

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

TD
RC184
.T6
M65
2003
c.1

2003



1080124473

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



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

Por

MARÍA DEL CARMEN MONDRAGÓN DE LA PEÑA

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

Enero del 2003



TD
RC184
.TL
M65
2003



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

Aprobación de Tesis:



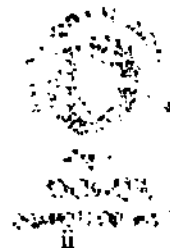
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Directora de Tesis



Dr. Rafael Herrera Esparza
Co-Director de Tesis



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

COMITÉ DE TESIS

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

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.

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

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.**

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.

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.

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

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 α , IL-10, TGF β 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 α , 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 β , 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 β ; 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 α , IL-10, TGF β , 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 α 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 β 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 β ; 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 4th and 8th 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.