

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 metacéstodo 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.

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 DI, 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; Shameesh 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 equinococosis 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, cuyos, 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).

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 varia 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^{as} 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 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 céstodo 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)

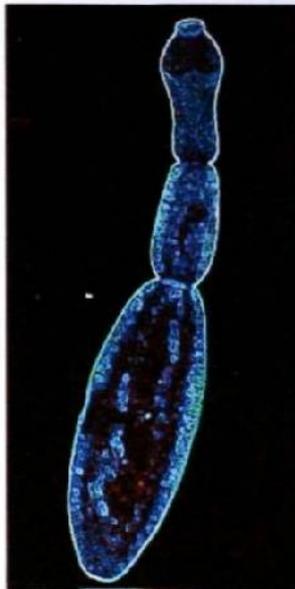


Figura 2). Tenia de *Echinococcus granulosus*.

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 μm 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 rostellum 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 μ , 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 μ 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).

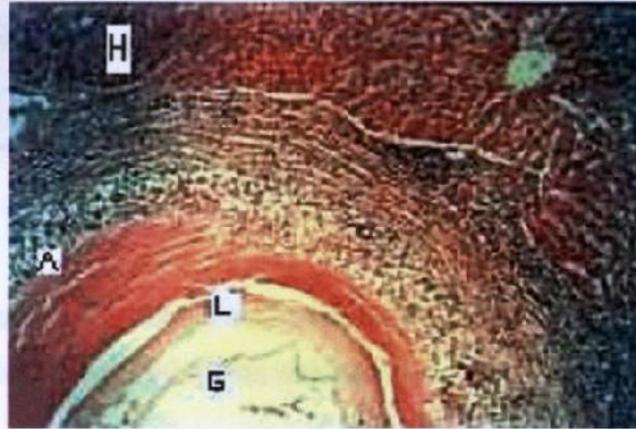


Figura 4. Corte histológico de Quiste Hidatídico de cerdo, muestra sus diferentes membranas: H) Tejido hepático normal. A) Membrana adventicia por la reacción inflamatoria del huésped. L) Membrana laminar del parásito. G) Membrana germinativa del parásito en donde se desarrollan los PSC.

Los protoescolices son ovoides, invaginados, tienen cuatro ventosas, un rostelo con 30 a 40 ganchos en dos hileras, una interna y otra externa, y 100 μ 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 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.

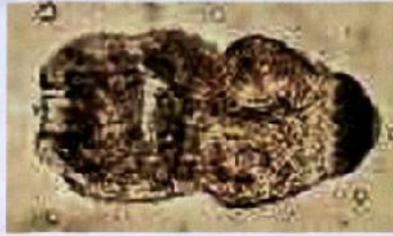
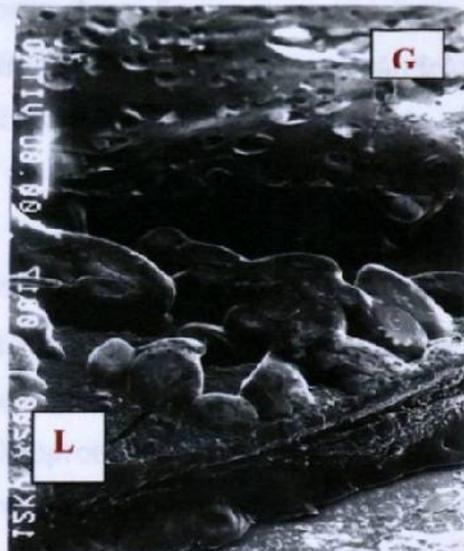
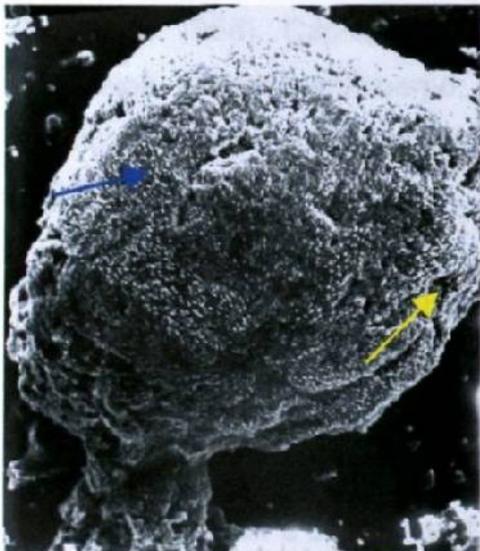


Figura. 5) Protoescolices en donde se aprecian sus diversos componentes: La corona de ganchos, las ventosas y corpúsculos calcareos.



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- γ 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- α , 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- γ , IL-2, IL-3, GM-CSF y TNF- α) 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 transcritos 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 γ 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 γ e IL-5 en la primer semana posinoculación. Niveles bajos de anticuerpos específicos fueron estimulados por parásitos muertos tanto sistemicamente 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).

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, estreptomomicina 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°C en PBS pH 7.4. A los controles sanos ($n=10$) se les inoculó 200 μl 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°C , el sobrenadante fue recuperado y dializado 72 horas a 4°C contra agua tridestilada estéril, utilizando membranas de diálisis con poro de corte de 6000. Posteriormente el dializado fue liofilizado y almacenado a -20°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-duodecil 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 μl de H_2O_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 μ 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 μ 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 μ de H₂O₂. (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/cloroforno (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 μ l de ARN, se les agregaron 995 μ 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 μ M del primer 3' antisentido, mezclados con 5 U/20 μ l de rTth/ADN polimerasa (Gene Amp™ 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 α , IL-6, TGF β , IL-10 y G₃PDH se llevó a cabo por PCR, se agregaron 0.15 μ M de oligonucleótidos 5' sentido. La reacción en los tubos con 50 μ l de mezcla de muestra fueron amplificadas en un termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR system 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- α	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- β	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 ₃ PDH	sentido	5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3',
	antisentido	5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'.

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 fosfataasa 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 α 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).

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).

HIDATIDOSIS PORCINA Y MURINA

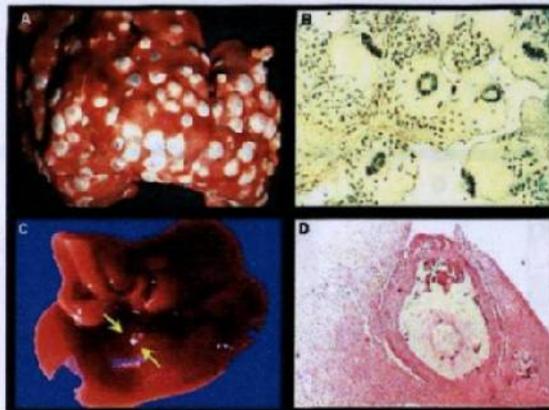
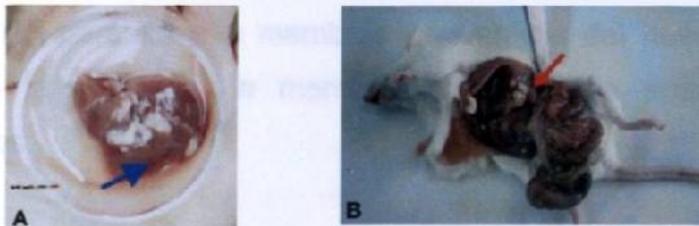


Figura 7). (A) Muestra hígado de cerdo con quistes hidatídicos. (B) Protoescolices mostrando su corona de ganchos y corpúsculos calcáreos en su estructura. (C) Hígado de ratón mostrando quistes hidatídicos. (D) Corte histológico de un quiste hidatídico mostrando sus estructuras; membrana adventicia,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

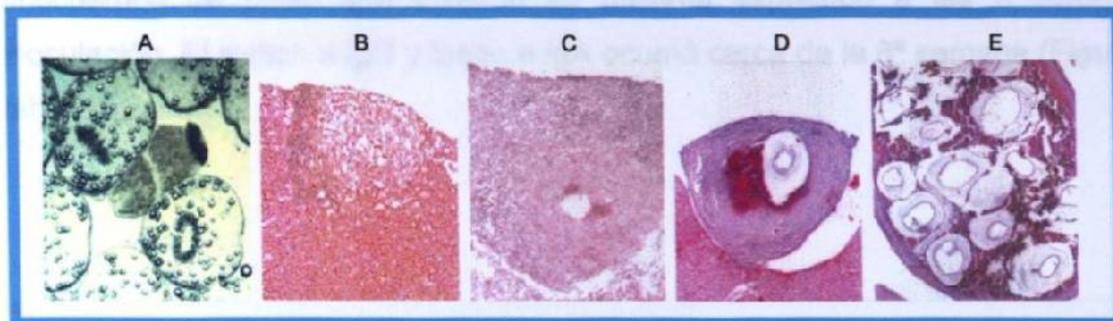


A) Hígado de ratón infectado con quistes hidatídico.
B) Necropsia de ratón de 16 semanas post-inoculación.

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

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Los animales infectados muestran una respuesta primaria contra el antígeno de líquido hístico (Fig. 10) como puede verse en la figura 10; los títulos de anticuerpos de tipo IgG1 y IgG2a en suero aumentan a las 4 semanas de



INFLAMATORIAS EN NEMATODOS EXPERIMENTAL

Figura 9). A. Protoescolices de *E. granulosus* mostrando su rosetelo. 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.

R10 sem R15 sem R12 sem R16 sem
SEMNAS DE INOCULACIÓN

Figura 10. ELISA muestra la disposición de los diferentes inmunoglobulinas con respecto a la simbiosis apical, como fueron apareciendo durante los diferentes intervalos de inoculación.

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).

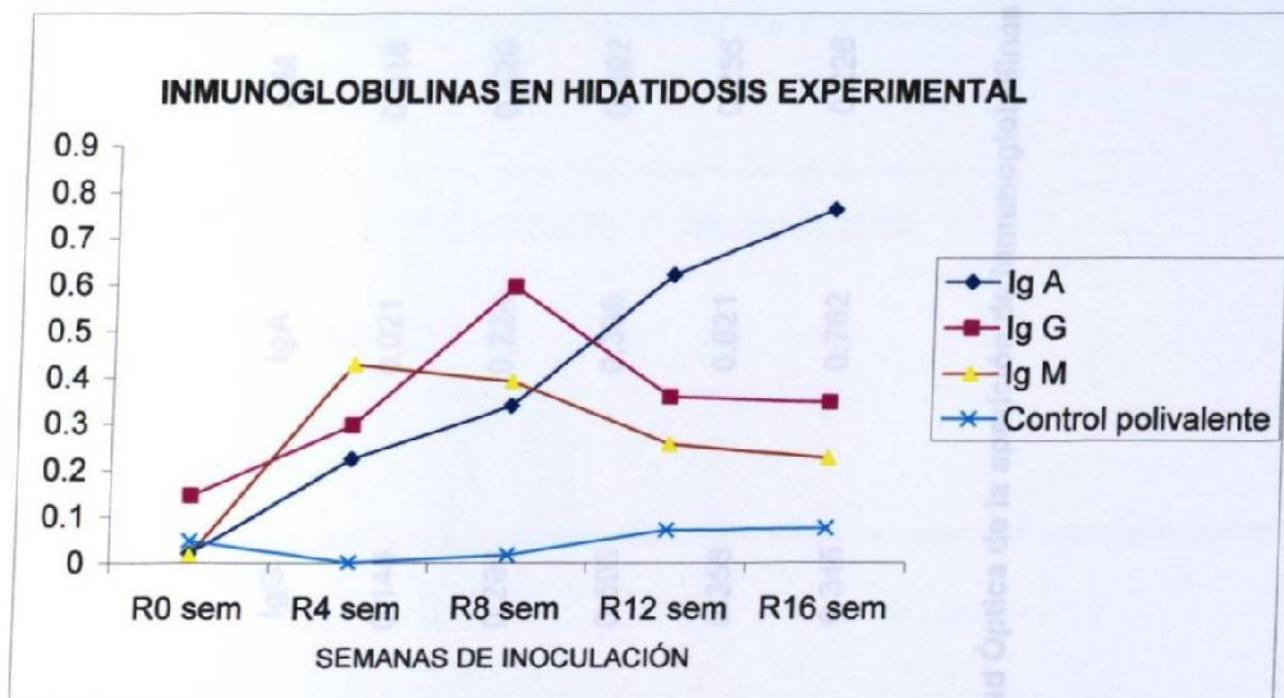


Figura 10. ELISA. Muestra la disposición de las diferentes inmunoglobulinas con respecto a la densidad óptica, como fueron apareciendo durante las diferentes semanas de inoculación.

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.

Todas las muestras fueron normalizadas con los controles de G3PDH. Los
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 mas 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).

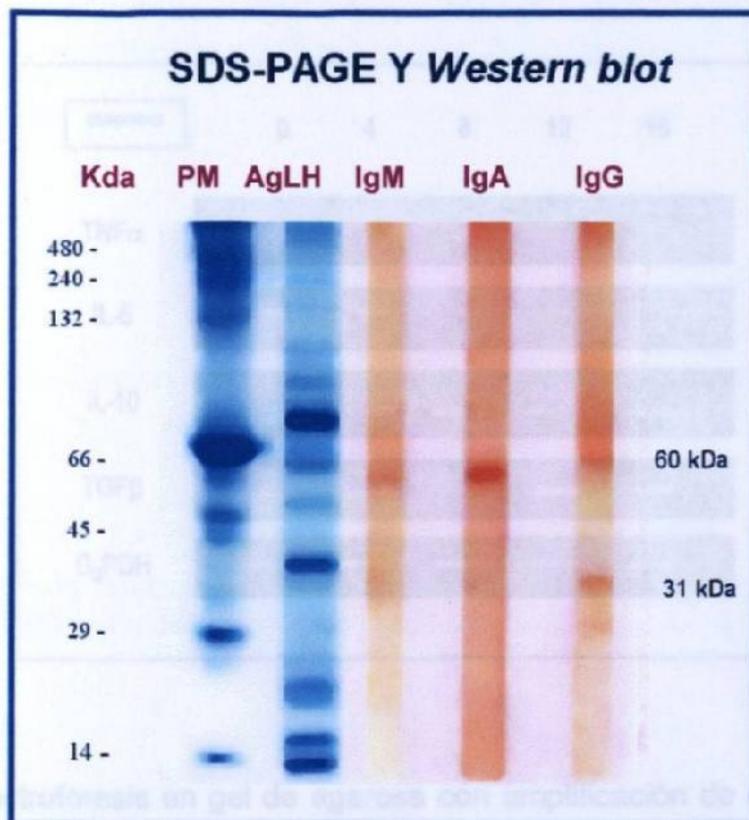


Figura 11). Corrimiento electroforético de antígenos de LH. Inmunoelectrotransferencia de los principales antígenos del LH revelados con IgM, IgA e IgG.

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).

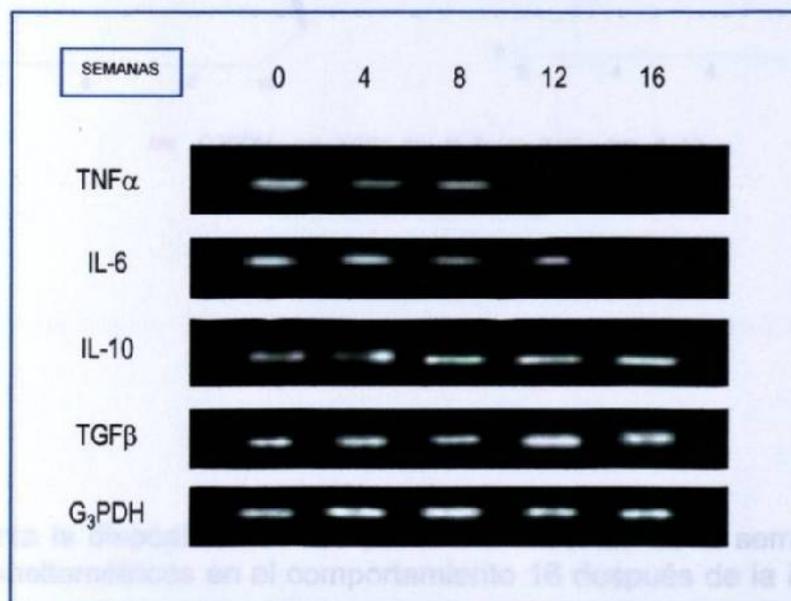


Figura 12). Electroforesis en gel de agarosa con amplificación de citocinas por RT-PCR. En comparación a la expresión del gene control G3PDH, se presenta un panel representativo de genes de citocinas, mostrando una regulación negativa de $TNF\alpha$ e IL-6 y una sobre regulación de IL-10 y $TGF\beta$.

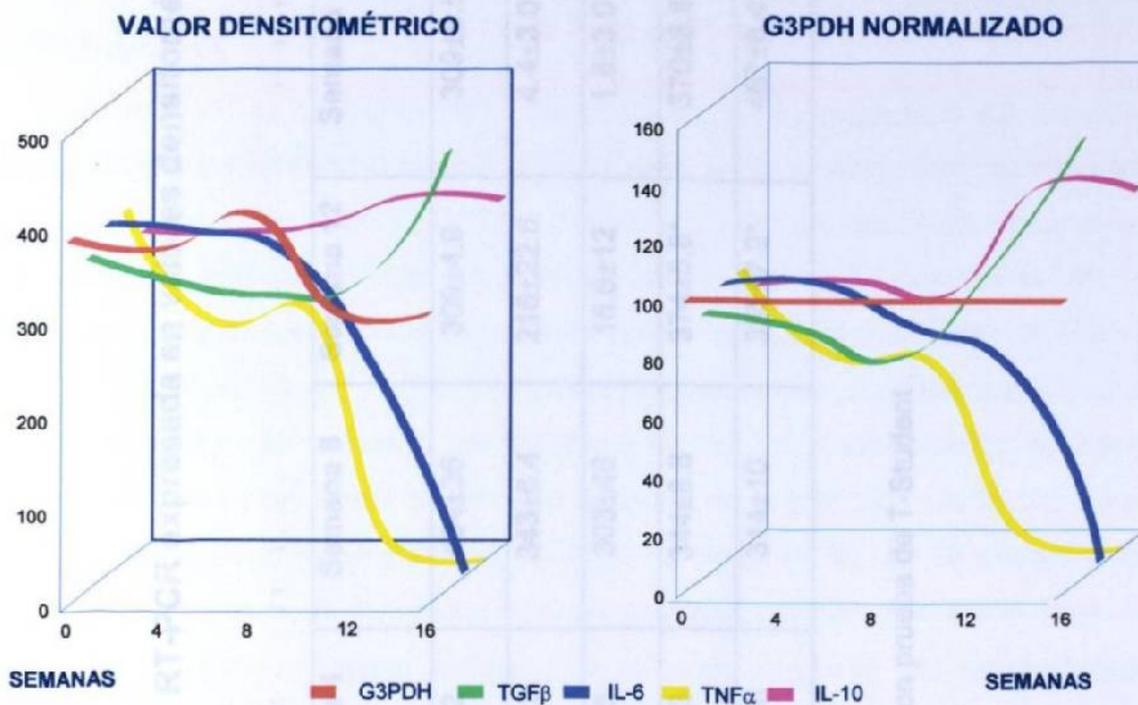


Figura 13). Presenta la disposición de los diferentes citocinas de la semana 0 a la semana valores densitométricos en el comportamiento 16 después de la inoculación con PSC.

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±4.9	309±5.5
IL-6	373±9.6	367±6.9	343±6.4	216±22.6	4.4±3.0*
TNF α	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 β	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 α 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 α 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 β 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 α , mientras que la IL-10 y el TGF β 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).

Hidatidosis murina IL-6



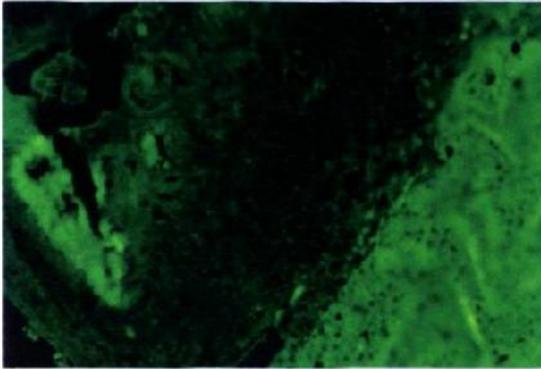
H&E



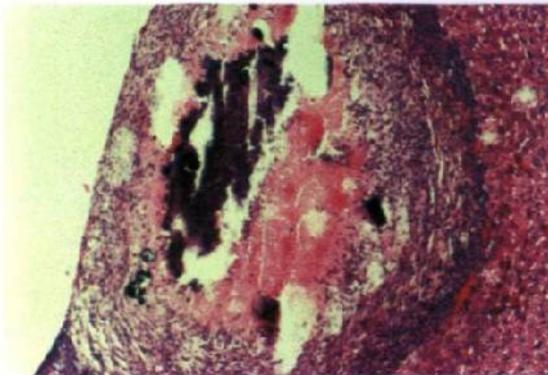
FISH

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 α



FISH



H&E

Figura 15). FISH. Secciones de hígado de ratón representativas in situ hibridizadas con sondas de DNA mostrando ausencia de mTNF α 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 α		TNF α		IL-10		IL-10		TGFB		TGFB		G3PDH		G3PDH	
	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano	Afectado	Sano
0	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil	Débil	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil	Débil	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
16	Negativo	Débil	Negativo	Débil	Negativo	Débil	Negativo	Débil	Positivo											