento en la transmisión entre la población humana (Shaikenov BS, et al. 1999, Torgerson PR., et al 2002). Es una parasitosis difícil de controlar debido a las

parasitosis difícil de controlar debido a las características de su ciclo, sobre todo su fase silvestre. Es dependiente de factores relacionados con la cultura y el pastoreo, en regiones de Palestina la enfermedad en algunas regiones se ha encontrado una incidencia de 16.8 por 100,000 habitantes, es adquirida en los primeros años de vida y su prevalencia es mas alta en mujeres que en hombres, el ambiente y el estilo de vida favorecen la dispersión de la enfermedad. (Matosian RM *et al.* 1977, Thompson. RCA, *et al.* 1988, Carmona C *et al.* 1999, Abu-Hasan N., *et al.* 2002), además representa una pérdida económica en algunos países, por ejemplo, en Jordania se han reportado pérdidas hasta de \$4.4 dólares americanos por borrego infectado, estudios mas recientes indican que el rango de perdidas económicas anuales, de carne de borregos y cabras, por infección de equinococosis quística, en Jordania con una confianza del 95% (utilizando la técnica estadística de Monte Carlo) y una pérdida con una media de \$ 3'874 070 de dólares por año. (Abo-A *et al.* 1991, Torgerson P.R., *et al.* 2001). La cepa con su ciclo vital cerdo-perro se ha reportado en Polonia, donde se postula que puede ser diferente ya que sus características morfológicas y genéticas difieren de otras, lo cual tiene significancia epidemiológica, incluso presenta una tasa rápida de desarrollo en perros y una aparente baja infectividad a humanos (Eckert J, *et al.* 1993).

En Norteamérica, principalmente se presentan dos cepas de *E. granulosus* las de borrego y las cepas de cérvidos, esta última involucra como huésped definitivo al lobo, en algunos estados de USA es el coyote (Rausch RL, 1986). La cepa de borrego/perro ocurre esporádicamente, hay zonas estrictamente limitadas como Utah, Arizona, Nuevo México, California y otros estados del este. En California, el 4.8% de casi 23,000 borregos sacrificados en rastros a mediados de los 60<sup>as</sup> estaban infectados (Sawyer JC, *et al.* 1969). Poblaciones de humanos expuestos a infección en estos estados son relativamente pocos; sin embargo las transmisiones en poblaciones endémicas de nativos americanos en Arizona y Nuevo México, la incidencia anual de diagnóstico es de 2 a 11 por 100,000 habitantes, (Schantz; PM, 1977; Crellin JR, *et al.* 1982). Casos humanos asociados con focos endémicos, involucrando *E. granulosus* en el ciclo cerdo/perro en la región del Mississippi, son aún diagnosticados raramente (Daly JJ, *et al.* 1984). En el Estado de Zacatecas la hidatidosis es producida por una cepa en la que

se completa el ciclo entre el perro y el cerdo (Figura 1). Representa un problema en la población porcina, ya que el 7.86% de éstos animales sacrificados en los rastros están infectados con el parásito (Mondragón-de-la-P y Tavizón GP. 1991).

### CICLO VITAL DE *Echinococcus granulosus*



**Figura 1).** Ciclo vital de la cepa perro-cerdo de *Echinococcus granulosus*, huésped definitivo esta el perro y otros cánidos alojando el parásito adulto. Al defecar los huevos del parásito son ingeridos por el huésped intermediario en este caso el cerdo en el que se desarrollan los quistes hidatídicos conteniendo la arenilla hidatídica<sup>®</sup> compuesta por protoescolices (PSC) en los órganos blanco, en este caso el hígado.

En América del Sur el ciclo mas propagado es por el borrego-perro, la Pampa Argentina ofrece condiciones favorables para el desarrollo del parásito, muestra una presencia endémica de casos humanos y perros infectados, encontrándose una tasa de incidencia anual de 6.8 por 100, 000 habitantes. En Uruguay el análisis de costo beneficio por la echinococosis se ha evaluado, datos de pérdidas económicas por la incidencia de la enfermedad en humanos y rastros, señalaron un costo estimado mínimo de U.S \$ 22.1 millones por año. (Neghme A y Silva RA, 1970; Schantz PM, 1972; Perdomo R., et al.1988. Lamberti R., et al, 1999. Carmona C., et al. 1999. Larrieu E. et al. 2000. Torgerson P.R. et al 2000).



*Echinococcus granulosus* es un cestodo ciclofilideo que se clasifica como sigue: (Faust EC, et al 1975. Thompson RCA y Kumaratilake LM, 1985. Kumaratilake LM, et al 1986. Thompson RCA and Lymbery AJ, 1988. Eckert J, et al. 1989, 1993. Zhang L, et al. 1998)

Phylum Platyhelminthes

Clase Cestoidea

Subclase Eucestoda

Orden Cyclophyllidea

Familia Taeniidae

Género *Echinococcus*

Especie *E. granulosus*

El adulto de *E. granulosus* parasita a perros y otros cánidos que actúan como huéspedes definitivos. Diversos mamíferos pueden funcionar como huéspedes intermediarios, infectándose por medio del agua y por contacto directo; sin embargo, los herbívoros probablemente lo hacen mediante la ingestión de huevos que encuentran en pasturas contaminadas.

Los cerdos, por la manera de crianza en "libre pastoreo urbano", se infectan por comer directamente materia fecal de perros parasitados. El parásito adulto se encuentra fijo fuertemente a la mucosa del intestino delgado del huésped, es un gusano plano que tiene una longitud de 2 a 7 mm, tiene de tres a cuatro proglótidos en la cadena estrobilar, el último, más ancho y largo, contiene el útero grávido, el escólex lleva cuatro ventosas y tiene un rostelo no retráctil con dos coronas de ganchos que pueden ser de 30 a 40, los cuales, por su forma o tamaño, sirven para diagnóstico (figura 2)



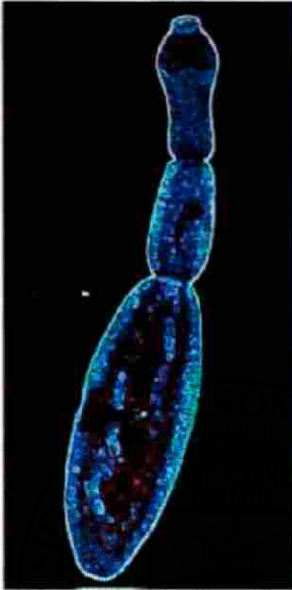


Figura 2). Tenia de *Echinococcus granulosus*.

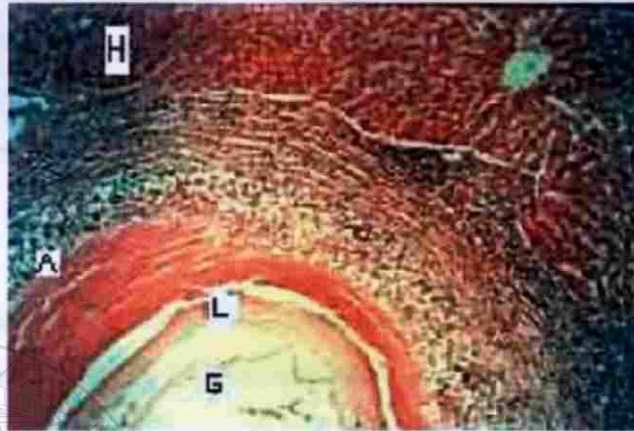
La madurez sexual se alcanza entre 3 y 4 semanas, la producción de huevos comienza a los 28 días después de la ingestión de PSC, esto dependerá de la cepa del parásito, el tiempo de maduración y la permanencia de la parasitación. Si no hay reinfección, los parásitos permanecen de 5 a 6 meses. Los huevos de *E. granulosus* miden 30 a 38  $\mu\text{m}$  y son eliminados con la materia fecal de los cánidos, no se pueden diferenciar de los huevos de *Taenia solium* y *T. saginata*. Contienen oncósferas completamente diferenciadas, una vez ingeridos por el huésped intermediario, los procesos digestivos de éste provocan la liberación del embrión hexacanto u oncósfera, atraviesa el intestino por medio de movimientos de los ganchos del rostelo y proteasas, penetra los vasos mesentéricos y la oncósfera es pasivamente transportada hacia el hígado puede llegar al corazón derecho y de ahí a pulmones, donde se puede quedar o continuar hacia el corazón izquierdo; se implanta casi en cualquier órgano (Faust *et al.* 1975. Cheng, 1978. Thompson y Lymbery, 1995). La oncósfera en el órgano blanco se comienza a desarrollar y como medio de evasión a la respuesta inmune del huésped se forman los quistes hidatídicos (Riley *et al.* 1984, 1985). (Figura 3).



**Figura 3).** Hígado de cerdo con quistes hidatídicos

El tiempo de madurez de un quiste hidatídico depende de la cepa del parásito adulto y de la especie del huésped intermediario y puede ser de meses a años, es típicamente unilocular. El huésped, en respuesta a la implantación del parásito, comienza a desarrollar una membrana adventicia de estructura fibrosa con células inmunocompetentes, la zona de tejido que está en contacto con el parásito se comienza a atrofiar por la presión ejercida por éste al comenzar a desarrollarse. El parásito sintetiza dos capas, la externa o laminar, acelular compuesta de mucopolisacáridos, que ultra-estructuralmente (Figura 6) consiste de microvellosidades con funciones de conducción y absorción de sustancias nutritivas, ya que está en contacto con los tejidos del huésped (Dempster RP, *et al*, 1991) es lechosa y opaca, permeable para ciertas sustancias del exterior hacia el interior del quiste, mide 1 mm aproximadamente de grosor, el cual puede variar incluyendo su resistencia según la madurez del quiste, la otra capa es la germinativa o prolífera, granulosa y nucleada que mide alrededor de 25  $\mu$ , da lugar a la formación de vesículas que se proyectan hacia la cavidad del quiste y son visibles a simple vista, miden de 258 a 300  $\mu$  de diámetro aproximadamente, en su interior se originan PSC de 10 a 50 por vesícula, estas vesículas prolíferas, los PCS libres y los corpúsculos calcáreos, forman la arenilla

hidatídica. Cuando las vesículas no originan PCS los quistes se denominan estériles, acéfalos o no productivos. (Figura 4).



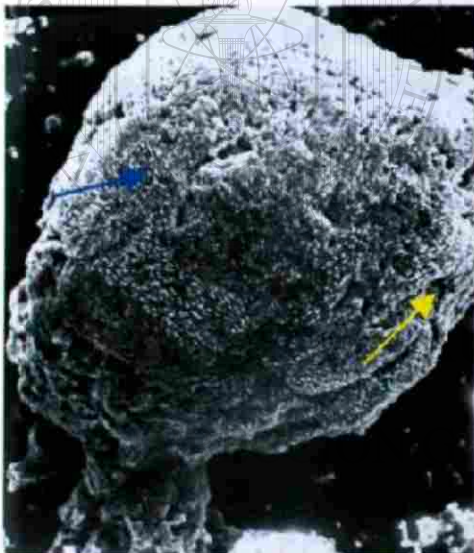
**Figura 4.** Corte histológico de Quiste Hidatídico de cerdo, muestra sus diferentes membranas: H) Tejido hepático normal. A) Membrana adventicia por la reacción inflamatoria del huésped. L) Membrana laminar del parásito. G) Membrana germinativa del parásito en donde se desarrollan los PCS.

Los protoescolices son ovoides, invaginados, tienen cuatro ventosas, un rostelló con 30 a 40 ganchos en dos hileras, una interna y otra externa, y 100  $\mu$  de diámetro aproximadamente (Figura 5). En el interior del quiste también existen las vesículas hijas que se forman de la membrana germinativa como islotes en la membrana cuticular y tienen la misma estructura y componentes que la vesícula madre, si se localizan en el interior del quiste, se denominan endógenas, si se localizan por fuera del quiste serán exógenas.

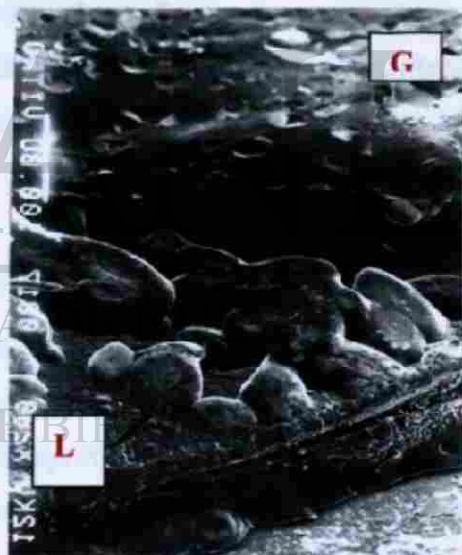




**Figura. 5)** Protoescolices en donde se aprecian sus diversos componentes: La corona de ganchos, las ventosas y corpúsculos calcareos.



**A**



**B**

**Figura 6).** Microscopía electrónica de barrido: A) Superficie externa de un PSC , con las microtriquias (flecha azul), y los poros (flecha amarilla), distribuidos con un patrón específico. B) Membrana laminar (L), presenta la superficie interna. Membrana germinativa (G), presenta la superficie externa.

Los antígenos de todas las estructuras contenidas en el quiste están en el líquido hidatídico que es claro como el agua de roca, contiene sales minerales y proteínas y distiende el quiste (Tay ZJ, *et al.* 1985, Smyth JD, 1970. Kumaratilake LM y Thompson RCA, 1984, Sherif SD *et al.* 1984, Hurd H, 1989 ).

Cuando eventualmente el líquido hidatídico entra en contacto con el sistema inmune del huésped, puede producir hasta choque anafiláctico y potencialmente puede causar la muerte. Los antígenos que se encuentran en el líquido hidatídico provienen de productos del metabolismo de los protoescólices y de las membranas germinativa y laminar. Se ha demostrado que aunque el quiste no sea fértil (que no se encuentren PSC) el líquido hidatídico es rico en antígenos; aunque el proveniente de quistes (arenilla) fértiles es más inmunogénico que el de los no productivos (Kagan IG and Agosin M 1968). Capron, en 1968, designó como Arco 5, a un precipitado de complejos antígeno-anticuerpo, que difiere a otras precipitinas, considerándolo el constituyente más importante del líquido hidatídico para diagnóstico (Capron A, *et al.* 1967, 1968).

En el diagnóstico de hidatidosis se han probado varias fracciones aisladas de los componentes del quiste hidatídico, muchas de ellas tiene reacciones cruzadas, de esta forma son dos los principales grupos de antígenos provenientes del quiste hidatídico, el del Arco 5 de Capron el cual es una lipoproteína termoestable, disociable en unidades de 61 a 67 kDa y el B, una lipoproteína termolábil disociable en unidades de 30 kDa ( Oriol R, *et al.* 1971, Pozzuoli R, *et al.* 1974, Bout D, *et al.* 1974, Rickard MD, *et al.* 1983, 1986, Thompson RCA, and Lymbery AJ, 1995). Se ha reportado que el fluido del quiste contiene varios antígenos inmunodominantes por WB entre los pesos de 8 y 120 kDa en sueros humanos (García A, *et al.* 1998).

Para el diagnóstico de hidatidosis humana se han probado diferentes inmunoglobulinas específicas con diferentes tecnologías, entre otras, se ha medido la IgE empleando el método de EIA, el cual puede considerarse un buen método que puede ser utilizado como prueba inmunodiagnóstica de enfermedad hidatídica humana.

También se ha estudiado la reactividad específica a subclases de IgG en el reconocimiento a antígenos de Echinococcosis humana, encontrando que estos análisis de isotipos de inmunoglobulinas, en respuesta a pacientes con *E. multilocularis* por medio de la técnica de ELISA Y WB, son pruebas útiles para el seguimiento post tratamiento, o para detectar una reactivación de la enfermedad (Dreweeck CM. *et al.* 1997).

La hidatidosis comparte características en la respuesta inmune con otras helmintiasis: niveles elevados de IgE e IgG4 (Afferni C, *et al.* 1984; Aceti A, *et al.* 1993), eosinofilia (Clutterbuck E, *et al.* 1989) y mastocitosis (Finkelman FD, *et al.* 1991). Esta respuesta está bajo un delicado control de citocinas producidas por linfocitos CD4+ Th1 y Th2. La IL-4 regula la producción de IgE e IFN- $\gamma$  la de IgG4 (King CL and Nutman TB, 1993), mientras que IL-5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-3 regulan la eosinofilia (Clutterbuck E, *et al.* 1989). IL-3 e IL-4 promueven la proliferación de células cebadas y su diferenciación (Finkelman FD, *et al.* 1991). Las infecciones por helmintos consistentemente generan una pronunciada respuesta Th2 (producción de IL-4, IL-5 e IL-10) lo que es consistente con la activación de células Th2 en esta parasitosis (Rigano R *et al.* 1995), estos pacientes también muestran elevadas la IgG, IgE específica y disminuidos los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$ , se ha encontrado que el incremento de IL-1, IL-2 e IL-4 muestra una relación con el número de características y localización de los quistes en el hígado (Torcal *et al.* 1996).

La respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, GM-CSF y TNF- $\alpha$ ) generalmente promueven el ataque a los parásitos por células citotóxicas e IgG2a, mientras que los Th2 (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y GM-CSF) promueven el ataque por células cebadas, eosinófilos y por otros isotipos de anticuerpos diferentes a la IgG (Cox DA, Liew FYT, 1992, Toulin-Boukoffa C, *et al.* 1997, Grimm F, *et al.* 1998).

Por otro lado, se ha reportado que el líquido de los quistes suprime *in vitro* la proliferación de células T en pacientes con enfermedad hidatídica o de personas normales (Wattal 1990). La inmunosupresión observada y la estimulación policlonal

podieran estar mediadas por citocinas pero hasta ahora no hay reportes claros acerca de su intervención en relación a quistes hidatídicos, lo cual sentaría un antecedente importante para, entender la fisiopatología de la enfermedad e investigar nuevas estrategias terapéuticas.

Los antígenos producidos por el parásito pueden infiltrarse alrededor del tejido del huésped, además las toxinas hidatídicas parecen intervenir en la sobrevivencia del parásito a largo plazo (Pozzuoli R, *et al.* 1974); también se ha estudiado el grado de inmunorregulación en ratones BALB/c durante una infección prolongada con *E. granulosus* para tratar de explicar la longevidad del parásito proponiendo que pudiera deberse a una reacción de evasión de la respuesta dependiente del MHC, lo que puede producir citotoxicidad alorreactiva e inmunosupresión (Annen JM, *et al.* 1981). En una infección primaria murina localizada, se ha observado que los linfocitos T juegan un papel central en el reconocimiento de los PSC y en la respuesta inflamatoria subsecuente, en contacto con los tejidos linfáticos, inducen cambios histológicos y ultraestructurales (Riley FM, *et al.* 1985). Se han estudiado cambios histológicos en las diferentes áreas del ganglio linfático del ratón durante la primoinfección con larvas de *E. granulosus*, y se ha observado que este parásito puede causar cambios en el ambiente celular, pues los PSC actúan como mitógenos aumentando la reactividad de los linfocitos T y B (Jenkins P, *et al.* 1986). Las larvas de *E. granulosus*, activan policlonalmente a las células B en forma timo independiente (Cox DA, *et al.* 1986, 1989). Bresson, en 1989, demostró la reactividad de los linfocitos a antígenos de *Echinococcus* en pacientes con Echinococcosis alveolar, además fue demostrada la reactividad linfocito específica a este parásito (Bresson-Hadni S, *et al.* 1989). Vuitton, en 1989, encontró disminuida la actividad de células "asesinas naturales" (NK) en sangre periférica y en granulomas periparasíticos de pacientes con Echinococcosis alveolar, también encontró bajo el porcentaje de células CD8, sin embargo el número de las células CD4 se encontraba aumentado. En hígado, las células CD8 constituyeron la principal población de células T y los granulomas estuvieron poblados principalmente por macrófagos (Vuitton DA, *et al.* 1989).



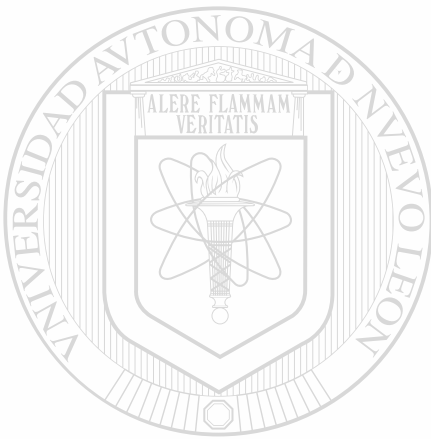
En el estudio de la relación huésped parásito se ha demostrado que el modelo murino es excelente para reproducir la hidatidosis en forma similar a la hidatidosis hepática de otros mamíferos y que el implante del quiste desencadena una respuesta inflamatoria mediada primordialmente por células mononucleares y macrófagos (Ganguly NK, *et al.* 1986. Dempster RP, *et al.* 1991. Mondragón de-la-P, 1995).

Estudios en animales han demostrado: Una respuesta inmune mediada por MHC (complejo principal de histocompatibilidad) contra un amplio rango de antígenos hidatídicos (Godot V. *et al.*, 2000), una reacción granulomatosa mediada por citocinas en diferentes órganos como el hígado, pulmones y otros tejidos. El papel de las citocinas ha sido estudiado parcialmente. Por ejemplo, el perfil de citocinas de Th2 es inducido por moléculas de carbohidratos determinantes de *E. granulosus*. Estas moléculas son usadas por el parásito para inmunosuprimir y diseminarse localmente, este mecanismo puede mantener la infección (Daemeteis S. *et al.*, 2001).

Las citocinas, parecen influir en la virulencia, infectividad y adaptación y pueden contribuir al establecimiento del parásito. En pacientes con hidatidosis hepática las citocinas inflamatorias aumentan transitoriamente y declinan rápidamente después de que los quistes son removidos quirúrgicamente; en contraste, otros pacientes muestran disminución durante la fase crónica de la hidatidosis. La evidente discrepancia entre variaciones de las citocinas fueron estudiadas por Dai y Gottstein (1999), quienes encontraron en un modelo murino, niveles de transcriptos de citocinas normales durante los primeros estadios de infección; sin embargo fue disminuyendo después por mecanismos dependientes de óxido nítrico, sugiriendo que el perfil de citocinas inflamatorias depende del estado de enfermedad, en consecuencia se ha visto que citocinas Th1 juegan un posible papel contra *E granulosus* (Touil-Boukoffa C. *et al.*, 1997),

En ratones BALB/c, inoculados con parásitos vivos; los niveles de IL-10 e IL-4 comienzan a decrecer hacia la cuarta semana pos-inoculación y el INF $\gamma$  se

incrementa. La producción de anticuerpos específicos fue caracterizada por altos niveles de IgG1 sistémica e IgGM e IgG3 (medidas en lavados peritoneales). En contraste parásitos muertos inducen niveles elevados de IL-4, INF $\gamma$  e IL-5 en la primer semana posinoculación. Niveles bajos de anticuerpos específicos fueron estimulados por parásitos muertos tanto sistémicamente como en la cavidad peritoneal. La infección de *E. granulosus* induce una respuesta primaria de Th2 estimulando una mayor respuesta de anticuerpos (Dematteis S. *et al* 1999).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## HIPÓTESIS

El implante de *Echinococcus granulosus* en el hígado manipula la respuesta inmune focal, suprimiendo la respuesta del huésped y favoreciendo la permanencia del parásito por largos periodos de tiempo.

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del metacéstodo de *Echinococcus granulosus* sobre la expresión hepática de citocinas inflamatorias.

### OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer un modelo murino para determinar la respuesta inmune en hidatidosis experimental.

Estudiar los mecanismos moduladores de la respuesta inmune producidos por *Echinococcus granulosus* que pudieran determinar la permanencia crónica del parásito en el huésped.

Determinar la expresión tisular de citocinas inflamatorias, que se presentan en hidatidosis experimental.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## ANIMALES.

Se utilizaron ratones BALB/c , de ambos sexos, de 8 a 12 semanas de edad desparasitados y mantenidos con dieta estándar, bajo condiciones de bioferio.

## QUISTES HIDATÍDICOS.

Los quistes hidatídicos se obtuvieron del decomiso de hígados parasitados en rastros municipales de Zacatecas. Se transportaron en refrigeración al laboratorio, se lavaron y se pusieron en una solución de yodo al 1% durante 30 minutos. Se extrajo el líquido y la arenilla hidatídica que contiene los protoescolices (PSC), por punción y aspiración en condiciones asépticas. Solo se utilizaron quistes fértiles y sanos (que no estuvieran calcificados, infectados o contaminados con componentes biliares) y el líquido con aspecto cristalino. De la arenilla hidatídica se separaron los PSC por decantación.

## *Echinococcus granulosus* (Protoescolices).

La arenilla hidatídica obtenida de los quistes se lavó con PBS pH 7.4 estéril, tres veces para separar los PSC y eliminar el líquido hidatídico. La viabilidad de los PSC se valoró por medio de la observación de las células flama al microscopio y del patrón de movimiento de los PSC.

## MODELO ANIMAL (infecciones experimentales)

Los ratones BALB/c (n=40) fueron infectados por vía intraperitoneal bajo condiciones asépticas, con 2000 PSC viables, estos se lavaron 5 veces con DMEM y se aplicaron a los animales bajo anestesia con vaporizaciones de éter etílico. La inoculación se llevó a cabo utilizando jeringas de 3 ml con aguja del 21 mm, el volumen inyectado fue de 200µl como dosis única con antibióticos -penicilina 100U/ml, estreptomocina 200 µg/ml (Ganguly NK, *et al.* 1986. Dempster RP, *et al.* 1991). Los animales fueron observados diariamente y se sangraron en el plexo retro

orbital antes de sacrificarlos a las 4, 8, 12 y 10 semanas de inoculación, en la necropsia se observó el hígado y otros órganos para identificar los quistes hidatídicos, se tomaron muestras para histología fijándose en glutaraldehído, otros fragmentos se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en PBS pH 7.4. A los controles sanos ( $n=10$ ) se les inoculó 200  $\mu\text{l}$  de agua inyectable por la misma vía, se sangraron y sacrificaron de la misma manera, y sus órganos fueron procesados en forma similar.

## **ANTÍGENOS HIDATÍDICOS.**

El líquido hidatídico (LH) fue colectado en condiciones asépticas por punción de los quistes hidatídicos, se centrifugó a 18000 rpm durante 60 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fue recuperado y dializado 72 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  contra agua tridestilada estéril, utilizando membranas de diálisis con poro de corte de 6000. Posteriormente el dializado fue liofilizado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (Pozzuoli R, *et al* 1974).

## **SDS-PAGE, Western blotting**

La concentración de proteínas fue medida a 280 nm, y caracterizadas por electroforesis de poliacrilamida-duodecilo sulfato de sodio al 11%, en condiciones reductoras (Laemmli and Favre 1970). Algunos geles fueron teñidos con azul de Coomassie, otros fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (Towbin *et al* 1979). Las tiras de nitrocelulosa con proteínas hidatídicas fueron bloqueadas toda la noche con leche descremada disuelta en PBS al 0.15M pH 7.4 toda la noche, posteriormente se lavaron tres veces con Tween 20-PBS al 1%, por 10 minutos cada lavado. Las tiras fueron incubadas 120 minutos con anti IgG, IgM, IgA anti-ratón marcadas con peroxidasa diluidas 1:200 en PBS, se lavaron y la reacción de color fue inducida con 3'3-diaminobencidina y 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El nivel molecular de las bandas inmunorreactivas fue determinada tomando en cuenta estándares de peso molecular (Bio-Rad) de acuerdo al método de Rothe.

## **ELISA.**

La prueba inmunoabsorbente enzimática se realizó en micro platos de poliestireno con 96 pozos, se cubrieron toda la noche con líquido hidatídico (5  $\mu$  g/pozo), después se le hicieron tres lavados con PBS 0.15M, se bloquearon sitios no deseados con leche descremada al 1% in PBS 0.15M pH 7.4 por 1 hora después se agregó a cada pozo 50  $\mu$ l de suero de ratón diluido 1:50 y se incubaron por 120 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS 0.15M y se aplicó a cada plato según el caso, anti IgG, IgA o IgM de ratón marcadas con peroxidasa, después se lavaron y el color de la reacción se indujo con 3'3-diaminobencidina disuelta en agua destilada, con 40  $\mu$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Cochet O, *et al* 1998).

## **EXTRACCIÓN DE ARN DE HÍGADO DE RATÓN CON HIDATIDOSIS Y NORMAL.**

El ARN total fue extraído de fragmentos de hígado cercanos o distantes a la implantación del parásito. En el caso de animales control, las biopsias fueron tomadas de la superficie anterior del hígado. La extracción de ARN fue llevada a cabo por el método de guanidina tiocianato/fenol/cloroformo (TRizol GIPCO-BRL). Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm/10 min y se colectó la fase acuosa para precipitar el ARN con isopropanol. Seguido de dos lavados con etanol tratado con DPEC. Finalmente, el botón se disolvió y fue cuantificado el ARN por DO a 260 nm.

## **MEDICIÓN DE ARN POR ANÁLISIS DE DENSIDAD ÓPTICA.**

Se tomaron 5  $\mu$ l de ARN, se les agregaron 995  $\mu$ l de agua tridestilada se mezclaron y se transfirieron a una cubeta para espectrofotometría. Se calibra el espectrofotómetro utilizando agua tridestilada como blanco. La muestra fue leída en el espectrofotómetro a 260 nm.

## **REVERSO TRANSCRIPTASA/ REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).**

Para la síntesis de cADN, 250 ng de ARN total fueron incubados con 200 M dNTP y 0.7  $\mu$ M del primer 3' antisentido, mezclados con 5 U/20  $\mu$ l de rTth/ADN polimerasa (Gene Amp<sup>TM</sup> PCR system 9600). La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo a 70°C por 10 min, la reacción fue detenida incubando los tubos en hielo. Después de la reacción de reverso transcriptasa la amplificación de cADN de TNF $\alpha$ , IL-6, TGF $\beta$ , IL-10 y G<sub>3</sub>PDH se llevó a cabo por PCR, se agregaron 0.15  $\mu$ M de oligonucleótidos 5' sentido. La reacción en los tubos con 50  $\mu$ l de mezcla de muestra fueron amplificados en un termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR sistem 2400), utilizando 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 min, 48°C por 2 min y 72°C por 1.4 min al final de la reacción de PCR, las muestras fueron caracterizadas en agarosa al 0.8% con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. Los productos fueron visualizados con luz UV (Wang AM and Mark DF., 1990). Un cálculo semicuantitativo de los ADNc fue hecho midiendo el área de las bandas, los cuales fueron expresados en píxeles utilizando un programa de Kodak 1D. Se utilizó un programa de análisis del sistema Kodak 120 para medir. Los niveles relativos de transcritos de citocinas fueron determinados por la comparación con G3PDH para animales infectados y no infectados. Todos los controles y transcritos problema tuvieron un valor densitométrico arriba de cero. Las diferencias entre muestras fueron determinadas por pruebas de T de Student (Number Cruncher Statistical Systems NCSS program ).



## OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los siguientes oligonucleótidos fueron utilizados en PCR.

IL-6	sentido	5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T-3'
	antisentido	5'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC-3'
TNF- $\alpha$	sentido	5'-TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC-3'
	antisentido	5'-GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GGT GTG GG-3'
IL-10	sentido	5'-CTG GAA GAC CAA GGT GTC TAC-3'
	antisentido	5'-GAG CTG CTG CAG GAA TGA TGA-3
TGF- $\beta$	sentido	5'- TCA CCC GCG TGC TAT TGG TGG ACC GC-3'
	antisentido	5'- ACA CCT TCC ATT CTC TTG AGC TGG G-3'.
G <sub>3</sub> PDH	sentido	5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3',
	antisentido	5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



## HIBRIDACIÓN *IN SITU* (FISH).

mRNAs de citocinas y el gen control, fueron determinados en hígado de ratón por pruebas hibridación *in situ*. Se tomaron muestras de tejido hepático murino, cercano a la implantación del quiste así como de animales sanos y se fijaron en glutaraldehído, se procesaron por histología de la siguiente manera; 1) los tejidos se deshidrataron en pasos de alcohol etílico, al 50%, 70%, 96% y 100%. Se pasaron a xilol y posteriormente se incluyeron en parafina, se hicieron cortes de 2 micras aplicándose en portaobjetos cubiertos con albúmina de huevo. Se desparafinaron con xilol, alcohol etílico al 100%, 96%, 70%, 50% y agua destilada, se pasaron a PBS, se incubaron en HCl 0.02M por 10 min. Se pasaron a Triton X 100/PBS 0.01% por 90 segundos. Se lavaron 2 veces por 3 min c/u. Se pasaron a una solución de Proteinasa K (100 g/ml) en buffer TE (pre-calentado a 37°C por 10 min) por 10 min a

37°C. Se lavaron en glicina (2 mg/ml) en PBS por 5 min para inactivar la proteinasa K. Después se lavaron en ácido acético al 20% frío, por 15 segundos para remover fosfatasa alcalina endógena. Luego en PBS, 2 lavados de 5 min c/u. Se eliminó el exceso de PBS y se aplicó buffer de hibridación a 37°C por 5 min. Se aplicaron 20 µl de sonda (TNF $\alpha$  o IL-6) marcada con fluorogreen y se incubaron a 90°C durante 3 min, luego a 37°C toda la noche. Se lavaron con buffer SSC, luego con SSC-SDS 0.1% 2 veces por 5 min c/u, seguidos por un lavado de SDS 0.1%/SSC 0.2X (w/v) por 5 min a 37°C. Se lavaron con buffer TBS por 5 min. Se le aplicó al tejido una gota de glicerol-PBS y se colocó un cubreobjeto. Las preparaciones fueron evaluadas en un microscopio de epifluorescencia (B-MAX 40 Olympus).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# RESULTADOS

## INFECCIÓN EN ANIMALES.

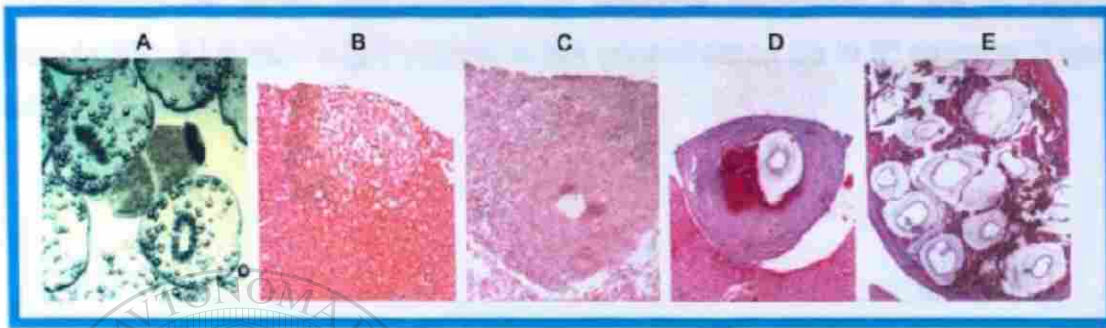
De los hígados de cerdos infectados se obtuvieron protoescolices viables los que fueron utilizados para inducir el modelo en ratones BALB/c (Figura 3, 7). Los quistes hidatídicos fueron observados macroscópicamente en la superficie del hígado 8 semanas después de la inoculación; En la semana 16 los quistes se desarrollaron completamente identificándose sus estructuras (Figura 6), se observaron grupos de 2-4 quistes en la superficie hepática. Un mes después de la infección, en microscopio de luz, se observó una reacción inflamatoria discreta compuesta por células mononucleares e infiltración de macrófagos; en el tejido hepático, las células se fueron organizando en un granuloma dos meses después de la infección, se observó un quiste con membrana adventicia y una incipiente lámina germinal en el tejido hepático. Después de 3 meses el quiste exhibió la membrana germinal y laminar del parásito y la membrana adventicia del huésped. Cuarto meses después de la infección los protoescolices fueron evidentes en la membrana germinal. Adicionalmente a la semana 16, la reacción inflamatoria se observó en menos grado en el área de implantación (figuras 7, 8, 9).



**Figura 7).** (A) Muestra hígado de cerdo con quistes hidatídicos. (B) Protoescolices mostrando su corona de ganchos y corpúsculos calcáreos en su estructura. (C) Hígado de ratón mostrando quistes hidatídicos. (D) Corte histológico de un quiste hidatídico mostrando sus estructuras; membrana adventicia, membrana laminar y membrana germinativa.



**Figura 8).** A). Se muestra el hígado del ratón con varios quistes hidatídicos. B). Algunos de ellos implantados en peritoneo.

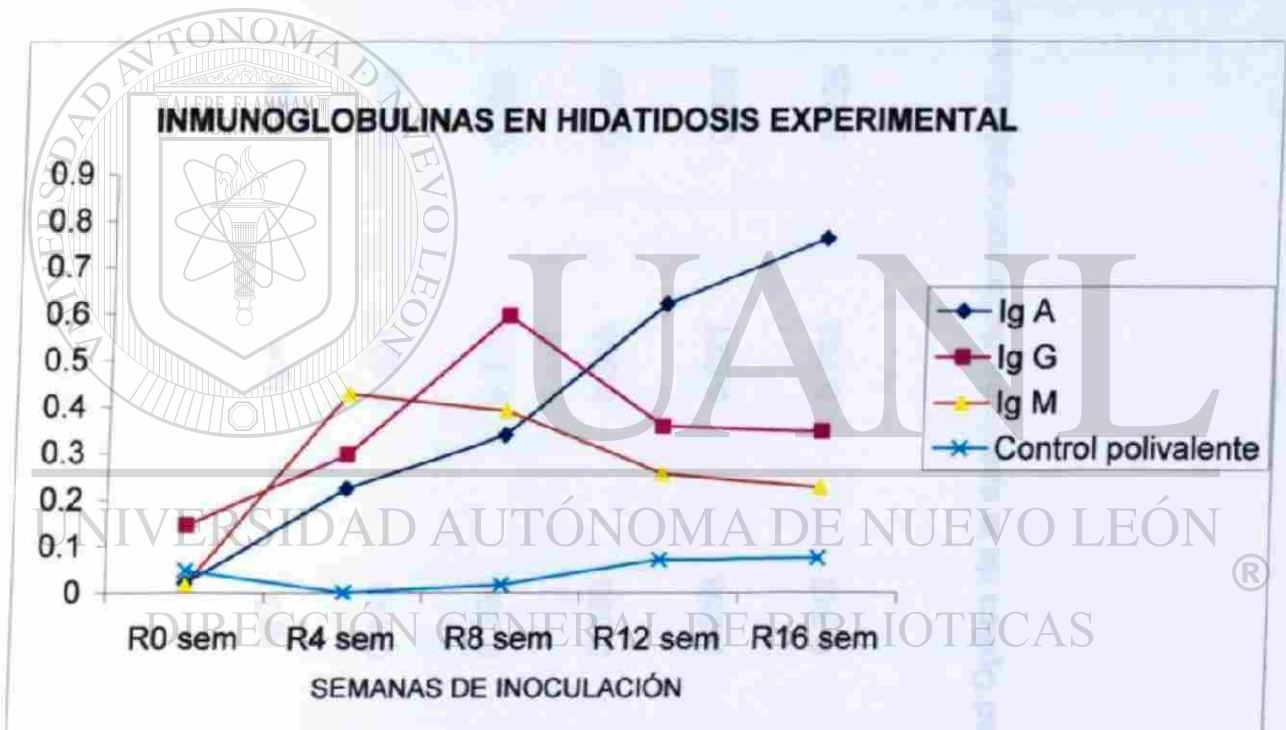


**Figura 9).** A. Protoescolices de *E. granulosus* mostrando su rostellum. B. Hígado de ratón un mes después de la inoculación con PSC mostrando una discreta reacción inflamatoria por células mononucleares y macrófagos, infiltrando, el tejido hepático. Las células están organizándose para formar un granuloma (flecha). C. Dos meses después de la infección, un incipiente quiste con su membrana adventicia y laminar. D. Tres meses después de la infección, el quiste exhibe la membrana laminar y germinativa del parásito y la membrana adventicia del huésped. E. Cuatro meses después de la infección, la membrana germinativa aparece con grupos de protoescolices.

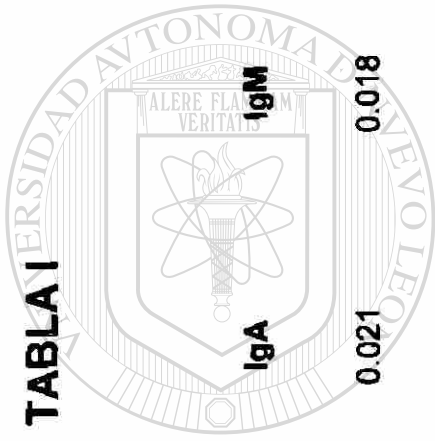


## RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

Los animales infectados mostraron una respuesta primaria contra el antígeno de líquido hidatídico (AgLH) como puede apreciarse en la figura 10; los títulos de anticuerpos de clase IgM tuvieron su máxima expresión a las 4 semanas de inoculación. El switch a IgG y luego a IgA ocurrió cerca de la 8ª semana (Figura 10 y tabla 1).



**Figura 10. ELISA.** Muestra la disposición de las diferentes inmunoglobulinas con respecto a la densidad óptica, como fueron apareciendo durante las diferentes semanas de inoculación.



**TABLA I**

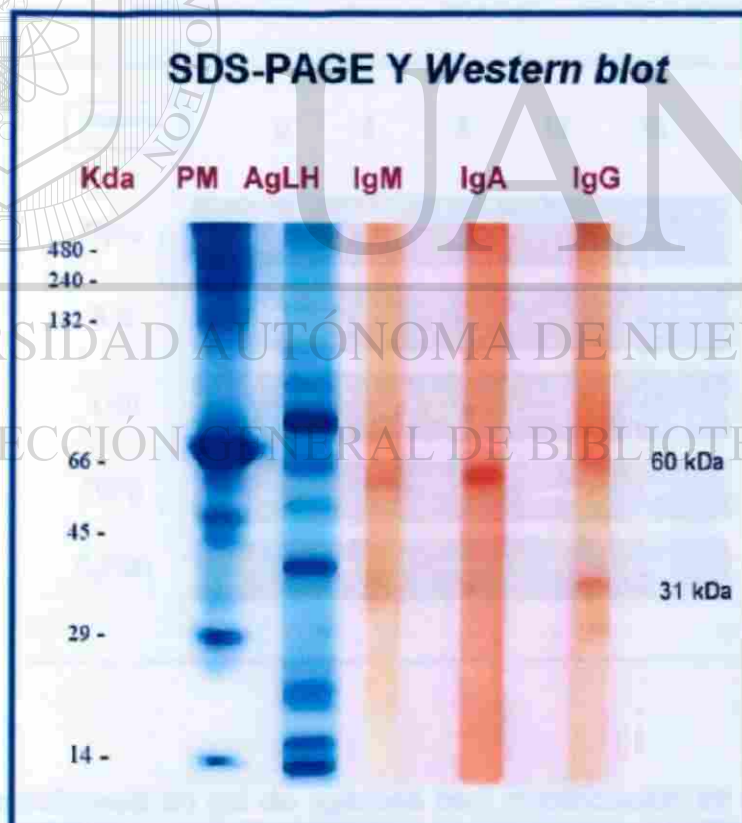
Semanas de Inoculación	IgG	IgA	IgM	Control polivalente
R0 sem	0.146	0.021	0.018	0.049
R4 sem	0.296	0.224	0.429	-0.021
R8 sem	0.596	0.339	0.392	0.018
R12 sem	0.358	0.621	0.256	0.072
R16 sem	0.345	0.762	0.226	0.076

**Promedio de la Densidad Óptica de la aparición de inmunoglobulinas por semanas de inoculación.**



## CARACTERÍSTICAS MOLECULARES EN LOS ANTÍGENOS RECONOCIDOS POR EL SUERO DE ANIMALES INFECTADOS.

El antígeno de líquido hidatídico (Ag LH), exhibió un patrón de bandeo muy amplio. En PAGE, encontramos ~ 20 bandas con pesos moleculares con rangos de 5 a 200 kDa, de estas encontramos cinco bandas más evidentes probablemente de antígenos inmunodominantes con pesos moleculares de 72, 61, 52, 42, y 30 kDa. La mayor reactividad observada fue contra la proteína de 60 kDa en todos los animales infectados, esta reacción fue seguida por la banda de 31 kDa, la cual fue observada en el 80% de los sueros. Los sueros control de los animales no infectados fueron negativos. (Figura 11).



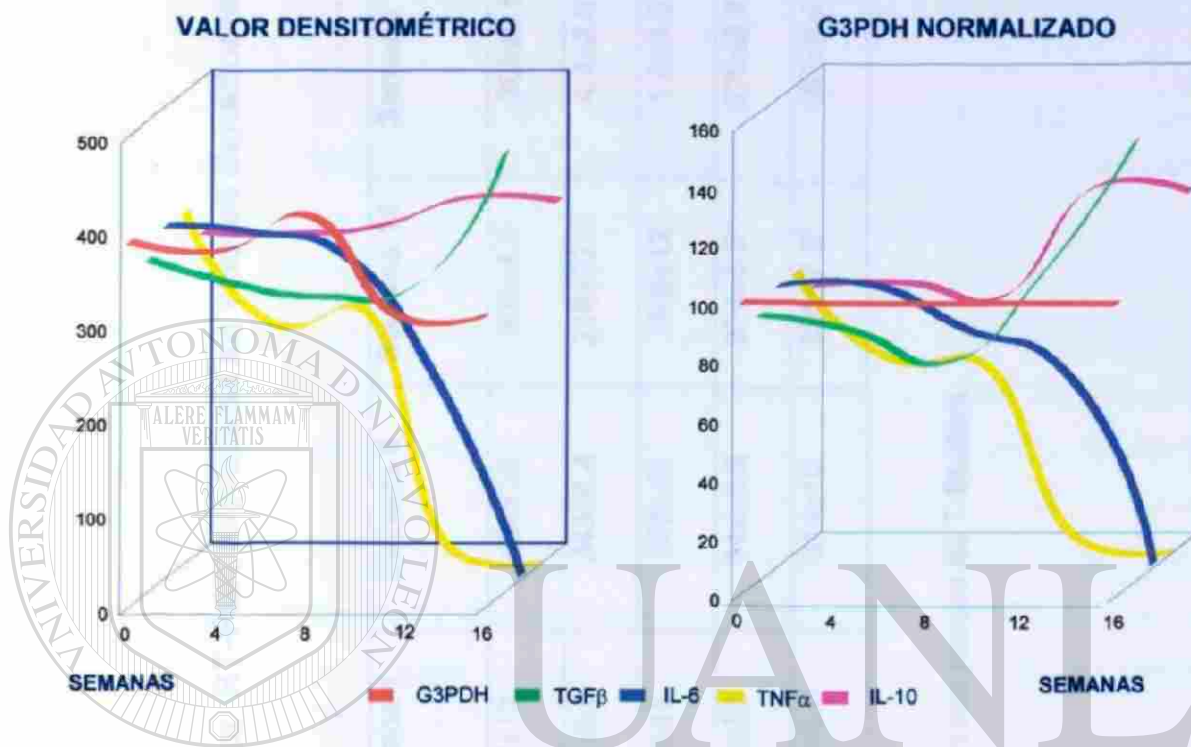
**Figura 11).** Corrimiento electroforético de antígenos de LH. Inmuno-electrotransferencia de los principales antígenos del LH revelados con IgM, IgA e IgG.

## LAS CITOCINAS INFLAMATORIAS $TNF\alpha$ e IL-6 SON EXPRESADAS EN EL HÍGADO.

Todas las muestras fueron normalizadas con los controles de G3PDH. Los genes de citocinas fueron expresados normalmente en los animales a la semana cero. A las 8 semanas después de la infección, la expresión de IL-6 y  $TNF\alpha$  decreció progresivamente en el lugar del implante del parásito. En algunos animales se anuló la transcripción hepática de IL-6 y  $TNF\alpha$  16 semanas después de la infección. En un marcado contraste, el incremento progresivo de la expresión hepática de IL-10 y  $TGF\beta$  fue observada. Por otro lado la expresión hepática de todas las citocinas en un área distante del quiste implantado, se comportó de manera similar a los controles. Estos datos sugieren que el implante del parásito, desregula la expresión de las citocinas inflamatorias. (Figura 12 y 13).



**Figura 12).** Electroforesis en gel de agarosa con amplificación de citocinas por RT-PCR. En comparación a la expresión del gene control G3PDH, se presenta un panel representativo de genes de citocinas, mostrando una regulación negativa de  $TNF\alpha$  e IL-6 y una sobre regulación de IL-10 y  $TGF\beta$ .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 13).** Presenta la disposición de los diferentes citocinas de la semana 0 a la semana valores densitométricos en el comportamiento 16 después de la inoculación con PSC.

**TABLA II**

**Expresión de citocinas en hígado por RT-PCR expresada en valores densitométricos.**

Citocina	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
G3PDH	393±13	377±12	434±36	309±4.8	309±5.5
IL-6	373±9.6	367±6.9	343±6.4	216±22.6	4.4±3.0*
TNF $\alpha$	373±4.1	256±15	303±46	16.6±12	1.8±3.0*
IL-10	337±4.5	345±33	344±8.8	374±5.8*	370±8.8*
TGF $\beta$	327±8.0	353±5.6	314±10	355±7.2*	467±8.4*

\*Diferencias significativas con G3PDH con prueba de T-Student .

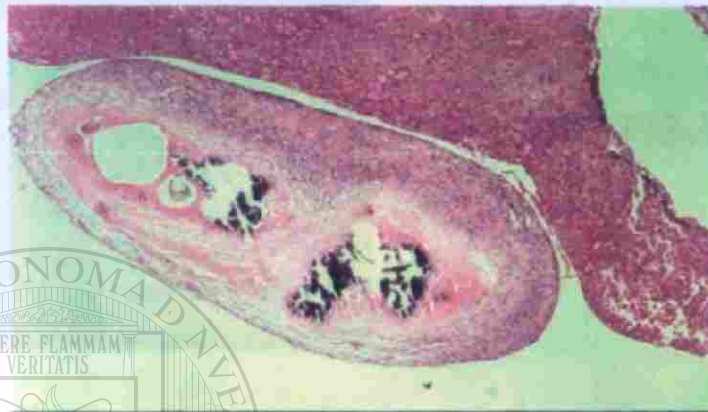
## **LA BAJA EXPRESIÓN DE IL-6 Y TNF $\alpha$ DEPENDE DEL IMPLANTE DEL PARÁSITO.**

Para resolver la pregunta, si la disminución en la expresión de citocinas inflamatorias era un fenómeno local o generalizado en todo el hígado, se examinó por medio de hibridación *in situ* (FISH) las diferencias en la expresión de citocinas en sitios cercanos y distantes al sitio de implante del quiste. La hibridación *in situ* se llevó a cabo en cortes histológicos de tejido hepático murino, de animales normales e infectados. Los mRNAs del IL-6 y TNF $\alpha$  fueron observados en sitios distantes al implante del quiste; sin embargo se observó una marcada disminución de éstos mensajeros alrededor del quiste 8 semanas después de la infección, de hecho no se observaron mensajeros cerca del área de implante después de las 16 semanas de infección. Por otro lado, IL-10 y TGF $\beta$  se expresaron normalmente en el área de implantación del quiste. Tejidos distantes al área del implante del quiste fueron ligeramente positivos para IL-6 y TNF $\alpha$ , mientras que la IL-10 y el TGF $\beta$  tuvieron expresión normal. El gene control G3PDH fue positivo y su expresión fue similar en todos los tejidos tanto control, como infectados (Tabla II, y Figuras 14, 15, 16).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## Hidatidosis murina IL-6



H&E



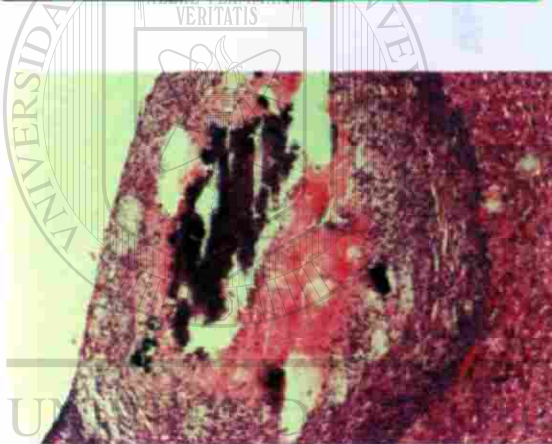
FISH

**Figura 14).** FISH. Sección de hígado de ratón con quiste hidatidico teñida con H&E mostrando una reacción inflamatoria en el área de implatación. Seccion de hígado de ratón hibridizadas *in situ* con sondas de DNA para IL-6 mostrando ausencia de IL-6 mRNA alrededor del quiste de *E. Granulosus*, 16 semanas después de la inoculación.

## Hidatidosis murina TNF $\alpha$



FISH

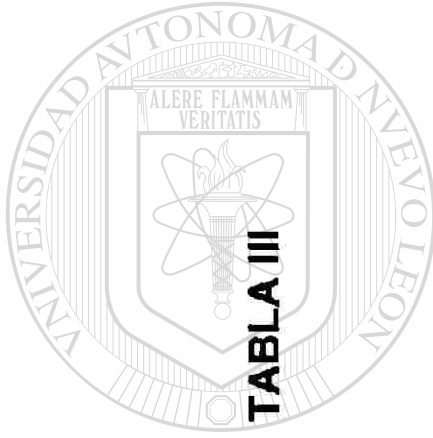


H&E

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 15).** FISH. Secciones de hígado de ratón representativas in situ hibridizadas con sondas de DNA mostrando ausencia de mTNF $\alpha$  alrededor del quiste de *E. granulosus* 16 semanas después de la inoculación. B. Además otra sección teñida con H&E mostrando una reacción inflamatoria en el área de implantación.





**TABLA III**

**EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN TEJIDO HEPÁTICO AFECTADO Y SANO ESTUDIO POR (FISH)**

Semanas de infección	IL-6	IL-6	TNF $\alpha$	TNF $\alpha$	IL-10	IL-10	TGF $\beta$	TGF $\beta$	TGF $\beta$	G3PDH	G3PDH
0	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Sano	Afectado	Sano
16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil	Positivo	Débil	Positivo	Positivo	Positivo
	Negativo	Débil	Negativo	Débil	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

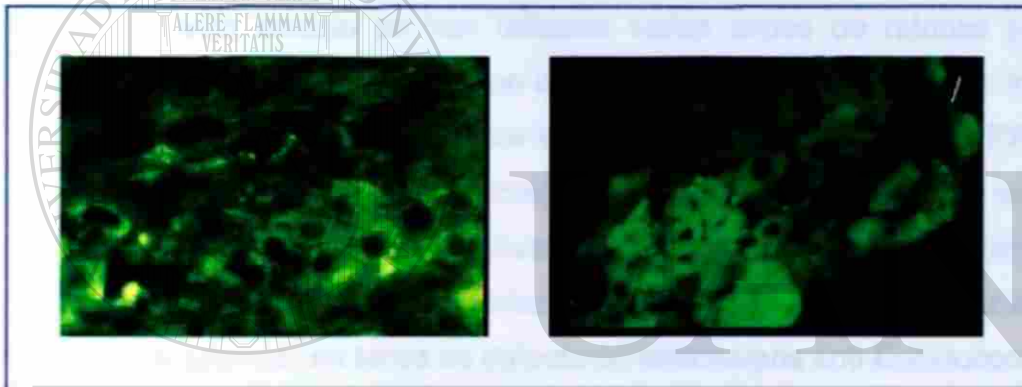
## DISCUSIÓN

El presente estudio evidenció un menor nivel de expresión de IL-6 en ratones BALB/c tras la infección con *E. granulosus*. Los resultados obtenidos sugieren que la infección por *E. granulosus* puede inducir una respuesta inmune que disminuye la expresión de IL-6 en el hígado de ratones BALB/c. Este hallazgo es consistente con los resultados de otros estudios que han demostrado que la infección por *E. granulosus* induce una respuesta inmune que disminuye la expresión de IL-6 en el hígado de ratones BALB/c.

## Hepatocitos

IL-6

TNF  $\alpha$



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

**Figura 16).** FISH. Secciones de hígado de ratón representativas *in situ* hibridizadas con sondas de DNA mostrando disminución de fluorescencia en células alrededor del quiste de *E. Granulosus*.

## DISCUSIÓN

El presente estudio estableció un modelo experimental de hidatidosis en ratones BALB/c, para estudiar la biología de la relación huésped-parásito. Los principales resultados demuestran: 1) Que es posible establecer un modelo murino de hidatidosis. 2) Que el ratón BALB/c desarrolla una respuesta inmune humoral y celular a los antígenos hidatídicos. 3) Que el implante de *E. granulosus*, disminuye la expresión de citocinas inflamatorias que probablemente ayuden a la permanencia y diseminación local del parásito.

En este sentido se han utilizado varias cepas de ratones para inducir la enfermedad hidatídica, tomando en cuenta las experiencias de otras investigaciones en hidatidosis hepática en ratones singénicos BALB/c, (Dempser RP, *et al.* 1991, Ganguly NK, *et al.* 1986, Mondragón-de la-Peña M. C. 1995), establecimos la enfermedad hidatídica murina utilizando PSC como material infectante en ratones BALB/c, y todos los animales infectados con protoscolices, desarrollaron quistes hidatídicos además, en todos se detectaron anticuerpos anti-Echinococcus.

Una vez establecido el modelo comprobamos que el modelo murino era ideal ya que desarrollaba una respuesta inmune inicialmente normal y después estudiamos algunos mecanismos por los cuales el parásito puede evadir la respuesta inmune del huésped por medio de la inhibición de citocinas inflamatorias. Para contestar nuestra pregunta central y corroborar que el modelo animal, reconocía los diferentes epítopes del parásito, encontramos que la respuesta antígeno-específica, es manejada por dos proteínas con pesos moleculares de 60 y 31 kDa. En hidatidosis se ha descrito reactividad serológica específica a antígenos hidatídicos, (Capron A, *et al.* 1967, 1968) el "arco 5" o antígeno A y (Oriol R. *et al.* 1971, Pozzuoli R *et al.* 1974. Rickard M., D. Lightowers M. W. 1986), y otra proteína de aproximadamente ~130-150 kDa, designada como "antígeno B" (Oriol C. *et al.* 1975).

En este modelo se demostró que la infección experimental, genera los anticuerpos (Ac) contra los antígenos A y B, de 61 y 30 kDa de *Western blot* por ELISA. Se demuestra la respuesta primaria humoral entre la 2ª y 4ª semana de infección, y el "switch" ocurre hacia la 8ª semana. Otra interesante observación fue que el antígeno A dispara la respuesta inmune humoral primaria, además maneja otro antígeno de alto peso molecular ~295, esta es seguida por la respuesta secundaria contra el antígeno B. Otros antígenos con pesos moleculares con rango entre ~295 y 14 kDa también fueron reconocidos por algunos sueros.

Otra observación fue que el antígeno A (arco 5) se comportó como el epítipo inmunodominante de la hidatidosis murina y que los anticuerpos IgA reconocen como único blanco hidatídico al antígeno A el cual puede ser un marcador específico de la infección activa en la hidatidosis experimental.

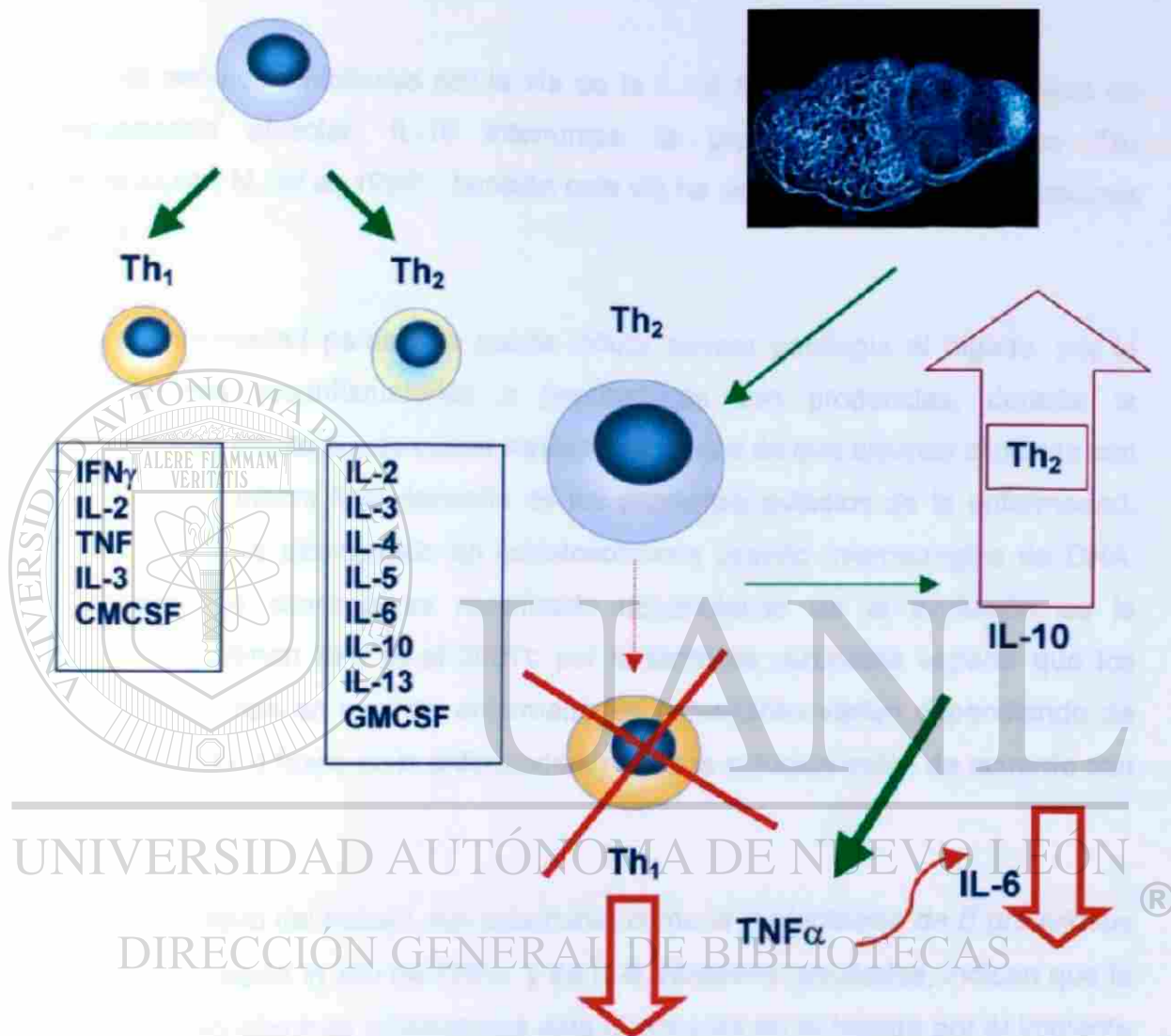
Con un modelo experimental de hidatidosis bien establecido, otro objetivo del trabajo fue investigar el papel de algunas citocinas en el implante de *E granulosus* en hígado, particularmente la expresión *in situ* de TNF- $\alpha$  e IL-6, ya que la interacción entre citocinas derivadas del huésped pueden inducir variaciones antigénicas, modificación en la virulencia, infectividad y adaptación; que son factores determinantes en la relación huésped parásito. Los principales resultados de esta investigación, indican que las citocinas inflamatorias son reguladas, negativamente disminuyendo su expresión en el hígado en respuesta a la enfermedad hidatídica.

La IL-6 es una citocina producida entre otras por células linfoides, macrófagos, fibroblastos y hepatocitos (Helle M., et al 1989), la síntesis y regulación de IL-6 puede aumentar o disminuir por diferentes antígenos, lipopolisacáridos, por TNF $\alpha$ , PDGF y virus durante la infección. La IL-6 tiene un importante papel como mediador. El TNF $\alpha$  es producido por linfocitos activados, macrófagos y células endoteliales, esto se debe a efectos pleiotrópicos, esta citocina es un importante mediador inflamatorio (Aarden L., et al 1985). Además el TNF $\alpha$  es una molécula

crítica en la resistencia contra la infección, porque tiene un profundo efecto en la inducción de IL-6 (Silacci P., *et al* 1998).

Existen reportes previos de citocinas inflamatorias en pacientes con hidatidosis hepática y han señalado un abatimiento de los niveles séricos de IL-1 y TNF $\alpha$  durante algunas fases de la enfermedad (Torcal J., *et al* 1996; Rigano R., *et al* 1995, 2001); otros reportes en contraste encuentran un aumento significativo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en niveles séricos de pacientes con enfermedad hidatídica del hígado y pulmones, sin embargo cuando los quistes son removidos quirúrgicamente, los niveles de citocinas declinan rápidamente, estos datos experimentales nos hacen inferir que las citocinas inflamatorias juegan un papel importante, en la respuesta a *Echinococcus* (Touil-Boukoffa C., *et al* 1997). Con esta panorámica, el papel de IL-6 e TNF- $\alpha$  en enfermedad hidatídica pudiera ser vista como controversial, sin embargo una observación hecha por Dai & Gottstein (1999), clarifica esta discrepancia encontrando que en estados de primoinfección existe un nivel normal o aumento de transcritos de citocinas inflamatorias, sin embargo en estadios tardíos las citocinas inflamatorias son reguladas negativamente por un mecanismo dependiente de óxido nítrico, la diferencia en el comportamiento de la citocina sugiere que el implante de *Echinococcus*, restringe los efectos catabólicos crónicos producidos por el TNF $\alpha$ , por un mecanismo aún no definido.

Hay al menos dos vías posibles por las cuales *E granulosus* puede regular negativamente la transcripción *in situ* de TNF- $\alpha$  e IL-6; Primero) A través de una inducción selectiva de citocinas Th2. Segundo) Por inhibición selectiva inducida por las hepatotoxinas producidas por el parásito. Considerando la primer posibilidad es ampliamente aceptado que la producción de citocinas Th1 disminuyen en infecciones por helmintos y por otros factores, además la producción de IFN $\gamma$  es inhibida por la IL-10, este balance de regulación negativa ha sido demostrado en diferentes condiciones, por lo tanto después de una agresión, la regeneración del hígado produce un aumento de IL-10, y esta citocina disminuye la producción de TNF- $\alpha$  (Rai R.M., *et al* 1997). (Figura 17).



**Figura 17).** Representación de la expresión normal de citocinas por células Th1 y Th2, y la modificación que probablemente ocurre, al implantarse el parásito en el organismo.

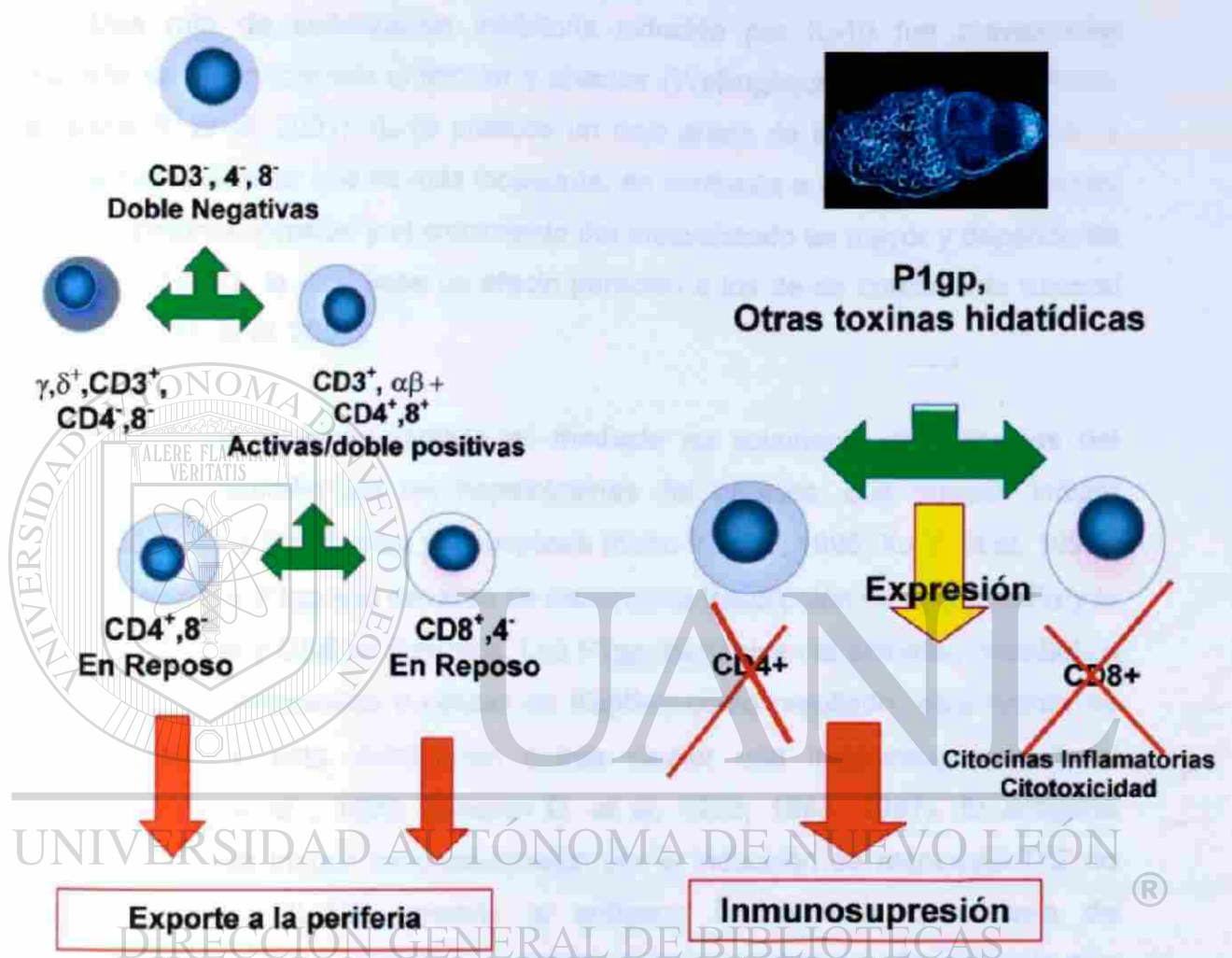


Las señales inhibitorias por la vía de la IL-10 fue previamente reportada en echinococcosis alveolar, IL-10 interrumpe la producción de citocinas Th<sub>1</sub> (Wellington N., et al. 1999)., también esta vía ha sido descrita en echinococcosis unilocular.

La enfermedad parasitaria puede inducir severa patología al hígado, por lo tanto, citocinas pro-inflamatorias o pro-fibróticas son producidas, durante la cicatrización, su efecto puede traslaparse ya que de que algunas citocinas son redundantes su efecto final depende de los diferentes estadios de la enfermedad. Recientemente fue demostrado en schistosomiasis usando microarreglos de DNA, que el perfil de citocinas es modificado dependiendo de la evolución de la enfermedad (Hofman KF., et al 2001); por lo tanto es razonable esperar que los perfiles de citocinas en muchas enfermedades parasitarias varíen dependiendo de diferentes etapas o fases de la enfermedad, nuestros estudios están de acuerdo con esta noción.

Otro objetivo del trabajo, fue determinar como la implantación de *E. granulosus* modifica la expresión *in situ* de TNF $\alpha$  y de IL-6. Nuestros resultados, indican que la expresión de las citocinas inflamatorias esta disminuida en el hígado por el implante de *E. granulosus*, los efectos primarios de citocinas Th<sub>2</sub> como IL-10 pudieron contribuir a esta reducción. La presencia de *E. granulosus* en el hígado puede despertar la regeneración de hepatocitos con un incremento subsecuente de IL-10, como también se puede disminuir la transcripción de TNF $\alpha$  (Rai. R.M. et al, 1997). Basados en nuestros resultados inferimos que IL-10 y TGF $\beta$ , disminuyen la regulación de TNF $\alpha$  e IL-6 durante la fase latente de la enfermedad (figura 18).

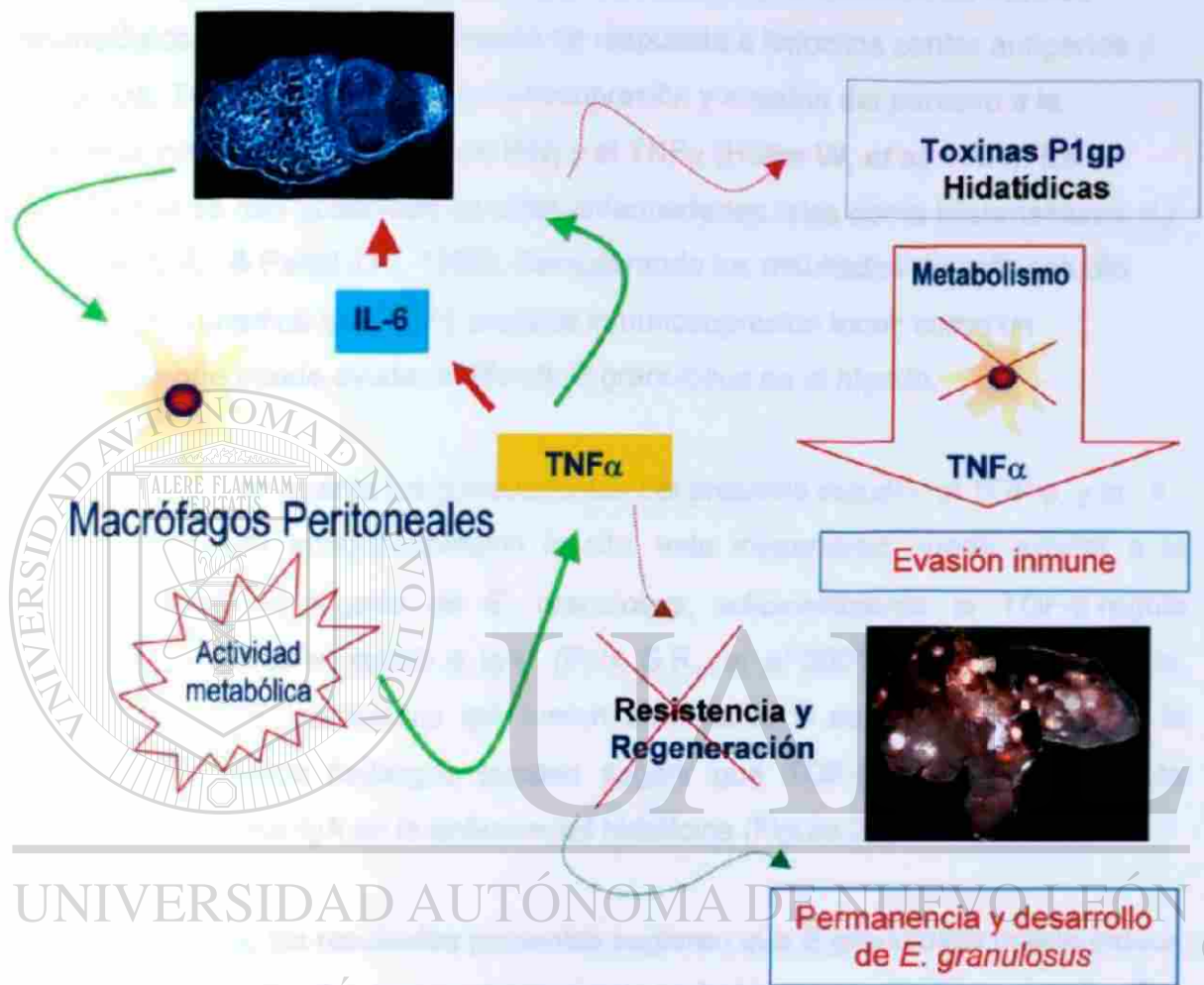




**Figura 18).** Representación gráfica de la ontogenia normal de células CD4 y CD8, y la probable interferencia en la expresión de CD4 y CD8 ejercida por las toxinas hidatídicas.

Una ruta de señalización inhibitoria inducida por IL-10 fue previamente reportada en equinocosis unilocular y alveolar (Wellington N., *et al* P., 1999; Dematteis S. *et al*, 2001), IL-10 produce un bajo grado de inmunosupresión en la enfermedad unilocular que es más localizada, en contraste a equinocosis alveolar donde la inmunosupresión y el crecimiento del metacéstono es mayor y depende de la proteína 14-3-3, la cual tiene un efecto parecido a los de de crecimiento tumoral (Siles-Lucas M, *et al*, 2001).

La relación huésped-parásito es mediada no solamente por citocinas del huésped, sino también por las hepatotoxinas del parásito, que pueden inducir proliferación de los hepatocitos y/o apoptosis (Kubo Y. *et al*, 1996; Xu Y. *et al*, 1998). Las hepatotoxinas P1gp son capaces de disminuir la transcripción de IL-6 y TNF $\alpha$  y la expresión de CD4 y CD8 en timocitos. Las P1gp disminuyen la actividad metabólica de macrófagos peritoneales y células de Kupffer; como resultado, esta fuente de TNF $\alpha$  es inhibida, esta disminución puede causar una inmunosupresión local (Acheson D.W. *et al* . 1990; Janssen D. *et al*, 1992, 1993, 1997). El antígeno hidatídico B puede inducir inmunosupresión por la inducción de respuesta Th2 no protectora (IL-4 y IL-13), además el antígeno B inhibe la quimiotaxis de polimorfonucleares, este efecto no es debido al desensamble del citoesqueleto ni a efectos tóxicos (Rigano R., *et al*, 2001). La naturaleza de esta inhibición no esta aún determinada, sin embargo una razonable relación entre citocinas Th2 y quimiotaxis disminuida, es debido posiblemente a la baja en ciertas quimiocinas o en sus receptores, causada por IL-4, IL-10 e IL-13 (Pearlman E. *et al*, 1997; Takayama T. *Et al*, 2001; Weber K:S:K: *et al*, 2001). (Figura 19).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

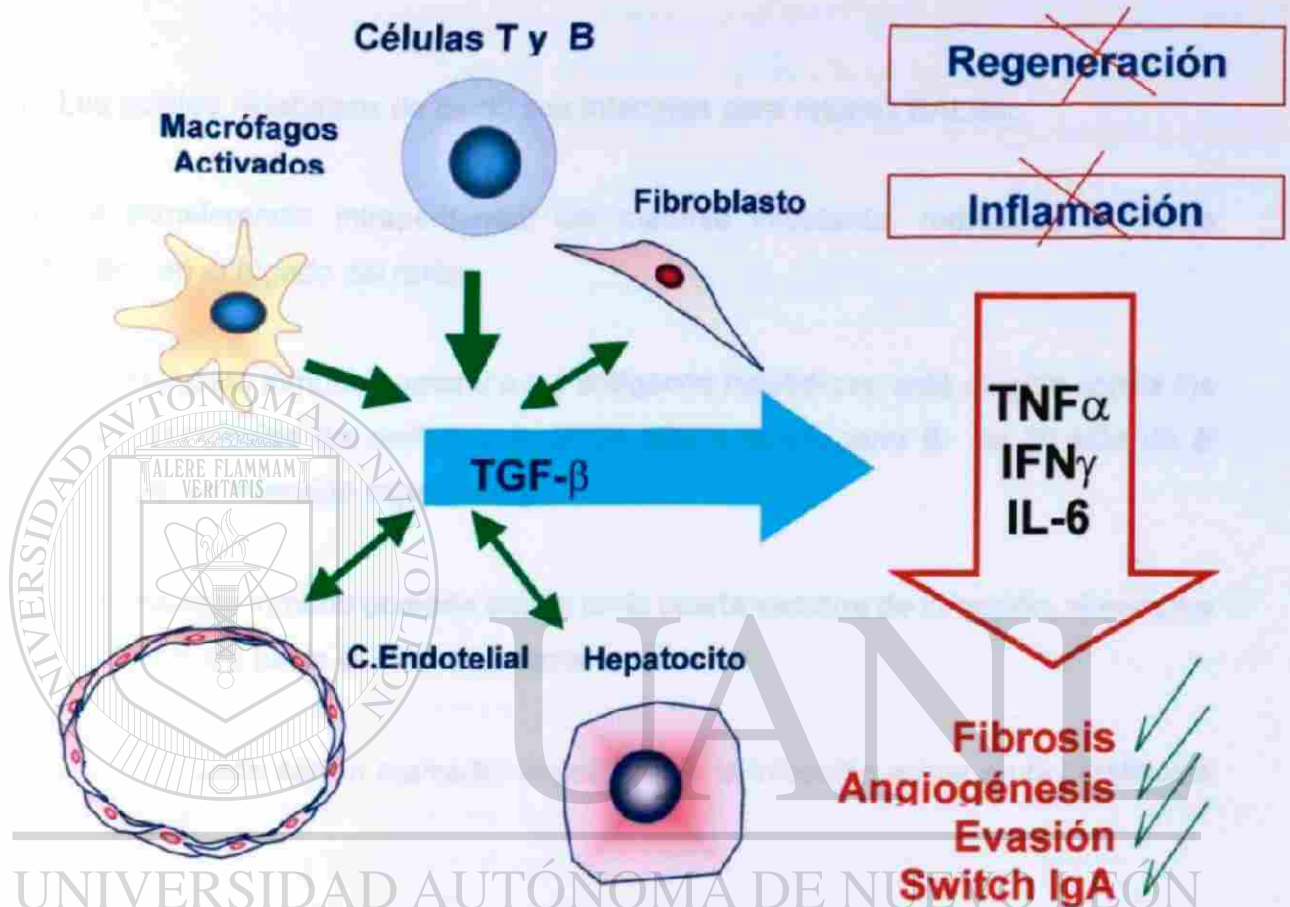
**Figura 19).** Representación gráfica de la producción de citocinas inflamatorias por las células de respuesta inmune al entrar el parásito en el organismo, y la probable modulación de la expresión de estas células al entrar el parásito en el organismo, y la probable modulación de la expresión de estas células al entrar las toxinas en contacto con los tejidos y así establecerse el parásito.

La citocina multifuncional TGF $\beta$ , posee una amplia variedad de efectos inmunológicos incluyendo la supresión de respuesta a linfocitos contra antígenos y mitógenos; TGF $\alpha$  puede inducir inmunosupresión y evasión del parásito a la respuesta inmune por inhibición de IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  (Holter W, *et al.* 1994). Estos mecanismos se han observado en otras enfermedades tales como leishmaniasis (Li J., Hunter C.A., & Farrell J.P., 1999). Considerando los resultados de este estudio nosotros proponemos que TGF $\beta$  produce inmunosupresión local; como un mecanismo que puede ayudar a difundir *E granulosus* en el hígado.

Tomando en cuenta los conocimientos del presente estudio, el TGF- $\beta$  y la IL-10 pueden inducir inmunosupresión *in situ*; este mecanismo puede ayudar a la implantación en el hígado de *E. granulosus*, adicionalmente la TGF- $\beta$  regula transcripcionalmente el switch a IgA (Park S.R., *et al* 2001), en nuestro estudio, anticuerpos anti-*E. granulosus* IgA fueron detectados 8 semanas después de la inoculación, nuestros hallazgos pueden sugerir que TGF- $\beta$  regula la respuesta inmune mediada por IgA en la enfermedad hidatídica (Figura 20).

Finalmente, los resultados presentes sugieren que *E granulosus* puede inducir<sup>®</sup> inmunosupresión *in situ*, por un mecanismo probablemente mediado por IL-10 y TGF $\alpha$  y con estas bases podemos inferir, que el parásito escapa al daño de la respuesta inmune celular del huésped. Estas son algunas posibilidades que pueden explicar la permanencia crónica del parásito en el organismo.

## CONCLUSIONES



**Figura 20).** Representación gráfica de la producción de las diversas células, que producen TGF $\beta$  y la probable inferencia, en la modulación de la baja producción de citocinas inflamatorias, lo que facilita la implantación del parásito por largos periodos en el huésped.



# CONCLUSIONES

- 1). Los quistes hidatídicos de cerdo son infectivos para ratones BALB/c.
- 2). La transferencia intraperitoneal del material infectante, reproduce el quiste hidatídico en el hígado del ratón.
- 3). La respuesta inmune humoral a los antígenos hidatídicos, está dirigida contra los epítopes principales del antígeno A de 61 kDa y el antígeno B de 30 kDa de *E. granulosus* en infección experimental.
- 4). La respuesta inmune primaria ocurre en la cuarta semana de infección, el switch a IgG e IgA ocurre hacia la octava semana.
- 5). El Ag A puede ser un marcador específico de la infección activa en la hidatidosis experimental.

---

- 6). El implante del quiste de *E. granulosus* parece bloquear la transcripción de citocinas inflamatorias IL-6 y TNF $\alpha$  en hígado anulando la respuesta inmune local.
- 7). Son diversos los mecanismos que pueden mediar el escape del parásito como el que controla la respuesta de los genes de citocinas, los que son probablemente Inhibidos por productos del parásito .
- 8). La supresión de citocinas inflamatorias parece estar regulada por el TGF $\beta$  y por la IL-10.

## BIBLIOGRAFIA

Aarden L., Landrop P., De Groot E. A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes. Aceti A., Pennica A., Teggi A., y col. (1993) IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. *Int. Arch. Allergy Immunol* **1985**, 102:304-51.

Abid-A, A-Khayati and N-Zargouni. Hydatid cyst of the heart and pericardium. *Int J Cardiol* **1991**, 32: 108-9.

Abo-Shehada-M. N. Some observations on hydatidosis in Jordan. *J Helminthol* **1993**, 167:248-52.

Abu-Hasan N., Daragmeh M., Adwan K, Al-Qaoud K, Abdel-Hafez SK. Human cystic echinococcosis in the West Bank of Palestine: surgical incidence and seroepidemiological study. *Parasitol Res.* **2002**, 88; 107-12.

Aceti A., Pennica A., Teggi A., y col. IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. *Int. Arch. Allergy Immunol* **1993**, 102:304-51.

Acheson D.W., Keush G.T., Lightowers M., Donohue-Rolfe A. Enzyme linked immunosorbent assay for shiga toxin and shiga-like toxin II using P1 glycoprotein from hydatid cysts. *J Infect Dis* **1990**, 161:134-37.

Afferri C., Pini C., Misiti-Dorello P. y col. Detection of specific IgE antibodies in sera from patients with hydatidosis. *Clin Exp Immunol* **1984**, 55:587-92.

Allan D., Jenkins P., Connor R.J., and Dixon J.B. A study of immunoregulation of BALB/c mice by *Echinococcus granulosus* equinus during prolonged infection. *Parasit Immunol* **1981**, 3: 137- 42.



Annen J.M., Köller P., and Eckerl J. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* Cyst Fluid in Vitro. *Z Parasitenkd* 1981, 65:79-88.

Arme C., and Bridges J.F. *Echinococcus granulosus equinus*: An Richards K.S ultrastructural study of the laminated layer including changes on incubating cysts in various media. *Parasitol* 1983, 86:399-405.

Baldock F.C., Thompson R.C.A., and Kumaratilake L. M. Strain identification of *Echinococcus granulosus* in determining origin of infection in a case of human hydatid disease in Australia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1985, 79:238-41.

Bout D., Fruit J., and Capron A. Purification d' un antigène de liquide hydatique. *Ann Immunol* 1974, 125:775-88.

Bresson-Hadni S., Vuitton D.A., Lenys D., Liance M., Racadot E., and Miguet J.P. Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. I. Lymphocyte reactivity to *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol* 1989, 78:61-6.

Capron A., Biguet J., Vernes A., and Afchain D. Estructure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Pathol Biol* 1968, 16: 121-38.

Capron A., Vernes A., and Biguet J. Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. *Les Journées Lyonnaises d'Hydatidologie. (SIMEP Ed.)* 1967, Lyon 27-40.

Careaga R. Un caso de hidatidosis del útero. *Gac Med* 1984, XXXI:35-51.

Carmona C., Perdomo R., Carbo A., Alvarez C., Monti J., R Grauert., Stern D., Perera Lloyd S., Bazini R., Gemmell M.A, and Yarzabal L. Risk factors associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: Results of mass screening study using ultrasounund and serology. *Am J Trop Med Hyg.* 1999, 58:599-615.

Castrodale L.J., Beller M., Wilson J.F., Shantz P.M., MCManus L.Z., Fallico F.G., and Sacco F.D. Two atypical cases of cystic Echinococcosis (*Echinococcus granulosus*) in Alaska, 1999. *Am J Trop Med Hyg.* **2002**, *66*:325-27.

Cesbron J.Y., Capron M. et Capron A. Foie et voies biliaires, Le diagnostic immunologique de l'hydatidose humaine. *Gastroenterol Clin Biol* **1986**, *10*:15-8.

Chantry D., Turner E., Abney E., and Feldman M. Modulation of cytokine production by TGF- $\beta$ . *J Immunol* **1989**, *142*:4295-300.

Cheng C. Thomas. Cestoda las verdaderas tenias. *Echinococcus granulosus*. En *Parasitología General*. (Ed. A., C. Madrid, España). **1978**. pp: 474-542.

Glutterbuck E., Hirst E., and Sanderson C. Human interleukin 5 (IL-5) regulates T production of eosinophils in human bone marrow cultures: Comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* **1989**, *77*:1504-12.

Cochet O., Teillaut J. L., Sautes C. *Immunological Techniques Made Easy*; Edit. WILEY **1998**. England. pp:160-74.

Cox D.A., Dixon J.B., and Marshall-Clarke S. Transformation induced by *Echinococcus granulosus* protoescoleces in unprimed murine spleen cells: identity and MHC restriction of participating cell types. *Immunol* **1989**, *57*:461-66.

Cox D.A., Marshall-Clarke, and Dixon J.B. Activation of normal murine B cell by *Echinococcus granulosus*. *Immunol* **1989**, *67*:16-20.

Cox F.E.G., and Liew F.Y. T cell subsets and cytokines in parasite infections. *Parasitol Today* **1992**, *8*:372-74.

Craig P.S., Liu D., and Ding Z. Hydatid disease in China. *Prasitol Today*. **1991**, *7*:46-50.

Crellin J.R., Andersen F.C., and Schantz P.M. Possible factors influencing distribution and prevalence of *Echinococcus granulosus* in Utah. *Am J Epidemiol* **1982**, 116:163-74.

Dai W.J., and Gottstein B. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. *Immunol* **1999**, 97:107-16.

Daly, J.J., MacDaniel, R.C, and Husted G.S. Unilocular hydatid cyst disease in the mid-South. *JAMA*. **1984**. 251;932-3.

Dematteis S, Baz A, Rottemberg M, Fernández C, Orn A, Nieto A. antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoescoloces. *Parasite Immunol*. **1999**. 21;19-26.

Dematteis S, Piroto F., Nieto A., Orn A., and Baz A. Modulation of the cellular immune response by carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoescoloces in infected or immunized BALB/c mice. *Prasite Immunol* **2001**, 23:1-9.

Dempster R.P., Berridge M.V., Harrison G.B., and Heath D. D. *Echinococcus granulosus*: Development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *Int J Parasitol* **1991**, 21:549-54.

Dreweck C.M., Luder C.G., Soboslay P.T., Kern P., subclass-specific serological reactivity and IgG4-specific antigen recognition in human Echinococcosis. *Trop. Med int health*. **1997** ; 2: 779-87.

Eckert J., and Thompson R.C.A. *Echinococcus* strains in Europe: a review. *Trop Med and Parasitol* **1988**, 39:1-8.

Eckert J., Thompson R.C.A., Lymbery A. J., Pawlowski Z. S., Gottstein B., and Morgan U.M. Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* **1993**, 79:42-8.

Eckert J., Thompson R.C.A., Michael S.A., Kumaratilake L.M. and El-Sawah H. M. *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dogs and parasite morphology. *Parasitol Res* **1989**, 75:536.

Farmer M. P., Chatterley S., and Spier N. Echinococcal Cyst of the Liver: Diagnosis and Surgical Management. *Ann Clin Lab Scien* **1990**, 20:385-91.

Faust E.C., Russell P.F., and Jung R.C. Céstodos ciclofilídeos del hombre. *Echinococcus granulosus*. En Craig y Faust Parasitología Clínica. (Ed. Salvat Barcelona, España) **1975**. pp: 520-58.

Finkelman F.D., Pearce E.J., Urban J.F. Jr. y col. Regulation and biological function of helminthy-induced cytokine responses. *Immunol Today* **1991**, 12:A62-A66.

Flores-Barroeta L. Helmintos de los perros *Canis familiaris* y gatos *Felis catus* en la Ciudad de México. *Anales Esc. Nac. Cien. Biol.* **1955**, VIII:159-202.

Frydman C.P., Raissi S., and Watson C.W. An Unusual Pulmonary and Renal Presentation of Echinococcosis. *Acta Cyt* **1989**, 33:655-58.

Ganguly N.K., Maharan R.C., Wangoo A., Bose S.M., and Dilawari J.B. Potential experimental model of unilocular hydatid disease. *Indian J Med Res* **1986**, 84:210-12.

García A., Denegri M., Ljungstrom I., and Lorca M. Identification of immunodominant antigens by immunotransfer in hydatid fluid. *Bol Chil Parasitol* **1998**, 53:58-64.

Gemmell M.A. Australasian contributions to an understanding of the epidemiology and control of hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus* past, present and future. *Int J Parasit.* **1990**, 20: 431-56.

Gemmell M.A. Australasian contributions to and understanding of the epidemiology and control of hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus* past, present and future. *Int J Parasit* 1990, 20:431-56.

Godot V., Harraga S., Beurton I., Tiberghien P., Sarciron E., Gottstein B., and Vuittron D.A. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. II. Influenced of HLA B8, DR3, DQ\*2 haplotype. *Clin Exp Immunol* 2000, 121:491-98.

Grimm F., Maly F.E., Lü J., and Llano R. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a Standard Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, 5:613-16.

Grove D.I. (1991). *Echinococcus granulosus* and Echinococcosis and hidatyd disease. En: *A History of Human Helminthology*. (Ed. C.A.B. International. U.K.) 1990, pp: 319-51.

Heinzel F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L., and Locksley R.M. Reciprocal expression of interferon  $\gamma$  or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subset. *J Exp Med* 1989, 169:59-62.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Helle M., Boeijs L., and Aarden L.A. IL-6 is an intermediate in IL-1 induced thymocyte proliferation. *J Immunol* 1989, 142:4335-38.

Hobbs R.P., Lymbery A.J.L., and Thompson R.C.A. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian host, and its implications for strain recognition. *Parasitol* 1990, 101:273-81.

Hoffman K.F., McCarty T.C., Segal D.H., Chiamonte M., Hesse M., Davis E.M., Cheever A.W., Meltzer P.S., Morse III H.C., and Wynn T.A. Disease fingerprint with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB J* 2001, 15: 2545-2547.

Holter W., Kathoff F.S., Pickl W.F., Ebner C., Majdic O., Kraft D., and Knapp W. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits IL-4 and INF- $\gamma$  production by stimulated human T cells. *Int Immunol* 1994, 167:469-75.

Hurd H. *Echinococcus granulosus*: a comparison of free amino acid concentration in hydatid fluid from primary and secondary cyst and host plasma. *Parasitol* 1989, 98:135-43.

Janseen D., Rychke P.H., and Osuna A. Dose-dependent effects of hydatid fluid toxins from *Echinococcus granulosus* on mouse peritoneal macrophages. *Folia Parasitol (Praha)* 1993, 40:109-13.

Janssen D., Osuna A., Lasuen J., and Rychke P.H. Comparative cytotoxicity of secondary hydatid cysts, protoscoleces, and in vitro developed microcysts of *Echinococcus granulosus* *J Helminthol* 1992, 66:124-31.

Janssen D., Rueda M.C., Ricke P.H. and Osuna A. Immunomodulation by hydatid cyst fluid toxin (*Echinococcus granulosus*). *Parasite Immunol* 1997, 19:149-60.

Jenkins P., Dixon J.B., Ross G., and Cox D.A. *Echinococcus granulosus*: Changes in the transformational behaviour of murine lymph node cells during early infection. *Ann Trop Med Parasitol* 1986, 80:43-7.

Kagan I.G. and Agosin M. *Echinococcus* antigens. *Bull Wild Health Org* 1968, 39:13-24.

King C.L., and Nutman T.B. IgE and IgG subclasses regulation by IL-4 and INF- $\gamma$  in human helminthes infections. Assessment by B cell precursors frequencies. *J Immunol* 1993, 151:58-65.



Kizaki T., Kobabayashi S., Ogasawara K., Day N.K., Good R.A., and Onoé K. Immune suppression induced by protoescoleces of *Echinococcus multilocularis* in mice. Evidence for the presence of CD8<sup>du1</sup> suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with *E multilocularis*. J Immunol 1991, 147:1659-66.

Kobulej T., Springer J., and Sudi I. Possibilities for eradicating ehcinococcosis in Hungary. Second International Symposium on Echinococcosis, Zurich 1990.

Kortbeek, L.M., Van Knapen, F., Verwey, J. and Polderman, A.M. Incidence of *Echinococcus granulosus* in man in the Netherlands, 1987-1991. Vth European multicollougium of Parasitology, 7-11 september 1992, The Hague. 1993, p.118.

Kubo Y., Yasunaga M., Masuhara M., Nakamura T., and Okita K. Hepatocyte proliferation induced in rats by lead nitrate is suppressed by several tumor necrosis factor alpha inhibitors. Hepatol 1996, 23:104-14.

Kumaratilake L.M., Thompson R.C.A., and Eckert J. *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. Int J Parasitol 1986, 16:529-40.

Kumaratilake L.M Thompson RCA .Hidatidosis/Echinococcosis in Australia. Helminthology Abstracts, series A. 1982, 51: 233-52.

Kumaratilake L.M., and Thompson R.C.A. Morphological Characterization of Australian Strains of *Echinococcus granulosus*. Int J Parasitol 1984, 14:467-77.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nat 1970, 227:680-85.

Lamberti R., Calvo C., pombar A., Gino L., Alvarez E., Aguado C., Larrieu E. Hidatidosis in the province of La Pampa, Argentina, 1998. Bol Chil Parasitol. 1999. 54: 110-2.

Lancer M., Grss U., and Moll H. Mechanisms of Parasite persistence and Immune Evasion. *Parasitol Today* 1997, 13:1-3

Larrieu E., Frider B., Del Carpio M., Salvitti J.C., Mercapide C., Pereyra R., Costa M., Odriozola M., Perez A., Cantón G., and Sustercic J. Asymptomatic carriers of hidatidosis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Rev Pan Sal Publ* 2000, 8:250-56.

Li J., Hunter C.A., and Farrell J.P. Anti-TGF- $\beta$  treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J Immuno* 1999, 162:974-79.

Lucena N.J. Echinococcosis renal bilateral en hombre. *Rev Med Mex* 1935, 15:264.

Macpherson C.N.L. *Echinococcus* infections in wild animals in Africa. In: MacMillan, S. (ed) *Wildlife/Livestock Interfaces on Rangelands*. Inter African Bureau for Animal Resources, Nairobi 1986, 25-53.

Majul E.J. Primary hydatid cyst of the maxillary gland: Case report. *Prensa Med Arg* 1991, 78:51-3.

Martinez C.F., Tavizón G.J.P., Mondragón de la P.M.C. Detección serológica de hidatidosis porcina en Zacatecas, México. *Invest Cient* 1994, 6:3-7.

Martinez M.J.J., Zúñiga A.I., Jaramillo A.C.J., Cardenas L.J. y Navarro F.R. Caracterización epidemiológica de la equinococosis/hidatidosis en Zacatecas, México. *Vet Mex* 1994, 25:231-37.

Matossian R.M., Rickard M.D., and Smyth J.D. Hydatidosis: A global problem of increasing importance. *Bull Health Org* 1977, 55:499-501.

Ming-gian X. Hydatid disease of the lung. *Amer J Surg* 1985, 150: 568-73.

Mondragón C., y Tavizón P. Panorama de la enfermedad hidatídica. Rev Med ISSSTE Zacatecas 1991, 2:7-9.

Mondragón de la P.C., Tavizón G.J.P., Taméz G.R., Herrera E.R., Rodríguez P.C. *Echinococcus granulosus*: Modulación de la respuesta inmune celular local y periférica en hidatidosis experimental. Invest Cient 1993, 1:3-8.

Mondragón de la Peña M.C.. *Echinococcus granulosus*. Determinación de la respuesta inmune celular de los antígenos principales libres y atrapados en liposomas en hidatidosis experimental. Tesis presentada para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 1995.

Navarrete, I., Serrano, F., Perez, E., Brena, M., Morales, I. And Gil, F. Estudy of prevalence of canine echinococcosis in Extremadura: posible influence over ovine production. Arch Hidatid. 1991, 30: 1253-60.

Neghme A., y Silva R. A hidatidose como problema medico, sanitario e social e esboço básico para sua profilaxia. Rev Ass Med Bras .1970, 16:279-86.

Oriol R., Williams J.F., Perez Esandi M. V., and Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hidatid fluid. Am J Trop Med Hyg 1971, 20: 569-74.

Park S.R., Lee J.H., and Kim P.H. Smad 3 and Smad 4 mediate transforming growth factor-B1-induced IgA expression in murine B lymphocytes. Europ J Immunol 2001, 31:1706-15.

Pearlman E., Lass J.H., Bardenstein D.S., Diaconu E., Hazlett F.E., Albright J., Higgins A.W., and Kazura J.W. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cell recruitment and chemokine expression. *J Immunol* **1997**, 158:827-33.

Perdomo R., Alvarez C., and Genniazzi H. Early diagnosis of hydatidosis by ultrasonography. *Lancet* **1988**, i. :244-50.

Playford M.C., and Kamiya M. Immune response to *Echinococcus multilocularis* infection in the mouse model: a review. *Jpn J Vet Res* **1992**, 40:113-30.

Pozzuoli R., Musiani P., Arru E., Patrono C., and Piantelli M. *Echinococcus granulosus*: Evaluation of Purified Antigens Immunoreactivity. *Exp Parasitol* **1974**, 35:52-60.

Rai R.M., Loffreda S., Karp C.L., Yang S.Q., Lin H.Z., and Diehl A.M. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatal* **1997**, 25:889-95.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Rauch R.L. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus granulosus* species. In: Thompson R.C.A. (ed), *The biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. George Allen and Unwin, London. 1986, pp; 44-80.

Rickard M., D., and Lightowers M.W. Immunodiagnosis of Hidatid Disease (Thompson R.C.A. ed.) George Allen and Unwin London 1986, pp: 217-40.

Rigano R., Profumo E., Bruschi F., Azzara A., Ioppolo S., Buttari B., Ortona E., Margutti P., Teggi A. & Siracusano A. (2001). Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* **2001**; 69:288-96.

Rigano R., Profumo E., Di Felice G., Ortona E., Teggi A., and Siracusano A. In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. *Clin Exp Immunol* **1995**, 99:433-39.

Riley E.M., Dixon J.B., Kelly D.F., and Cox D.A. The immune response to *Echinococcus granulosus*: Sequential histological observations of lymphoreticular and connective tissues during early murine infection. *J Comp Path* **1985**, 95:93-104.

Riley F.M., Dixon J.B., Kelly D.F., and Cox D.A. Immune response to *Echinococcus granulosus*: histological and immunocytochemical observations. *Ann Trop Med Parasitol* **1984**, 78:210-12.

Rombert, C. and Trinca, T. Immunodiagnosis of human hydatidosis in Portugal. *Archivos de la Hidatidosis*. **1991**, 30; 993-9.

Sawyer, J.C., Schantz, P.M., Schwabe, C.W. and Newbold, M.W. Identification of transmission foci of hydatid disease in California. *Pub Healt Rep*. **1969**. 84; 531-41.

Schantz P.M. *Echinococcus* in American Indians living in Arizona and New Mexico. A review of recent studies. *Am J Epidemiol* **1977**, 106: 370-79.

Schantz P.M., and Lord R.D. *Echinococcus* in the South American red fox (*Dusicyon culpaeus*) and the European hare (*Lepus europaeus*) in the province of Neuquén, Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* **1972**, 66:479-85.

Shaikenov B.S, Vaganov T.F., and Torgerson P.R. Cystic-Echinococcosis in Kazakhstan: An Emerging Disease since Independence from the Sovietic Union. *Parasitol Today* **1999**, 15 (5): 60-3.

Shalaby M.R., and Amman A.J. Suppression of immune cell function in vitro by recombinant transforming growth factor  $\beta$ . *Cell. Immunol* 1988, 112:281-87.

Shamesh M.A., Craig P., Macpherson C.N.L., Rogan M.T., Gusbi A.M., and Eghtuish E.F. An extensive ultrasound and serologic study to investigate the prevalence of human cystic echinococcosis in northern Libia. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61:462-68.

Sherif S.D. Dar F.K., and Kidwai S.A. Metallic elements in hidatid fluid. *J Helminthol* 1984, 58:335-36.

Sierra J., Oviedo J., Berthier M., and Leiguarda R. Growth rate of secondary hydatid cyst of the brain. *J Neurosurg* 1985, 62:781-82.

Silacci P., Dayer J.M., Desgeorges A., Peter R., Manueddu C., and Guerne P.A. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J Biol Chem* 1998, 273:13525-629.

Siles-Lucas M., Nunes C.P., and Zaha A. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitol* 2001, 122: 281-87.

Smyth J.D. The Biology of the Hydatid Organisms. In *Advances in Parasitology*. (Ed. Ben Dawes. Academic Press: London & New York) 1970, 2: 327-46.

Takayama T., Morelli A.E., Onai N., Hirao M., Matsushima K., Tahara H., and Thompson A.W. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate c-c chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: Impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J Immunol* 2001 166:7136-43.



Tato P., Castro A.M., Rodriguez D., Soto R., Arechavaleta F., and Molinari J.L. Supresion of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res* 1995, 81:181-87.

Tato P., White C.A. Jr., Willms K., Rodriguez D. Solano S., Sepulveda J., Molinari J.L. Immunosupresion an inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA- peptide to implanted *T. solium* metacestode. *Parasitol Res* 1996. 82:590-97.

Tavizón G.J.P, Rivas R.M., Mondragón de la P.M.C., Martínez C.F. y Osegueda B.C. Estudio Morfológico, Bacteriológico e Histológico de la Hidatidosis Hepática Porcina en Cerdos Sacrificados en el Rastro Municipal de Zacatecas Zac. II Convención y Exposición Nacional de Salud Animal. X Reunión Anual de Sanidad Animal 1981, México, D.F.

Tay Z.J., Lara A.R., Velazco C.O., y Gutierrez Q.M. Cisticercosis e Hidatidosis. Hidatidosis. En: *Parasitología Médica*. (Ed. Francisco Mendez Cervantes, México). 1985, XV:215-34.

Thompson R.C A. and L.M. Kumaratilake. Comparative development of Australian strains of *Echinococcus granulosus* in dingoes (*Canis familiaris dingo*) and domestic dogs (*C. f. familiaris* ), with further evidence for the origin of the Australian Sylvatic strain. *Int J Parasitol* 1985, 15:535-42

Thompson R.C.A., and Allsopp C.E. HYDATIDOSIS: Veterinary perspectives and annotated bibliography. C.B.A International Walingford, Oxon OX10 8DE UK 1988.pag 2-16.

Thompson R.C.A., and Lymbery A. J. *Echinococcus* and Hydatid Disease. Chapter One-Ten. UK .(Thompson R.C.A. ed ), CAB International UK 1995. 1-451.

Thompson R.C.A., and Lymbery A.J. The Nature, Extent and Significance of Variation Within the Genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology*. 1988, 27::210-58.

Thompson R.C.A., Nicholas W.L., Howell M.J., and Kumaratilake L.M. *Echinococcus granulosus* in a fox. *Aust Vet J* 1983, 62:200-01.

Torca J., Navarro-Zorraquino M., Lozano R., Larrad L., Salinas J.C., Roman J., and Pastor C. Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clin Exp Immunol* 1996, 106:317-22.

Torgerson P.R., Carmona C, Bonifacio R. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000, 94: 703-13.

Torgerson P R, Dowling P.M and Abo-Shehada M.N. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Part 3: Jordan, a developing country with lower-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001, 95: 595-603.

Torgerson P.R. and Dowling P.M. Estimation the economic effects of cystic echinococcosis. Part 2: an endemic region in the United Kingdom, a wealthy industrialized economy. *Ann Trop Med Parasitol* 2001, 95:177-85.

Torgerson P.R., Shaikenov B.S., Baitursinov K.K., Abdybekova A.M. The emerging epidemic of echinococcosis in Kazakhstan. *Trans R Soc Trop med Hyg* . 2002, 96; 124-8.

Touil-Boukoffa C., Sanceau J., Tayebi B., and Wietzerbin J. Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *J Interferon Cytokine Res* 1997, 17:211-17.

Towbin H.T., Stahelin T., and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocelulose sheets: procedure and some aplications. Proc Natl Acad Sci (USA) 1979, 76:4350-54.

Van Knapen, F., Franchimont, J.H., van der Lugt. and Moolenbeek, J.J. Echinokokkose in Nederland . Nederlands Tijdssherift voor Geneeskunde. 1987, 131, 1168-70.

Van Knapen, F., Verdonk, A.R. and Franchimont, J.H. Echinokokkose in Nederland. Nederlands Tijdssherift voor Geneeskunde. 1982, 126: 1105-6.

Vuitton D.A., Bresson-Hadni S. L., Kaiserlian D., Guerret-hocker S., Bresson J.L., and Guillet M. Celular immune response in Echinococcus multilocularis infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulation in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989, 78:67-74.

Wang A.M., and Mark D.F. Quantitative PCR. In: PCR Protocols. Aguide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Snisky J.J. & Withe T.J. (eds), Acad Press, San Diego, USA 1990, pp: 70-5.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

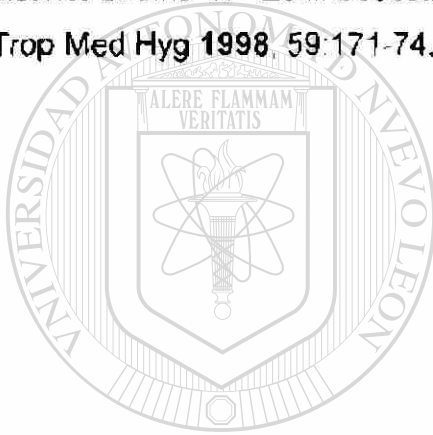
Wattal C. Evaluation of human cellular immune function in echinococcosis. Ind J Med Res. 1990, 91:214-17.

Weber K.S., Grone H.J., Rocken M., Klier C., Gu S., Wank R., Proudfoot A.E., Nelson P.J., and Weber C. Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. Eur J Immunol 2001, 31:2458-66.

Wellinghausen N., Gebert P., and Kern P. Interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. Act Trop 1999, 73:165-74.

Xu Y., Bialik S., Jones B.E., Limuro Y., Kitsis R.N., Srinivasan A., Brenner D.A., and Czaja M.J.  $\text{INF-}\kappa\text{B}$  inactivation converts a hepatocyte cell line TNF- $\alpha$  response from proliferation to apoptosis. *Am J Cell Physiol* **1998**, 1275:1058-66.

Zhang L. Eslami A. Hosseine S.H., and McManus D.P. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by Mitochondrial DNA Markers. *Am Trop Med Hyg* **1998**, 59:171-74.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# ECHINOCOCCUS GRANULOSUS DOWN REGULATES THE HEPATIC EXPRESSION OF INFLAMMATORY CYTOKINES IL-6 AND TNF- $\alpha$ IN BALB/C MICE

MONDRAGÓN-DE-LA-PEÑA C.\*, RAMOS-SOLÍS S.\*, BARBOSA-CISNEROS O.\*, RODRÍGUEZ-PADILLA C.\*\*,  
TAVIZÓN-GARCÍA P.\* & HERRERA-ESPARZA R.\*

## Summary:

Hydatid disease is caused by the metacestode of *Echinococcus granulosus*. Different experimental models have been used to understand hydatid disease. In current studies BALB/c mice were used to evaluate the hepatic response of IL-6 and TNF $\alpha$  triggered by *Echinococcus granulosus*. BALB/c mice were intraperitoneally infected with protoscolices from *E. granulosus*; hydatid cysts appeared on the liver eight weeks after inoculation. The RNA extracted from hepatic sections was used for RT-PCR amplification with primers for IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$  and G $\beta$ PDH. *In situ* cytokine expression was assessed by FISH. Complete parasite cysts on the liver surface were observed 16 weeks after infection; controls were negative. The expression of IL-6 and TNF $\alpha$  was normal at baseline and declined progressively eight weeks after infection; in some animals such expression was abrogated 16 weeks after infection. On the other hand IL-10 and TGF $\beta$  were increased progressively. Controls expressed the cytokines normally. Present results suggest that *E. granulosus* induces a local immunosuppression probably mediated by IL-10 and TGF $\beta$ ; therefore, it seems possible that such a mechanism would assist the parasite in escaping the harmful host cell-mediated response.

**KEY WORDS:** hydatid disease, inflammatory cytokines, IL-6 mRNA, TNF $\alpha$  mRNA.

## Résumé: ECHINOCOCCUS GRANULOSUS DIMINUE L'EXPRESSION HÉPATIQUE DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES IL-6 ET TNF $\alpha$ DE SOURIS BALB/c

L'hydatidose est causée par le métacestode d'*Echinococcus granulosus*. Différents modèles expérimentaux ont été utilisés pour comprendre cette maladie. Nous utilisons le modèle de souris BALB/c pour l'évaluation de la réaction hépatique en IL-6 et TNF $\alpha$  déclenchée par *Echinococcus granulosus*. Les souris ont été infectées en intra-péritonéal avec des protoscolices d'*E. granulosus*. Après 16 semaines, la cavité abdominale a été inspectée afin de repérer le développement possible de kystes hydatidiques dans les tissus grâce à des techniques histologiques. L'ARN total a été extrait de coupes de tissus hépatiques et amplifié par la technique RT-PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques pour IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$  et G $\beta$ PDH. L'expression de cytokines a été mesurée par la technique de FISH avec sondes IL-6, TNF $\alpha$  et G $\beta$ PDH. Les kystes du parasite ont été vus à la surface hépatique 16 semaines après l'infection, tous les contrôles étant négatifs. Les cytokines inflammatoires sont apparues normalement chez les animaux non infectés, mais l'expression de IL-6 et de TNF $\alpha$  a progressivement décliné après la huitième semaine chez les animaux infectés. Chez un certain nombre de ceux-ci, les facteurs IL-6 et TNF $\alpha$  ont disparu dès la seizième semaine. Par contre, la présence de IL-10 et de TGF $\beta$  a progressivement augmenté. Nos résultats suggèrent que *E. granulosus* induit une immunosuppression locale par le biais de l'IL-10 et du TGF $\beta$ ; il est possible que par ce mécanisme, le parasite se protège des réponses immunitaires de l'organisme qui l'héberge.

**MOTS CLÉS:** hydatidose, cytokines inflammatoires, IL-6 mRNA, TNF $\alpha$  mRNA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Hydatidosis is a parasitic disease caused by the metacestode (protoscolices) from *Echinococcus* (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* and *E. vogeli*), which has a world wide distribution. Infection depends on sanitary conditions in slaughters. Animal disease produces economic losses by the destruction of infected organs from affected livestock (Torgerson & Dowling, 2001; Shamesh *et al.*, 1999; Carmona *et al.*, 1999). In México, *E. granulosus*

affects the porcine species and eventually human beings (Mondragón & Tavizón, 1991).

Studies in animals demonstrated: first a MHC (major histocompatibility complex) mediated immune response against a broad range of hydatid antigens (Godot *et al.*, 2000); second a cytokine mediated granulomatous reaction in different organs such as liver, lungs and other tissues. The role of cytokines has been partially studied. For example, the Th2 cytokine profile is induced by carbohydrate moieties from *E. granulosus*. Such moieties are used by the parasite to immunosuppress host and spread locally. This mechanism would maintain the infection (Dacmetsis *et al.*, 2001).

The parasite goes through antigenic variation by the cytokine effect, thus their virulence, infectivity and adaptation is modified (Damian, 1997). Although

\* Centro de Biología Experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas.

\*\* Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Correspondence: Rafael Herrera-Esparza, Chapinque 506, Col. Lomas de la Soledad, Zacatecas, Zac. 98040, México. Fax: 52 (492) 922 6070. E-mail: herrerar@cantera.reduaz.mx

inflammatory cytokines would be increased in patient's sera with hepatic hydatidosis, a rapid decline after surgical removal is observed; in contrast, other patients show a decrease during the late phase of hydatidosis. The evident discrepancy between cytokine variations was elucidated by Dai & Gottstein (1999), who found in a murine model, normal cytokine level transcripts during early stages of infection; nevertheless they were down-regulated later by a nitric oxide-dependent mechanism, suggesting that the inflammatory cytokine profiles depend on the disease stage, in consequence Th1 cytokines seems to play a possible role against *E. granulosus* (Touil-Boukoffa *et al.*, 1991).

Our studies attempt to define the role of major inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-6 by implanting *E. granulosus* on murine liver.

## MATERIAL AND METHODS

### PROTOSCOLECES ISOLATION

Hydatid cysts from porcine liver were obtained by dissection. Tissues were extensively washed with PBS, fluid was aseptically collected and protoscoleces were adjusted to 2000/dose in DMEM with antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 200  $\mu$ g/ml).

### EXPERIMENTAL INFECTIONS

BALB/c mice (n = 25), were intraperitoneally infected with 2.000 protoscoleces using an insulin syringe/21 mm needle, in a 200 ml volume. Five animals/week were sacrificed at the 0, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> weeks. Livers were examined and processed for histology, *in situ* hybridization and the RNA was extracted for RT-PCR amplification.

### REVERSE-TRANSCRIPTION/POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Total RNA was extracted from several 4  $\mu$ m liver sections; tissue was taken near or distant to the parasite implant. Control biopsies from healthy animals were taken from the anterior surface of the liver. RNA extraction was carried out by acid guanidium thiocyanate phenol/chloroform method (TRIZOL, GIBCO-BRL). RNA was measured at 260 nm by OD. For cDNA synthesis, 250 ng of the total RNA was incubated with 200  $\mu$ M dNTP and 0.7  $\mu$ M of the backward primer, mixed with 5 U/20  $\mu$ l of rRth/DNA polymerase (Gene Amp<sup>TM</sup> PCR system 9600). The reverse transcription was performed at 70 $^{\circ}$ C for 10 min; the reaction was stopped by cooling on an ice head. After reverse transcription, amplification of TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, TGF $\beta$  and G<sub>3</sub>PDH cDNAs was carried out by PCR by addi-

tion of 0.15  $\mu$ M of the forward primer. The reaction tubes containing 50  $\mu$ l of sample mixture were amplified in a thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR system 2400), using 30 cycles under the following conditions: 94 $^{\circ}$ C for two minutes, 48 $^{\circ}$ C for two minutes and 72 $^{\circ}$ C for 1.4 min. At the end of the PCR reaction, the samples were electrophoresed in 0.8 % agarose containing 0.5 mg/ml of ethidium bromide. PCR products were observed under UV light (Wang & Mark, 1990). An electrophoresis documentation and analysis system 120 by Kodak was used to measure the relative cytokine transcript levels by comparing the cytokine ratio: G<sub>3</sub>PDH densitometric units for infected and non-infected animals. All controls and examined transcripts with densitometric values more than zero for calculating means. Significant differences between samples were determined by Student-t Test by Number Cruncher Statistical Systems NCSS program.

### OLIGONUCLEOTIDES

The following oligonucleotides were used in PCR: IL-6 forward 5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T-3', backward 5'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC-3'. TNF $\alpha$  forward 5'-TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC-3', backward 5'-GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG-3', IL-10 forward 5'-CTG GAA AGA CCA AGG TGT CTA C-3', backward 5'-GAG CTG CTG CAG GAA TGA TGA-3' (Galdiero *et al.*, 1999). TGF $\beta$  forward 5'-TCA CCC GCG TGC TAA TGG TGG ACC GC-3', backward 5'-ACA CCT TCC ATT CTC TTG AGC TGG G-3' (McGaha *et al.*, 2001) and G<sub>3</sub>PDH (house keeper gene) forward 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTC GC-3' and backward 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (Clontech).

### FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH)

Cytokines and the house-keeping mRNAs were detected in mouse liver using cDNA probes prepared by PCR as follows; a mouse library constructed in a gt11 lambda phage (Clontech, Palo Alto CA) and specific primers, were used for cDNA amplification by thermocycler, and PCR products were internally labelled with Fluoro-Green (Oligo colour kit RPN 3400, Amersham) as previously described (Fraire-Velazquez *et al.*, 1999). Tissue sections were pre-hybridized with 0.02 N HCl, permeabilized with 0.01 % Triton X-100/PBS. Fluorescent probes were adjusted to 50 ng/ml of hybridization buffer/formamin (1:1), applied on tissues and incubated at 90 $^{\circ}$ C for three minutes, then hybridized at 37 $^{\circ}$ C for two hours, the slides were finally mounted and evaluated under epifluorescence microscopy (B-MAX 40 Olympus). Images were processed using the NIH 3 image program.



## RESULTS

### ANIMAL INFECTIONS

Hydatid cysts were macroscopically observed on the liver surface eight weeks after inoculation. By the 16<sup>th</sup> week well developed cystic structures were identified; frequently two-four cysts were clumped. By microscopy, a discrete inflammatory reaction by mononuclear cells and macrophages infiltrating the hepatic tissue was observed one month after infection; the cells were organized in a granuloma. Two months after infection, a cyst with an adventitial and an incipient germinal layer was implanted along hepatic tissue. After three months, the cysts exhibited the parasite laminar and germinal membranes and the host adventitial membrane. Four months after infection, clusters of protoscoleces were evident in the germinal layer (Fig. 1). Additionally, 16 weeks after inoculation, the inflammatory reaction along implant area was decreased.

### INFLAMMATORY CYTOKINES ARE EXPRESSED IN THE LIVER

All samples were normalised with the G<sub>3</sub>PDH controls. Cytokine genes were normally expressed in non-infected animals; such expression was used for baseline values. Eight weeks after infection, the IL-6 and TNF $\alpha$  expression decreased progressively near of parasite implant. Some animals abrogated the hepatic IL-6 and TNF $\alpha$  transcription 16 weeks after infection. In sharp contrast, a progressive increase of IL-10 and TGF $\beta$  was observed. On the other hand, the hepatic expression of all cytokines from a remote area of the cyst implant behaved in a similar manner to the controls. These data suggest that the parasite implant

down-regulates the inflammatory cytokines (Fig. 3 and Table I).

### DOWN-REGULATION OF IL-6 AND TNF $\alpha$ DEPENDS ON PARASITE IMPLANT

To answer the question whether down-regulation was local or generalized throughout the liver, we next examined by FISH the differences in cytokine expression between sites close or distant from the cyst implant. At baseline, the mRNAs from IL-6 and TNF $\alpha$  were broadly detected at distant sites of the cysts; however, a remarkable decrease of these mRNA around the cyst was observed eight weeks after infection. Furthermore, the transcription was abrogated near to the implant area 16 weeks after infection. On the other hand, IL-10 and TGF $\beta$  were positive in the cyst implantation area. Non-involved tissues were faintly positive for both IL-6 and TNF $\alpha$ , while IL-10 and TGF $\beta$  had normal expressions. The G<sub>3</sub>PDH house-keeping gene was positive and behaved similarity in all the tissues (Table II and Fig. 2).

## DISCUSSION

The present studies were carried out to determine whether hepatic implantation of *E. granulosus* modifies *in situ* the TNF $\alpha$  and IL-6 expression. The main results of the current investigation indicate that inflammatory cytokines are down-regulated in the liver by *E. granulosus*; in theory, the priming effect of Th<sub>2</sub> cytokines such as IL-10 would contribute to this reduction. The presence of *E. granulosus* in the liver would elicit hepatocyte regeneration with a subsequent increase of IL-10; such an increase would shut-down the TNF $\alpha$  transcription (Rai *et al.*, 1997). Based on pre-

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cytokine	Base line	Week 4	Week 8	Week 12	Week 16
G <sub>3</sub> PDH	393 ± 13	377 ± 12	434 ± 36	309 ± 49	309 ± 55
IL-6	373 ± 9.6	367 ± 6.9	343 ± 6.4	216 ± 22.6	4.4 ± 3.0*
TNF $\alpha$	373 ± 4.1	256 ± 15	303 ± 46	16.6 ± 12	1.8 ± 5.0*
IL-10	337 ± 4.5	345 ± 33	344 ± 8.8	374 ± 5.8*	370 ± 8.8*
TGF $\beta$	327 ± 8.0	353 ± 5.6	314 ± 10	355 ± 7.2*	467 ± 8.4*

\*Significant differences with G<sub>3</sub>PDH by Student t-Test.

Table I. - Cytokine expression in liver by RT-PCR.

Weeks of infection	IL-6 involved	IL-6 non-involved	TNF $\alpha$ involved	TNF $\alpha$ non-involved	IL-10 involved	IL-10 non-involved	TGF $\beta$ involved	TGF $\beta$ non-involved	G <sub>3</sub> PDH involved	G <sub>3</sub> PDH non-involved
0	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Faint	Positive	Faint	Positive	Positive
16	Negative	Faint	Negative	Faint	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive

Table II. - Cytokine expression in involved and non-involved hepatic tissue (FISH)

Fig. 1. - A. Proto-scolecex from *E. granulosis* showing their rostellum. B. Mouse liver, one month after inoculation showing a discrete inflammatory reaction by mononuclear cells and macrophages infiltrating the hepatic tissue. Cells were organized forming a granuloma. C. Two months after infection, an incipient cyst with adventitial and germinal layer. D. Three months after infection, the cysts exhibited the parasite laminar and germinal membranes and the host adventitial layer. E. Four months after infection, the germinal layer appeared with clusters of proto-scolecex.

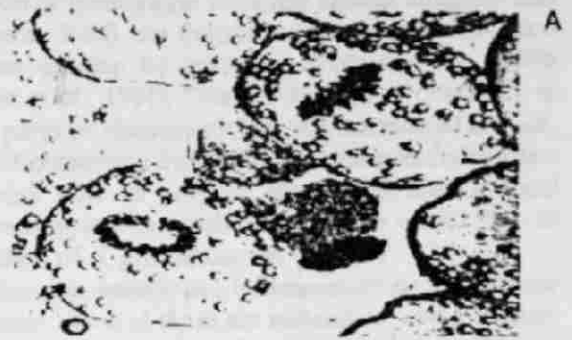
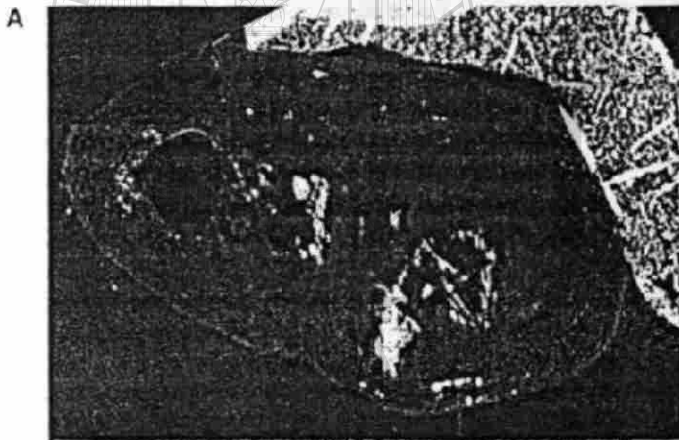


Fig. 2. - FISH A. Representative mouse liver section *in situ* hybridized with DNA probes showing absence of mTNF $\alpha$  around the cyst of *E. granulosis* 16 weeks after inoculation. B. Additionally another section stained with H & E shows a poor inflammatory reaction along implant area.



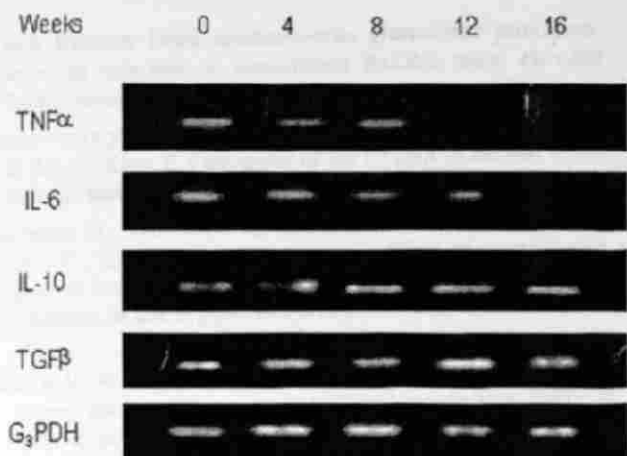


Fig. 6. – Agarose gel electrophoresis with the cytokine RT-PCR amplification products. In the bottom the G3PDH house keeping gene, above a representative panel of cytokines showing a progressive down-regulation of TNF $\alpha$  and IL-6 and up-regulation of IL-10 and TGF $\beta$ .

sent results, we infer that IL-10 and TGF $\beta$  down-regulate TNF $\alpha$  and IL-6 during the late phase of the disease. A inhibitory signaling pathway induced by the IL-10 was previously reported in alveolar and unilocular echinococcosis (Wellinghausen *et al.*, 1999; Dematteis *et al.*, 2001). IL-10 produces a lower degree of immunosuppression in unilocular disease that is more localised, in contrast to alveolar echinococcosis where the immunosuppression and the metacestode growth is higher and depends on a 14-3-3 protein which has an effect of tumor like growth factor (Sales-Lucas *et al.*, 2001).

The host-parasite relationship means not only host-cytokines; it also means parasite hepatotoxins that would induce hepatocyte proliferation or apoptosis (Kubo *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998). The P1gp hepatotoxins are capable of decreasing the transcription of IL-6 and TNF $\alpha$  and the expression of CD4 and CD8 in thymocytes. P1gp decreases the metabolic activity of peritoneal macrophages and Kupffer cells. As result, this TNF $\alpha$  source is shut down; such decrease would result in a local immunosuppression (Acheson *et al.*, 1990; Janssen *et al.*, 1992, 1993, 1997). The hydatid antigen B would induce immunosuppression by eliciting a non-protective Th2 response (IL-4 and IL-13). Additionally, the antigen B inhibits the PMN chemotaxis. This effect is neither due to cytoskeleton impairment, nor to toxic effect (Rigano *et al.*, 2001). The nature of such inhibition is not yet determined. However, it is possible that IL-4, IL-10 and IL-13 would affect the chemotaxis, by reduction of certain chemokines (Pearlman *et al.*, 1997; Takayama *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001).

The multifunctional cytokine TGF $\beta$ , possesses a wide variety of immunological effects including the sup-

pression of lymphocyte response against antigens and mitogens; TGF $\beta$  can induce immunosuppression and parasite evasion by inhibiting IFN $\gamma$  and the TNF $\alpha$  (Holter *et al.*, 1994). This mechanism is observed in other parasitic diseases such as leishmaniasis (Li *et al.*, 1999). Considering the findings of the present studies, we were able to propose that TGF $\beta$  induce local immunosuppression; such a mechanism would help to spreading of *E. granulosus* on the liver.

Parasites can induce pro-inflammatory or pro-fibrotic cytokines, some of them are redundant, and in consequence their final effect depends on distinct disease states. It has been shown by DNA micro arrays that the cytokine profile is modified depending on evolution of infection (Hofman *et al.*, 2001); this notion is valid in the majority of parasitic diseases. Our studies agree with this concept.

Finally, our results suggest that *E. granulosus* would induce *in situ* immunosuppression. Probably such a mechanism is mediated by IL-10 and TGF $\beta$  and would support the hypothesis that the parasite escapes the harmful host cell-mediated response.

## ACKNOWLEDGEMENTS

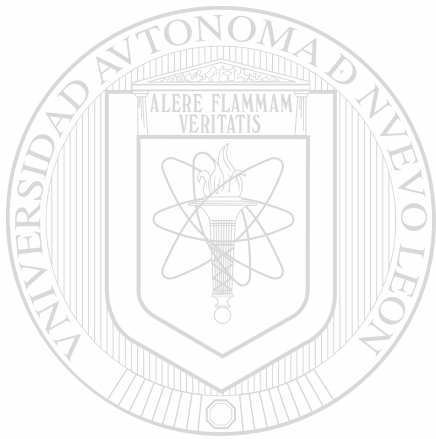
This paper is part of the Doctoral thesis from Carmen Mondragón-de-la-Peña who was sponsored by: the Universidad Autónoma de Zacatecas, CONACYT and PAICYT. This project was partially supported by the CONACYT grant 1877 (from R. Herrera).

## REFERENCES

- ACHESON D.W., KEISH G.T., LIGHTOWLERS M. & DONOHUE ROLFE A. Enzyme linked-immunosorbent assay for shiga toxin and shiga-like toxin II using P1 glycoprotein from hydatid cysts. *Journal Infectious Diseases*, 1990, 161, 134-137.
- CARMONA C., PERDOMO R., CARBO A., ALVAREZ C., MONTI J., GRAUERT R., STERN D., PERERA G., LLOYD S., BAZINI R., GEMMELL M.A. & YARZABAL L. Risk factors associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: results of mass screening study using ultrasound and serology. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 1999, 58, 599-615.
- DAI W.J. & GOTTSTEIN B. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. *Immunology*, 1999, 97, 107-116.
- DAMIAN R.T. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology*, 1997, 115 (Suppl), 169-175.
- DEMATTEIS S., PIROTTA F., NIETO A., ORN A. & BAZ A. Modulation of the cellular immune response by carbohydrate

- rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoescolices in infected or immunized BALB/c mice. *Parasite Immunology*, 2001, 23, 1-9.
- FRAIRE-VELAZQUEZ S., HERRERA-ESPARZA R., VILLALOBOS HURTADO R. & AVALOS-DIAZ E. Ontogeny of Ro hYRNA in human heart. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1999, 28, 100-105.
- GALDIERO M., MARCATI A., CIPOLLARO L., NUZZO I., BENTIVOGLIO C., GALDIERO M. & ROMANO C. Effect of transforming growth factor b on experimental *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infection and Immunity*, 1999, 67, 1432-38.
- GODOT V., HARRAGA S., BEURTON I., TIBERGHEN P., SARGIRON E., GOTTSTEIN B. & VUITTRON D.A. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. II. Influence of HLA B8, DR3, DQ2 haplotype. *Clinical and Experimental Immunology*, 2000, 121, 491-498.
- HOFFMAN K.F., MCCARTY T.C., SEGAL D.H., CHIAMONTE M., HESSE M., DAVIS E.M., CHEEVER A.W., MELTZER P.S., MORSE III H.C. & WYNN T.A. Disease fingerprint with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB Journal*, 2001, 15, 2545-2547.
- HOLTER W., KATHOFF F.S., PEKE W.F., EBNER C., MAJDIC O., KRAFT D. & KNAPP W. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits IL-4 and INF- $\gamma$  production by stimulated human T cells. *International Immunology*, 1994, 167, 469-475.
- JANSEN D., OSUNA A., LAZUEN J. & RYCKE P.H. Comparative cytotoxicity of secondary hydatid cysts, protoscolices, and *in vitro* developed microcysts of *Echinococcus granulosus*. *Journal of Helminthology*, 1992, 66, 124-131.
- JANSEN D., RUEDA M.C., RYCKE P.H. & OSUNA A. Immunomodulation by hydatid cyst fluid toxin (*Echinococcus granulosus*). *Parasite Immunology*, 1997, 19, 149-160.
- JANSEN D., RYCKE P.H. & OSUNA A. Dose-dependent effects of hydatid fluid toxins from *Echinococcus granulosus* on mouse peritoneal macrophages. *Folia Parasitologica (Prava)*, 1993, 40, 109-113.
- KUBO Y., YASUNAGA M., MASUHARA M., NAKAMURA T. & OKITA K. Hepatocyte proliferation induced in rats by lead nitrate is suppressed by several tumor necrosis factor alpha inhibitors. *Hepatology*, 1996, 23, 104-114.
- LI J., HUNTER C.A. & FARRELL J.P. Anti-TGF- $\beta$  treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *Journal of Immunology*, 1999, 162, 974-979.
- MCGAHA T., SAITO S., PHELPS R.G., GORDON R., NOBEN-TIALITH N., PAUL W.E. & BONA C. Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4Ra and transforming growth factor-b genes. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, 116, 136-143.
- MONDRAGON-DE-LA-PEÑA M.C. & TAVIZÓN J.P. Panorama de la Enfermedad Hidatídica. *Revista Médica del ISSSTE-ZAC*, 1991, 2, 7-9.
- PEARLMAN E., LASS J.H., BARDENSTEIN D.S., DIACONE E., HAZLETT F.E., ALBRIGHT J., HIGGINS A.W. & KAZURA J.W. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cell recruitment and chemokine expression. *Journal of Immunology*, 1997, 158, 827-833.
- RAI R.M., LOFFREDA S., KARP C.L., YANG S.Q., LIN H.Z. & DIEHL A.M. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology*, 1997, 25, 889-895.
- RIGANO R., PROFUMO E., BRUSCHI F., AZZARA A., IOPPOLO S., BUTTARI B., ORTONA E., MARGUTTI P., TEGGI A. & SIRACUSANO A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infection and Immunity*, 2001, 69, 288-296.
- SHAMESH M.A., CRAIG P., MACPHERSON C.N.L., ROGAN M.T., GUSBI A.M. & ECHTUSH E.F. An extensive ultrasound and serologic study to investigate the prevalence of human cystic echinococcosis in northern Libya. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 1999, 61, 462-468.
- SILES-LUCAS M., NUNES C.P. & ZAHA A. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology*, 2001, 122, 281-287.
- TAKAYAMA T., MORELLI A.E., ONAI N., HIRAO M., MATSUSHIMA K., TAHARA H. & THOMPSON A.W. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate e-c chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: Impact on chemotactic responses and *in vivo* homing ability. *Journal of Immunology*, 2001, 166, 7136-7143.
- TONGERSON P.R. & DOWLING P.M. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Part 2: an endemic region in the United Kingdom, a wealthy industrialized economy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2001, 95, 177-185.
- TOUL-BOUKOFFA G., SANCEAU J., TAYEBI B. & WIETZERBIN J. Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1997, 17, 211-217.
- WANG A.M. & MARK D.F. Quantitative PCR. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Snisky J.J. & Withe T.J. (eds). Academic Press, San Diego, USA, 1990, 70-75.
- WEBER K.S., GRONE H.J., ROCKEN M., KLIER C., GU S., WANK R., PROUDFOOT A.E., NELSON P.J. & WEBER C. Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. *European Journal of Immunology*, 2001, 31, 2458-2466.
- WELLINGHAUSEN N., GEBERT P. & KERN P. Interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. *Acta Tropica*, 1999, 73, 165-174.
- XU Y., BIALIK S., JONES B.E., IMUIRO Y., KITSIS R.N., SRINIVASAN A., BRENNER D.A. & CZAJA M.J. NF- $\kappa$ B inactivation converts a hepatocyte cell line TNF- $\alpha$  response from proliferation to apoptosis. *American Journal of Cell Physiology*, 1998, 175, 1058-1066.

Reçu le 7 juillet 2000  
 Accepté le 27 août 2002



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





