Facultad de Ciencias
Universidad de la República

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Análisis de la respuesta inmune temprana en ratones C57Bl/6 frente a la infección secundaria experimental por *Echinococcus granulosus*

Trabajo Especial de Grado para optar al Título de Licenciado en Bioquímica

Presentado por:

BACHILLER RAFAEL CAPURRO GARI

Tutor: Dra. Sylvia Dematteis

Co-tutor: MSc. Gustavo Mourglia Ettlin

Índice

Introducción....4

1. Introducción general....5
1.1. Infecciones por protozoarios....6
1.2. Infecciones por helmintos....9
2. *Echinococcus granulosus*....10
2.1. Ciclo de vida básico....10
2.2. Echinococcosis quística....11
2.3. Genotipos de *E. granulosus*....11
2.4. Metacestodo de *E. granulosus*.... 12
2.5. Respuesta Inmune contra *E. granulosus*....15
3. Inmunomodulación.... 20
4. Inmunoprotección....22
5. Objetivos....24

Materiales y Métodos....25

1. Animales....26
2. Parásitos....26
3. Infecciones experimentales....26
4. Obtención de suero....26
5. Obtención de células peritoneales....26
6. qRT-PCR para citoquinas....27
6.1. Extracción de ARN....27
6.2. Tratamiento con DNasa....27
6.3. RT....28
6.4. Primers....28
6.5. PCR.... 28
7. Cuantificación de Anticuerpos totales por ELISA.... 30
8. Detección de anticuerpos específicos contra antígenos somáticos de protoscólex por ELISA....31
9. Análisis estadístico de los datos....31

Resultados....33

1. Niveles tempranos de expresión de ARNm para citoquinas en células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados con protoscólex de *E. granulosus*....34
2. Respuesta sistémica de Anticuerpos Específicos contra PSA....42

Discusión.....46

Bibliografía.....55

INTRODUCCIÓN

1. Introducción general

El estudio de las interacciones hospedador-parásito, nos ha permitido disponer de cierta información sobre este histórico dialogo entre el sistema inmune y un agente infeccioso. Ambos participantes han mantenido este dialogo por millones de años – intercambiando golpes, revisando tácticas y realizando esfuerzos para obtener la mano más alta. Los parásitos iniciaron esta interrelación con sus hospedadores para reforzar sus propias chances de sobrevivencia, proliferación y subsecuente diseminación. Desde el punto de vista del parásito, una interacción estable implica un alto rango de prevalencia entre la población de hospedadores y una larga persistencia en estos con mínimos síntomas de la enfermedad. Alcanzar estas metas garantiza que el parásito amplié el tiempo de reproducción e invasión a un nuevo hospedador, forzando al sistema inmune a movilizar el arsenal molecular y celular para frustrar la multiplicación y favorecer la eliminación el agente infeccioso. En respuesta a esto, los parásitos protozoarios y helmintos han evolucionado desarrollando diferentes estrategias para hacer frente a las amenazas del sistema inmune del hospedador (Siracusano A. *et al*. 2008).

Algunas de las estrategias utilizadas por los parásitos son: a) la secreción de proteasas (que degradan anticuerpos o moléculas del complemento)(Chapman C.B. & Mitchell GF 1982; Mejri N. & Gottstein B. 2009); b) la inhibición de las vías de señalización de las células hospedador (Stanley A.C. & Engwerda C.R., 2007); c) inhibición de la síntesis de citoquinas críticas (McDowell M.A. & Sacks D.L., 1999), y d) la reclusión anatómica, (Thompson R.C.A., 1995; Handman E., 1999; de Souza W. *et al*. 2010) entre otros tipos de estrategia.

El modelo experimental por excelencia para el estudio de las interacciones hospedador-parásito ya sea en el caso de infecciones por parásitos protozoarios o parásitos helmintos es el modelo del ratón. Gran parte del conocimiento disponible sobre la respuesta inmune que ocurre durante las enfermedades parasitarias proviene del uso de este modelo. Las razones por las cuales se utiliza este modelo son varias: a) los ratones son animales relativamente sencillos de manejar y trabajar a nivel de laboratorio; b) se tiene un amplio conocimiento de su sistema inmune; c) se pueden

utilizar cepas de ratones endogámicas que permite evitar las diferencias genéticas entre hospedadores, abriendo así la posibilidad de investigar los factores parasitarios que puedan influenciar el resultado de la infección. Al utilizar diferentes cepas de ratones que difieren en la susceptibilidad a una determinada infección parasitaria, es posible obtener un acercamiento a aquellas respuestas inmunes que son más óptimas para la eliminación de dicha infección. La importancia de esto último es clave para poder desarrollar vacunas o estrategias de inmuno intervención que logren inducir la respuesta inmune más adecuada para eliminar al parásito.

1.1. Infecciones por protozoarios

En los últimos años se han analizado las respuestas humorales y celulares en diferentes cepas de ratones que difieren en la resistencia/susceptibilidad de frente a una determinada infección parasitaria. A continuación daremos algunos ejemplos.

Un ejemplo interesante del cual se conoce en detalle el factor asociado directamente con la resistencia o susceptibilidad, lo constituye la infección experimental por *Leishmania donovani*. *Leishmania* es parásito protozoario intracelular obligatorio que parasita diferentes especies y causa un amplio espectro de enfermedades que colectivamente se conocen como Leishmaniasis, y que constituyen un importante problema de la salud pública en varias partes del mundo (Stanley A.C. & Engwerda C.R., 2007). En ratón, el crecimiento temprano de *Leishmania* en macrófagos tisulares está determinado por un antiportador protón-catión fagosomal codificado por el gen *Slc11a1*. Las cepas de ratones genéticamente resistentes (ej. CBA) poseen un gen *Slc11a1* funcional que puede controlar el crecimiento temprano del parásito independientemente de mecanismos inmunes adquiridos, de la óxido nítrico sintasa inducible o de la actividad oxidasa fagocítica. Las cepas de ratones susceptibles (ej. C57BL/6 y BALB/c) poseen un gen *Slc11a1* mutante, con una sustitución (Gly por Asp 169) produciendo un producto génico *Slc11a1* no funcional, que resulta en un crecimiento desenfrenado del parásito. Sin embargo, la mayoría de los ratones mutantes para *Slc11a1* pueden controlar la infección hepática después de un tiempo, y

la tasa de resolución está ampliamente determinada por el haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad, indicando un importante rol de las respuestas inmunes adquiridas en la fase de control parasitario por el hospedador (Stanley A.C. & Engwerda C.R., 2007).

En general, la cepa Balb/c es más susceptible a la infección por *Trypanosoma cruzi* comparada contra la cepa C57BL/6 en términos de parasitemia incrementada y mortalidad dado un desafío similar de parásitos (Hoft D.F. *et al*. 1993). Frente a una misma dosis relativa de parásitos Bryan M.A. *et al*. (2010) observaron que la cepa susceptible BALB/c muestra una activación temprana de células B con expansión de las células B de zona marginal, seguido a un importante aumento de células secretoras de anticuerpos (ASC), pero sin formación de ASC productoras de anticuerpos específicos contra el parásito (Bryan M.A. *et al*. 2010). A su vez la activación policlonal en la cepa BALB/c estuvo asociada con una sostenida respuesta de citoquinas tipo Th2, pero con una respuesta tardía de tipo Th1. Por el contrario observaron que la cepa resistente C57BL/6 desarrolla mejores respuestas IgM e IgG específicas contra el parásito (evaluado contra la proteína reguladora del complemento, CRP), detectándose anticuerpos específicos a las dos semanas post infección, pero además con poca evidencia de activación policlonal B. A su vez, el análisis de citoquinas en C57BL/6 demostró que la respuesta humoral específica estuvo asociada con una respuesta tipo Th1, con producción de IFN-γ temprana.

Esta información sugiere que el sesgo genético del hospedador podría impactar sensiblemente en el tipo de respuesta humoral que se desarrolla. En este contexto, la infección por *T. cruzi* de ratones susceptibles, induce un perfil de citoquinas tipo Th2 el cual está asociado con un incremento en la producción de anticuerpos totales (no específicos) concomitantemente con un retraso de la inmunidad humoral específica contra el patógeno. Este estudio resalta la necesidad de considerar el efecto de sesgo del hospedador cuando se estudia la respuesta inmune (celular y/o humoral) contra cualquier patógeno en el que se haya reportado activación policlonal B durante la infección (Bryan M.A. *et al*., 2010).

En el caso del parásito intracelular obligatorio *Toxoplasma gondii*, la resistencia depende del reconocimiento del patógeno por las células dendríticas y de la secreción de IL-12 por estas células y además por macrófagos y neutrófilos, que a su vez promueven la producción de IFN-γ en células T "respondedoras" y células NK (Blader & Saeij, 2009; LaRosa D.F. *et al*. 2008). El IFN-γ, producido en respuesta a la expresión de IL-12, es la citoquina crítica para la resistencia, tanto para la infección aguda como crónica. Varios efectores de IFN-γ importantes para la resistencia han sido identificados incluyendo, la familia p47 de GTPasas activada por IFN-γ, oxido nítrico sintasa, e indolamina dioxigenasa (Blader & Saeij, 2009). Estos genes blancos del IFN-γ, afectan el crecimiento de Toxoplasma por diferentes mecanismos (Blader & Saeij, 2009).

El IFN-γ regula la expresión de sus genes efectores principalmente a través de la activación del factor de transcripción STAT1. Cuando el IFN-γ se une a su receptor dispara la activación de las quinasas de Janus (JAK1 y JAK2). STAT1 solo o en combinación con otros factores de transcripción (como el Factor Regulador del Interferón 1, IRF-1) inducirán la transcripción de los genes efectores importantes para la resistencia contra *Toxoplasma* (Blader & Saeij, 2009). Por esta razón *Toxoplasma* ha desarrollado formas para subvertir la señalización de IFN-γ, permitiéndole convertirse en un patógeno exitoso y distribuido mundialmente. Debido a que la activación de la vía de señalización STAT1 por IFN-γ es esencial para el control del crecimiento del parásito, se ha puesto mucho esfuerzo en dilucidar la forma que Toxoplasma inhibe la transcripción de STAT1 en células estimuladas con IFN-γ. Existe cierta evidencia de que Toxoplasma inhibe STAT1 por la regulación al alza de las proteínas de señalización supresoras de citoquinas (SOCS) (Blader & Saeij, 2009). Las SOCS son una familia de 8 proteínas (SOCS 1-7 y CIS), que están bien reconocidas como atenuadores de la señalización dependiente de IFN-γ (Murray P.J., 2007). Estas proteínas afectan la señalización del IFN-γ ya sea inhibiendo la actividad catalítica de JAKs (SOCS1, SOCS3) o inhibiendo el reclutamiento de STATs (CIS). La infección de macrófagos con Toxoplasma regula a la alza los niveles de ARNm de SOCS-1 SOCS-3 y CIS. El rol de estas proteínas en la evasión de la respuesta inmune por Toxoplasma fue establecido mostrando que macrófagos infectados por Toxoplasma que expresaban de forma

estable SOCS-1, SOCS-3 o CIS, eran incapaces, en respuesta al IFN-γ, de producir óxido nítrico o limitar el crecimiento del parásito (Blader & Saeij, 2009).

1.2. Infecciones por helmintos

Los helmintos son parásitos metazoarios que actualmente afectan a un cuarto de la población mundial produciendo en su mayoría infecciones crónicas (Hotez P.J. *et al*., 2008). Dentro de los helmintos existen dos grandes clasificaciones los nematodos y los platelmintos. Las infecciones por nematodos tanto en humanos como del ganado continúan imponiendo una significativa carga de salud y económica alrededor del mundo. La organización mundial de la salud estima que hay más de 1000 millones de personas en el mundo infectadas con uno o más de las especies patógenas principales de humanos: *Trichuris trichuria, Asacaris lumbricoides* y los gusanos con ganchos *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenalis*. Los modelos murinos de infecciones de nematodos intestinales, han probado ser un sistema relevante y manejable para definir las bases celulares y moleculares en como el sistema inmune del hospedador regula la resistencia y la susceptibilidad frente a la infección (Artis D., 2006). Mientras que la susceptibilidad a la infección crónica es propagada por respuestas de citoquinas del tipo Th1 (caracterizada por la producción de IL-12, IL-18 e IFN-γ), la inmunidad contra el gusano nematodo adulto es críticamente dependiente de respuesta de citoquinas de tipo Th2 (controladas por células T $CD4^+$ colaboradoras que secretan citoquinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) (Artis D., 2006).

Existen dentro del intestino del hospedero diferentes mecanismos y células efectoras que inducen la expulsión del parásito. Entre ellos tenemos, los mastocitos, las células caliciformes, eosinófilos, anticuerpos, efectos fisiológicos, inflamación intestinal y células epiteliales.

Las células epiteliales, por ejemplo, son muy importantes para la expulsión del nematodo *Trichuris muris* en el modelo experimental murino, en el cual actúan como "escalera mecánica epitelial" (Cliffe L.J. *et al*., 2005). Cliffe L.J. *et al*. (2005) comparan la tasa de migración celular epitelial y el recambio epitelial, en cepas de ratones que

desarrollan una respuesta de citoquinas de tipo Th2 y expulsan el nematodo (BALB/c), versus aquellos que expresan una respuesta de citoquinas de tipo Th1 y desarrollan la infección crónica (AKR). Los ratones de cepas resistentes (BALB/c) exhiben una tasa más rápida de migración celular epitelial por la columna de la cripta, alrededor del período de expulsión del gusano (Cliffe L.J. *et al*., 2005). La tasa del movimiento celular epitelial está bajo el control inmune mediante la citoquina interlequina-13 y la quimioquina CXCL10. La citoquina crítica protectiva de tipo Th2, IL-13, está involucrada en conducir una rápida migración y recambio del epitelio, esencialmente creando una "escalera mecánica epitelial" propuesta para desalojar a *T. muris* de su nicho epitelial. La expresión de la quimioquina CXCL10 inducida por el IFN-γ reduce el recambio epitelial en animales susceptibles. El bloqueo de esta quimioquina en ratones AKR infectados revierte la acumulación de las células proliferativas epiteliales, y resulta en una potenciación del recambio y la migración de las células epiteliales conjuntamente con la expulsión de *T. muris* (Cliffe L.J. *et al*., 2005). De hecho, el enlentecimiento de las tasas de recambio celular epitelial podría ser una estrategia empleada por los parásitos nematodos para promover su propia supervivencia (Cliffe L.J. *et al*., 2005). Esta hipótesis está apoyada por el hecho que se han encontrado factores derivados de nematodos que pueden influenciar en la proliferación celular del epitelio (Rikihisa Y. *et al*., 1984; Huby F. *et al*., 1999).

Así como para *L. donovani* se conoce con precisión que el determinante de la susceptibilidad de los ratones BALB/c y C57BL/6 es una mutación genética en el gen *Slc11a1* que causa una proteína no funcional, es difícil determinar con precisión las causas de susceptibilidad en ratones infectados con parásitos helmintos, pues estos últimos son organismos de mayor complejidad, en donde participan un mayor número de moléculas por parte del organismo invasor.

2. *Echinococcus granulosus*

2.1. Ciclo de vida básico

El ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* siempre involucra a un hospedador definitivo que alberga al gusano adulto, y a un hospedador intermediario en el que se desarrolla la larva o metacestodo (Figura 1). El hospedador definitivo (carnívoro) se infecta por ingestión de protoscólices, contenidos en quistes fértiles, los cuales se desarrollan principalmente en las vísceras del hospedador intermediario. Los protoscoleces se desarrollan a gusanos planos (de 3 mm de longitud) el intestino del hospedador definitivo, los cuales producen huevos. El hospedador intermediario, (herbívoro u omnívoro), se infecta por la ingestión accidental de huevos distribuidos por las heces del hospedador definitivo. Los huevos de este parásito son capaces de sobrevivir al ambiente durante largos períodos (Thomson R.C.A., 1995).

2.2. Echinococcosis quistica

La infección por la larva *E. granulosus* se conoce con el de término de enfermedad hidática, hidatidosis o echinococcosis quistica. Presenta una distribución cosmopolita y la transmisión entre animales y humanos la hace pertenecer al grupo de enfermedades conocidas como zoonosis (Thomson R.C.A., 1995). La infección por *Echinococcus granulosus* presenta una prevalencia estimada en 6 millones de individuos infectados (Siracusano A. *et al*., 2009).

2.3. Genotipos de *E. granulosus*

Una característica sobresaliente en la biología de *E. granulosus* es el hecho que a nivel poblacional presenta un número de variantes genéticas intraespecíficas denominadas cepas o genotipos, habiéndose identificado hasta la fecha 10 genotipos (denominados G1-10) (McManus D.P. & Thompson R.C.A., 2003; Thompson R.C. & McManus D.P., 2002). Cada genotipo se caracteriza por ser capaz de establecerse y desarrollarse en quistes hidáticos fértiles en hospederos intermediarios específicos, aunque algunas genotipos pueden infectar un rango mayor de hospederos pero produciendo mayoritariamente quistes no fértiles. Por ejemplo, el genotipo G1 desarrolla quistes fértiles en ovejas, pero también es capaz de infectar bovinos, cerdos, cabras, camélidos, macrópodos y humanos aunque con una tasa de fertilidad menor a la

observada en ovejas. Por el contrario, el genotipo G7 ha sido identificado exclusivamente en cerdos y jabalíes, salvo algunos casos excepcionales en humanos (Thompson R.C.A., 2008; Schneider R. *et al*., 2010). Más allá de la peculiaridad en la especificidad por el hospedero intermediario, las distintas cepas de *E. granulosus* presentarían características propias en cuanto a sus ciclos de vida, velocidad en alcanzar la madurez sexual, antigenicidad, epidemiología de la transmisión, sensibilidad a agentes quimioterapéuticos y severidad de la infección (Thompson R.C., 2008). En este sentido, nuestro grupo ha mostrado que el genotipo G1 es altamente infectivo en ratones mostrando porcentajes de individuos infectados del 70-100% según la cepa de ratón utilizada. Por el contrario, el genotipo G7 no fue capaz de establecer la infección en todas las cepas de ratones analizadas (Cucher M. *et al*., sometido). Así, el estudio diferencial de la respuesta inmune frente a diferentes genotipos de *E. granulosus* aportaría al diseño y desarrollo de reactivos diagnósticos, preparaciones vacunales y quimioterapéuticos que generen un mayor impacto en la epidemiología y control de la hidatidosis.

2.4. Metacestodo de *Echinococcus granulosus*

Una vez ingeridos por el hospedador intermediario, los huevos liberan los embriones (oncosferas) que penetran la pared intestinal, viajan a través de la sangre o la linfa, y quedan atrapados en los órganos internos, donde se desarrollan en metecestodes. El estadío de metacestodo o quiste hidático se desarrolla en órganos internos del hospedero intermediario (principalmente hígado y pulmones), y está compuesto de dos láminas: una interna (capa germinal) y otra externa (capa laminar). La capa germinal está formada por una fina capa celular que limita una cavidad llena de líquido (fluido del quiste hidático, o fluido vesicular). Esta estructura básica se desarrolla típicamente como un quiste unilocular esférico y turgente, que crece mediante el incremento de diámetro. (Díaz A., *et al*., 2011).

La Capa Germinal forma vesículas prolígeras que por gemación interna generan el estadío de protoescólex (PE) (Thompson R.C.A., 1995). Con el tiempo, las vesículas se

desprenden de la capa germinativa y flotan libremente en el interior del quiste (vesículas hijas); algunas se rompen y se liberan los protoscoleces que se acumulan formando la denominada arenilla hidatídica. Hacia el exterior la capa germinal expone la membrana plasmática apical de su tegumento sincitial, que lleva microtríquias truncadas. La capa germinal posee además células no sincitiales adicionales, incluyendo musculares, de almacenamiento de glicógeno, y células no diferenciadas. Hacia la cavidad del quiste, no existe ni organización sincitial ni complejos de unión entre las células, por lo que aparentemente el fluido intracelular de la capa germinal es continuo con el fluido vesicular (Díaz A., *et al*., 2011). El quiste está envuelto por una capa de tejido conjuntivo o adventicia procedente de la reacción inflamatoria del hospedador (Siracusano A. *et al*., 2009).

Separando la capa germinal de la matriz extracelular y de las células del hospedador se encuentra la capa laminar, una envoltura acelular rica en carbohidratos. La Capa Laminar alcanza aproximadamente hasta 3 mm en *E. granulosus* y se describe como una matriz extracelular especializada, diseñada evolutivamente para mantener la integridad física del metacestode y para proteger las células de la Capa Germinal de la inmunidad del hospedador. Es probable que la primera de estas demandas sea la que determine el impresionante grosor de la Capa Laminar de *E. granulosus*: los quistes hidáticos vivos son turgentes, y la presión desde el exterior es una gran amenaza para el hospedador, como queda ilustrado por la ruptura traumática de un quiste (Díaz A., *et al*., 2011).

La síntesis de la capa laminar ocurre apenas después del comienzo del desarrollo del quiste. Oncosferas de *E. granulosus* desarrolladas *in vitro* secretan material fibrilar tan tempranamente como a los tres días luego de la activación, aunque el primer material que se asemeja a la malla madura de la capa laminar aparece al día seis. Es probable que cuando el metacestodo se desarrolla a partir de protoscólex, que necesita ser reprogramado para el desarrollo reverso, la formación de la capa laminar se retrasa, apareciendo *in vitro* aproximadamente a los 28 días, o después de 20-40 días *in vivo* (Díaz A., *et al*., 2011). Esta es una importante razón para estudiar la respuesta inmune

temprana desencadenada por el hospedador, pues es aquí donde probablemente el quiste en desarrollo sea más susceptible al ataque inmune.

La infección secundaria por *E. granulosus* es un grave problema de salud pública que ocurre luego de la ruptura accidental de un quiste hidático fértil, y se debe a la capacidad que tienen los protoscólex de desarrollarse en nuevos metacestodos. El modelo experimental de infección secundaria consiste en la inoculación intraperitoneal de protoscólices viables en ratones inmunocompetentes y es ampliamente utilizado para el estudio de la interacción hospedero-parásito, así como para el análisis de nuevos quimioterapéuticos o formulaciones vacunales. La infección secundaria experimental ratones Balb/c puede dividirse en dos etapas: una etapa temprana (hasta el día 20-30 p.i.) en la cual los protoscólices se diferencian a quiste hidático (establecimiento de la infección) (Richards K.S. *et al.*, 1983), seguida de una etapa tardía en la cual los quiste hidático crecen y eventualmente se transforman en quiste hidático fértiles (infección crónica).

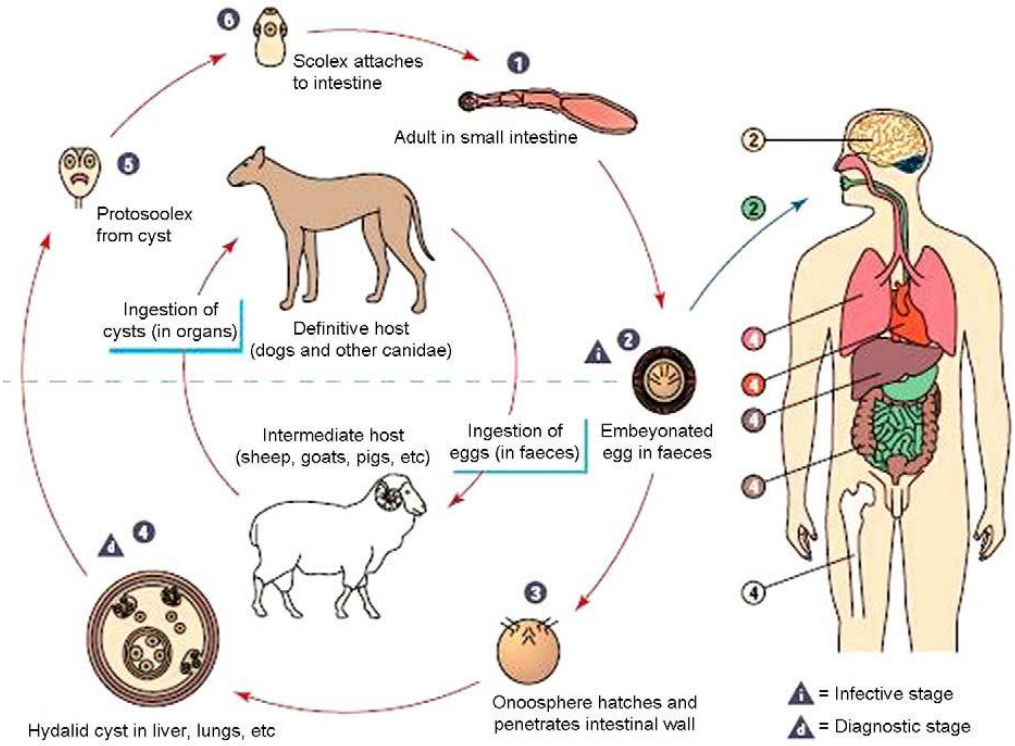

Figura 1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*. (Tomada de Moro P. & Schantz P.M., 2009).

2.5. Respuesta Inmune contra *E. granulosus*

Las helmintiasis se caracterizan por desencadenar respuestas polarizadas de citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) con escasos o nulos componentes de tipo Th1. El rol de estas respuestas en la interacción hospedador parásito permanece desconocido en muchas infecciones y no se correlaciona con resistencia en todos los casos (Baz A. *et al*., 2006). Las citoquinas son importantes para la regulación del sistema inmune y son secretadas por una variedad de células en respuesta a estímulos propios y no propios. La comunicación entre células, en mismos sitios anatómicos o distantes, ocurre vía citoquinas que determinan la calidad y la intensidad de la respuesta inmune innata y adaptativa (Baz A. *et al*., 2006).

Particularmente, en el caso de la infección en humanos por *E. granulosus* se ha sugerido que las respuestas de citoquinas de tipo Th2 serían responsables de la susceptibilidad a la enfermedad y se asociarían a los estadíos crónicos de la infección (Mezioug D. & Touil-Boukoffa C., 2009). En el contexto del modelo experimental, nuestro grupo ha mostrado que durante el establecimiento de la infección existe una clara respuesta de citoquinas de tipo Th2 tanto a nivel sistémico (Dematteis S. *et al*., 1999) como local (Mourglia-Ettlin G. *et al*., 2011a). Por lo tanto, dado que la infección se establece exitosamente en presencia de este tipo de respuesta, nuestra hipótesis es que las mismas no se asociarían con una respuesta inmune eficiente. Además, reportes de nuestro grupo y de otros sugieren que respuestas de tipo Th1 serían eficientes, tanto en humanos como en el modelo experimental, para combatir el establecimiento de la infección (Rogan M.T., 1998; Riganò R. *et al*., 1999; Riganò R. *et al*., 2001; Al-Qaoud K.M. & Abdel-Hafez SK, 2008; Amri M. *et al*., 2007).

El resultado de la infección por *E. granulosus* puede ser evaluado usando dos parámetros: el porcentaje de establecimiento de la infección y la carga parasitaria. El porcentaje de establecimiento de la infección es una medida indirecta de la eficiencia de

la respuesta inmune temprana del hospedero, ya que se relaciona con la habilidad de los protoscólices de sobrevivir y diferenciarse a quiste hidático (número de quiste hidático desarrollados respecto al inoculo inicial de protoscólices). Un menor porcentaje de establecimiento de la infección sugeriría una respuesta inmune temprana más eficiente. Por otro lado, la carga parasitaria evalúa tanto el número de quistes hidáticos desarrollados en un individuo como el volumen alcanzado por los mismos. De esta forma, la carga parasitaria puede ser utilizada como una medida de la capacidad del hospedero infectado para controlar el crecimiento parasitario: una carga parasitaria baja sugeriría un buen control. En este contexto, nuestro grupo ha analizado el porcentaje de establecimiento de la infección y la carga parasitaria en diferentes cepas de ratones concluyendo que ambos parámetros son fuertemente dependientes de la cepa de ratones utilizada. La mediana de los valores de porcentaje de establecimiento de la infección para ratones Balb/c y C57Bl/6 fue de 7% y 1%, respectivamente (Cucher M. *et al*., manuscrito en preparación). Por su parte, la mediana de los valores de carga parasitaria luego de 9 meses de infección fue de 26 mL para la cepa Balb/c y 12 mL para los ratones C57Bl/6 (Mourglia-Ettlin G. *et al*., manuscrito en preparación). Estos resultados mostraron que la cepa Balb/c es susceptible a la infección por *E. granulosus*, mientras que la cepa C57Bl/6 mostraría cierto grado de resistencia. Por lo tanto, dicha susceptibilidad diferencial a la infección motiva un estudio más profundo y comparativo de las respuestas inmunes tempranas ya que estas serían claves en el resultado final de la infección. De esta forma podríamos conocer cuáles serían las respuestas inmunes más eficientes frente a la infección por *E. granulosus*.

La etapa en la cual se establece la infección es clave, ya que es el momento durante el cual el parásito sería más susceptible a la respuesta inmune. En este sentido, nuestro grupo ha mostrado que la respuesta temprana de citoquinas en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c infectados muestra un comportamiento bifásico caracterizado por una inducción temprana predominante de citoquinas de tipo Th1 (IFN-γ, IL-2 e IL-15), seguida por un cambio rápido (día 5 p.i.) hacia un perfil de citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (Mourglia-Ettlin G. *et al*., 2011a). Asimismo, se mostró

también que *E. granulosus* induce tempranamente la producción local de anticuerpos IgM e IgG2b específicos contra antígenos de protoscólices, así como IgG2b e IgG3 no específicos, sugiriendo esto último cierto grado de activación policlonal de linfocitos B locales (Mourglia-Ettlin G. *et al*., 2011a).

En el modelo de ratón para la infección secundaria de echinococcosis alveolar, estudios en células del bazo de ratones C57BL/6 han mostrado una expresión inicial de citoquinas orientadas hacia perfil tipo Th1 (IFN-γ e IL-2) observado en la infección temprana, que en etapas posteriores de la infección, gradualmente se reemplazan por las citoquinas IL-4 e IL-5 que son del tipo Th2 (Mejri N. *et al*., 2011). Este cambio gradual hacia un perfil de citoquinas tipo Th2 durante la infección crónica es interpretado por Mejri N. *et al*. (2011), como una activación y al mismo tiempo modulación de la respuesta inmune del murino por parte de los metacestodes proliferativos.

Además, células dendríticas aisladas de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 infectados con echinococcosis alveolar en las etapas temprana (6 semanas) y tardía de la infección (4 meses), expresan altos niveles de mRNA de TGF-β, mientras que los niveles de mRNA de IL-10 e IL-12 (p40) permanecen regulados a la baja en ambas etapas. Los autores reportan además, que células T peritoneales mostraron una alta expresión de TGF-β, mientras que a su vez la expresión de IFN-γ estaba regulada a la baja (Mejri N. *et al*., 2011). Estas observaciones serían de importancia en el caso de la infección experimental por *E. multilocularis* ya que el TGF-β tiene un importante rol como modulador de la inmunidad y es secretado como un precursor inactivo, el cual una vez activado inhibe la expresión de IFN-γ (Taylor A.W. *et al*., 2009).

Por otra parte, se ha mostrado que la inducción de iNOS mediada por IFN-γ podría ser uno de los mecanismos de defensa del hospedador contra la infección de *E. granulosus* en humanos. Amri M. *et al*. (2007) analizaron el efecto del IFN-γ sobre la viabilidad de los protoscólices en co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con hidatidosis. Los autores observaron que las PBMC de pacientes con

hidatidosis incubados solamente con IFN-γ fueron efectivas en matar protoscólices. Además, observaron que cuando estimulaban PBMC de pacientes hidáticos en co-cultivo con protoscólices con IL-10 o IL-4, la viabilidad de los protoscólices era mayor que en las PBMC no estimuladas (Amri M. *et al*. 2009). A su vez observaron que ésta reducción se correlaciona con una disminución en la producción de óxido nítrico por los PBMC (Amri M. *et al*., 2009). Resultados obtenidos por nuestro grupo sugieren que la secreción temprana de IL-10, secretada por la células B en respuesta a glicoconjugados de *E. granulosus*, podrían favorecer la sobrevida del parásito y el establecimiento de una respuesta de citoquinas hacia perfil tipo Th2 (Baz A. *et al*., 2006). La interleuquina-10 es una citoquina regulatoria clave ya que suprime las respuestas inmunes mediante el bloqueo de producción muchas citoquinas por diversos tipos de células.

Breijo M. *et al.* (2008) mediante el uso de cámara de difusión implantadas en la cavidad peritoneal, observaron que la inflamación inicial alrededor de los parásitos no dañados disminuía pero no así en aquellos parásitos que estaban dañados. Además, en donde el complemento había participado en la inducción de la inflamación temprana, la deposición de C3 en los parásitos sanos había progresivamente disminuido, e incluso algunos parásitos no mostraban deposición de C3 al día 3 p.i. (Breijo M. *et al*., 1998; Breijo M. *et al*., 2008). Los autores sugieren que el establecimiento de la infección y la sobrevida del quiste podrían estar asociados, al menos en parte, con el control del complemento en las fases iniciales de la infección (Breijo M. *et al*., 2008).

La función precisa de los eosinófilos en la infecciones parasitarias *in vivo* permanecen pobremente entendidas a pesar de que los eosinófilos han mostrado ser potentes efectores matando parásitos *in vitro* (Klion A.D. *et al*. 2004). A diferencia de los protozoarios, los helmintos son demasiado grandes para ser fagocitados y sólo podrían ser eliminados por estas células cuando han sido activadas por productos de la respuesta inmune adaptativa. Durante la maduración, liberación al torrente sanguíneo y reclutamiento a los tejidos, los eosinófilos responden a señales de citoquinas, quemoquinas, y otros mediadores pro-inflamatorios a través de receptores celulares específicos (Rosenberg H.F. *et al*., 2007). Durante las infecciones parasitarias, el

número de eosinófilos en sangre periférica se encuentran elevados debido a la influencia de moléculas secretadas por células Th2 (IL-5, IL-13 y GM-CSF) y los eosinófilos son reclutados hacia al tejido inflamado o dañado selectivamente por la quemoquina eotaxina (Shin M.H. *et al*., 2009).

A pesar del dogma predominante, los modelos animales no respaldan fuertemente un rol indispensable para los eosinófilos en la inmunidad *in vivo* contra los parásitos helmintos (Klion A.D. *et al*., 2004). De todas formas, los eosinófilos son uno de los tipos de células presentes en los granulomas hidáticos, y cierta evidencia sugiere que contribuyen con la defensa del hospedador contra el quiste hidático: (i) el número de eosinófilos alrededor del quiste de bovinos infectados se correlaciona con el grado de degeneración del quiste, (ii) ratones deficientes de C5 (B10.D2 o/Snj) y que por tanto tienen disminuida la capacidad de reclutar eosinófilos, muestran menores infiltrados de eosinófilos en las etapas temprana y crónicas de la infección que los ratones no deficientes en C5 (B10.D2 n/Snj) (Ferreira A.M. *et al*., 2000; Ramos A.L. *et al*., 2006).

Además, se ha reportado que la proteína catiónica de los eosinófilos (ECP) es capaz de dañar a protoscólices cultivados in vitro a concentraciones del orden micromolar. Esto estaría reforzando la idea que los eosinófilos podrían tener un papel en el control de la hidatidosis secundaria (Ramos A.L. *et al*., 2006). En quistes hidáticos humanos, se ha observado que la proteína catiónica del eosinófilo está asociada con la capa laminar de la pared de los quistes, y que también está presente en concentraciones micromolares en el liquido hidático. Por esta razón, Ramos A.L. *et al*. (2006), sugieren que estos resultados tomados en su conjunto sugieren la degranulación de los eosinófilos *in vivo* en la interfase hospedero-parásito, y que la liberación de la ECP podría actuar a concentraciones tales que podrían ser potencialmente dañina para el parásito (Ramos A.L. *et al*., 2006).

En la infección intraperitoneal experimental en ratones C57BL/6 con metacestodes de *E. multilocularis*, se reportó la ausencia de eosinófilos en la cavidad peritoneal, y además un disminuido número de estas células en la sangre de los animales infectados (Mejri N.

& Gottstein B., 2009). Interesantemente estos autores mostraron que los antígenos (metabolitos de E/S y fluido vesicular generado *in vitro*) del metacestodo *E. multilocularis* contienen una cistein proteasa que es capaz de digerir *in vitro* a la eotaxina. Los autores proponen que ésta inactivación de la eotaxina por el fluido vesicular o productos de E/S podría contribuir a explicar la ausencia de eosinófilos en la cavidad peritoneal de ratones infectados con echinococcosis alveolar secundaria. La ausencia de eosinófilos podría ser parte de una serie de eventos desplegados en la cavidad peritoneal para mantener bajos niveles de inflamación en ratones experimentalmente infectados (Mejri N. & Gottstein B., 2009).

Algunos aspectos de los mecanismos mediados por C5, que podrían contribuir en la defensa del hospedero, en la infección secundaria de ratones B10.D2o/Snj por *E. granulosus,* fueron analizados por Ferreira *et al*. (2000). Los autores sugieren, que podría ser probable que C5a fuera responsable de la infiltración de eosinofilos, teniendo en cuenta que la falta de quimiotaxis mediada por C5a, no pudo ser compensada por mecanismos redundantes, como por ejemplo la eotaxina o MIP-1a (Ferreira A.M. *et al*., 2000).

3. Inmunomodulación

La inmunoregulación por parásitos es un concepto global que incluye la supresión, desviación y conversión de la respuesta inmune del hospedero para beneficio del patógeno. Mientras muchos parásitos escapan al ataque inmune por variación de antígenos de superficie, los helmintos aparentan prosperar en localizaciones extracelulares expuestas, como los tractos linfáticos, la sangre y los intestinos (Maizels R.M. *et al*., 2003). Los productos de excreción/secreción de nematodes, trematodes y cestodes contribuyen a las estrategias de evasión inmune del parásito a través de mecanismos que incluyen la "muda" de ligandos y células unidos a su superficie; alteración de las funciones de linfocitos, macrófagos y granulocitos; la modulación del sistema complemento; y la modulación de otras respuesta inmunes inflamatorias del hospedero (Lightowlers M.W. & Richard M.D., 1988).

El termino inmunomodulación es usualmente definido como "un cambio en el sistema inmune, causado por agentes que activan o suprimen su función". El quiste hidático secreta y expone numerosas moléculas inmunomoduladoras al sistema inmune del hospedador. Estas moléculas podrían ser capaces de modular tanto las respuestas de la inmunidad innata como la adaptativa, y aparentemente tendrían como blanco tanto las respuestas celulares como humorales (Siracusano *et al*., 2008).

El principal antígeno con características inmunomoduladoras presente en liquido hidatico de *E. granulosus* es el antígeno lipoproteico llamado antígeno B (AgB) (Mamuti W. *et al*., 2006). La abundancia del AgB en el liquido hidático sugiere que este antígeno podría tener un rol biológico importante en la infección por *E. granulosus* (Siracusano A. *et al*., 2008). El AgB podría eventualmente influenciar el balance de las respuestas tipo Th1/Th2 preferencialmente hacia un perfil tipo Th2, ya que PBMC de pacientes con hidatidosis estimulados con el AgB producen IL-4 e IL-13, con bajas concentraciones de IFN-γ, pero no producen IL-12 (Riganò R. *et al*., 2001).

Los glicoconjugados son componentes importantes de la capa laminar del quiste y del tegumento del protoscólex (McManus & Bryant, 1995) y podrían ser capaces de inducir una fuerte respuesta de anticuerpos durante la etapa crónica de la infección experimental. La respuesta de anticuerpos en el modelo experimental de la hidatidosis secundaria ha sido bien caracterizada. (Ferragut & Nieto, 1996; Severi *et al*., 1997).

Por otra parte nuestro grupo ha analizado la respuesta de anticuerpos de ratones BALB/c infectados con *E. granulosus* en las etapas temprana de la infección, y ha mostrado que la misma está dirigida principalmente contra epitopes glucidicos (Baz A. *et al*., 1999). Dematteis S. *et al*. (1999) mostraron que los glicoconjugados de protoscólices *E. granulosus* tienen un efecto en la respuesta celular durante la infección temprana en ratones BALB/c. Los autores mostraron que estos glicoconjugados eran reconocidos por el suero de ratones BALB/c infectados, y podría tener una función inmunomoduladora a través de la inducción de la secreción de IL-10. De esta forma,

los glicoconjugados de protoscólices podrían contribuir en la inducción temprana de una respuesta de citoquinas de tipo Th2.

4. Inmunoprotección

Se han realizados diferentes ensayos de inmunización en ratones con resultados de protección satisfactorios (Sun J. *et al*., 2011; Lightowlers M.W. *et al*., 1996; Lightowlers M.W. *et al*., 1999; Siles-Lucas *et al*., 2003; Al-Qaoud K.M. & Abdel-Hafez SK, 2005). Las actuales investigaciones para desarrollar vacunas utilizando un criterio racional y que sea efectiva contra helmintos apuntan en los roles biológicos que juegan las proteínas en el parásito, y en discernir cuales son los mecanismos que induzcan una respuesta inmune efectiva contra los parásitos (Ligthowlers M.W. *et al*., 2004). Las proteínas recombinantes de *E. granulosus* y los péptidos sintéticos han mostrado ser más específicos para propósitos de diagnostico que los antígenos nativos y las fracciones de subunidades purificadas (Carmena D. *et al*., 2006).

Ratones ICR (ratones outbred, son colonias que se mantiene con una composición genética variable cercana, ICR es la sigla de "Imprinting Control Region") inmunizados con miofilina recombinante de *E. granulosus* (r*Eg*.myophilin) una reducción importante de la carga de quistes, observándose además, un aumento en los títulos de IgG1, IgG2a e IgE específicos acompañado por un significativo incremento de los niveles de IFN-γ e IL-4. Es de notar, que los animales del grupo control mostraron niveles aumentados de IL-10, se observó cierta tendencia a estar disminuida en el grupo inmunizado, (Sun J. *et al*., 2011).

Otra proteína que ha mostrado gran eficacia en los ensayos de inmunoprotección es el antígeno EG95. La vacunación en ovinos con EG95 confiere un alto grado de protección frente al desafío de huevos del parásito (Lightowlers M.W. *et al*., 1999). Este ensayo mostro que la vacunación reducía el número de quistes viables en un 99% comparado contra los controles sin vacunar (Lightowlers M.W. *et al*., 1999). EG95 está altamente expresado en las oncosferas, el estadío parasitario que activamente invade al hospedador intermediario (Haag K.L. *et al*., 2009). Sin embargo en oncosferas que no

han sido activadas o han sido recientemente activadas EG95 presenta una distribución limitada a dos pares de células bilaterales, que son células glandulares de penetración (Jabbar A. *et al*., 2011). Esta poca presencia inicial de EG95 en la superficie de las oncosferas sugiere que el parásito no sería susceptible a un anticuerpo inducido por vacuna y ataque mediado por el complemento hasta que algún desarrollo post-oncosfera haya ocurrido (Jabbar A. *et al*., 2011). Además existe variabilidad de EG95 entre distintas especies de Echinococcus, que podría influenciar plegamiento de la proteína (Haag *et al*., 2009). Se ha propuesto que una mezcla de las isoformas de EG95 podría maximizar la eficacia de la vacunación (Haag *et al*., 2009).

Al-Qoaud *et al*., (2005) lograron inducir protección contra la infección secundaria de ratones Balb/c utilizando AgB como antígeno. Sus resultados mostraron un 98% de reducción de carga quística. Esta reducción estaba acompañada de altas concentraciones de IFN-γ secretado por esplenocitos re-estimulados *in vitro*, en comparación con las células de los ratones inmunizados con un homogenizado crudo de fluido hidático o protoscólices. A su vez el análisis cinético de las inmunoglobulinas en los ratones inmunizados con AgB mostraron un aumento persistente de las subclases IgG1 e IgG2a hasta los 5 meses, mientras que IgG3 mostró un declive después de un mes de infección. Mientras que los grupos infectados no inmunizados mostraron un aumento de todas las inmunoglobulinas (Al-Qaoud K.M. & Abdel-Hafez S.K., 2005).

Las proteína 14-3-3 han sido descritas y caracterizadas en varios parásitos, y han sido estudiadas en *E. granulosus* y *E. multilocularis*. Estas son proteínas diméricas acídicas altamente conservadas de 30~kDa encontradas en todos los eucariotas. Funcionan en señalización celular, regulación del ciclo celular, tráfico intracelular, y otros procesos por modulación de interacciones proteína-proteína (Aitken A., 2006), y están presentes tanto en el tejido del metacestodo como en los protoscólex (Siles-Lucas *et al*., 2003). E14t es una proteína del tipo 14-3-3 que se encuentra en *E. multilocularis* y *E. granulosus*. La vacunación con la proteína recombinante E14ζ (porción carboxilo terminal de E14t) en ratones BALB/c, resulta en una reducción en la carga parasitaria

de 97.35% frente al desafío oral de 2000 huevos de *E. multilocularis* (Siles-Lucas *et al*., 2003).

Además de inmunizaciones con proteínas, otros trabajos han inyectado vectores de expresión con promotores murinos que contienen marcos de lectura abierta para distintas citoquinas. Al-Qaoud & Abdel-Hafez SK, (2008) con, inyectaron al día 28 p.i. promotores con marcos de lectura abiertos (ORFs) para IFN-γ, IL-12, o IL-4 a ratones BALB/c infectados con protoscólices. La evaluación de la carga de quistes (determinado como el número total de los quistes multiplicado por el promedio del diámetro de los mismos en cada ratón) a la semana 22 pi.infección, mostró una significativa reducción en los ratones inyectados con IFN-γ e IL-12 (60% y 47% respectivamente). En contraste, los ratones inyectados con IL-4 mostraron un incremento de seis veces en comparación al grupo control (inyectados con plásmidos vacíos) (Al-Qaoud K.M. & Abdel-Hafez S.K., 2008).

5. Objetivos

El objetivo de este estudio es ampliar la información existente sobre la respuesta inmune temprana en infecciones experimentales por *E. granulosus*. Para este propósito en este estudio se realizó un análisis comparativo de la respuesta inmune temprana en cepas murinas endogámicas que muestran diferencias en susceptibilidad frente a la infección secundaria por *E. granulosus*. Específicamente, se estudió en forma comparativa la respuesta de citoquinas a nivel de la cavidad peritoneal y la respuesta de anticuerpo específicos a nivel sistémico en ratones Balb/c (alta susceptibilidad) y C57Bl/6 (baja susceptibilidad) infectados con protoscólices *E. granulosus* (genotipo G1).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales.

Para los experimentos se utilizaron ratones hembras Balb/c y C57Bl/6 de 6-8 semanas de edad obtenido del DILAVE. Se mantuvieron los animales en el Bioterio de Experimentación de la Cátedra de Inmunología (Instituto de Higiene) en condiciones asépticas con ciclos de luz/oscuridad y temperatura controlada, alimentados con ración y agua *ad libitum*.

2. Parásitos.

Los protoescoleces se obtuvieron por punción aséptica de quistes hidáticos bovinos fértiles según Baz A. *et al.* (1995). Los parásitos se lavaron varias veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2 conteniendo gentamicina (40 µg/mL). La viabilidad de los parásitos se determinó por exclusión de eosina (Dematteis S. *et al.*, 2003) y actividad de las células flamígeras (Gurri J., 1963). Se utilizaron solo aquellos lotes con una viabilidad superior al 90%.

3. Infecciones experimentales.

Se inocularon ratones Balb/c (n=4) y C57Bl/6 (n=15) por vía i.p. con una suspensión de 2000 protoescoleces vivos en 200 µL de PBS estéril. Ratones Balb/c (n=5) y C57Bl/6 (n=8) inoculados i.p. con 200 µL de PBS estéril se utilizaron como grupos control.

4. Obtención de suero.

La sangre de ratones infectados y ratones control previamente anestesiados con isofluorano se obtuvo mediante punción capilar y retrorbital. El suero se separó dejando coagular la muestra de sangre durante 2 hs. a 37^{o}C, y se almacenó a -20^{o}C hasta su uso.

5. Obtención de células peritoneales.

Se sacrificaron los animales con distinto tiempo de infección, para Balb/c el día 1: n=9 , y para C57BL/6 en los días 1, 3, 5 y 7 p.i. , por dislocación cervical previa anestesia con isofluorano. Se lavó la cavidad peritoneal de los ratones con 5 mL de medio de cultivo frío RPMI 1640 suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS). La suspensión celular obtenida se centrifugó durante 7 min. a 1200 r.p.m. y a 4ºC y luego se trato con

buffer de lisis de eritrocitos (Lysis Buffer, Sigma). Finalmente, se lavaron tres veces con PBS estéril y frío, se resuspendieron en 500μL de TRIzol® (Invitrogen) y se conservaron a -80C hasta su uso.

6. qRT-PCR para citoquinas.

El análisis por qRT-PCR para citoquinas se realiza sobre células peritoneales totales de ratones para los días 1, 3, 5 y 7 post infección y controles.

6.1 Extracción de ARN.

La extracción de ARNm se realiza siguiendo las indicaciones del fabricante de TRIzol® (Invitrogen). Brevemente, se centrifugan las células obtenidas durante 7 minutos a 1200 r.p.m. y 4C, y se las resuspende en TRIzol® a una concentración de $1x10^7$ células/mL y se congelan a -70 C hasta se procesamiento. Una vez descongeladas se toma una alícuota de 500 µL, se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 g y 4 C, y el sobrenadante obtenido se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregan 100 µL de $CHCl_3$ y se mezcla por inversión suave hasta alcanzar monofase. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifuga la muestra durante 10 min. a 12.000 g y 4 C. Posteriormente, se recolecta la fase acuosa (superior) y se la centrifuga nuevamente en las mismas condiciones. A la fase acuosa resultante se le agrega 250 µL de isopropanol y se deja reposar durante 10 min. a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga la muestra durante 10 min. a 12.000 g y 4 C, y se descarta el sobrenadante. El pellet se lava con 500 µL de etanol 75% y se centrifuga nuevamente durante 10 min. a 12.000 g y 4 C. Luego de descartar el sobrenadante, se deja secar el alcohol remanente durante 30 min. a temperatura ambiente. El pellet final seco se resuspende en 45 µL de H_2O libre de nucleasas y se calienta durante 10 min. a 65^{o}C. Mediante geles de agarosa se analiza la integridad de los ARN extraídos, y se determina la concentración mediante la absorbancia a 260 nm (A_{260}) utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific). La relación A_{260}/A_{280} se utiliza para analizar la contaminación de proteínas (Sambrook & Russel, 2001).

6.2 Tratamiento con DNasa.

La remoción del ADN genómico potencialmente contaminante en la muestra se realiza previo a la transcripción reversa mediante tratamiento con DNasa I (Invitrogen) siguiendo las intrcciones del fabricante. Muy brevemente, se incuba 0.35 UI de DNasa I cada 1 µg de ARN total en la mezcla de reacción durante 15 min. a temperatura ambiente. Luego, se inactiva la enzima mediante la adición de 2.5 mM EDTA y calentamiento durante 10 min. a 65^{o}C.

6.3 RT.

La síntesis de ADN copia (ADNc) se realiza mediante el uso de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incuba conjuntamente 1 µg de ARN con 0.2 µg de primers hexaméricos aleatorios (Invitrogen), 0.5 mM dNTPs (Invitrogen), 10 mM DTT (Invitrogen), 40 UI RNaseOUT (Invitrogen) y 200 UI de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µL. Muy brevemente, la mezcla final de reacción se incuba durante 50 min. a 42^{o}C seguido de una incubación durante 15 min. a 70^{o}C. El ADNc generado se diluye en un volumen final de 80 µL en H_2O libre de nucleasas y se almacena a -20^{o}C.

6.4 Primers.

Las secuencias de los primers específicos a utilizar para la amplificación de los ADNc correspondientes a ARNm murinos para citoquinas (TNFα, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, TGF-β) se muestran en la tabla 1. Los primers se obtuvieron de la empresa Operon. La β-actina de ratón (expresión constitutiva) se utiliza como gen normalizador.

6.5 PCR.

Se realizaran las PCR cuantitativas o en tiempo real (qPCR) utilizando QuantiTech SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizan en un volumen final de 10 µL conteniendo 5 µL de QuantiTech SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) y 2 µL de ANDc (previamente diluido ¼), en presencia de 0.9 µM de cada primer específico. Se realizan las qPCR en un Rotor-Gene 6000 (Corbett Life

Science). Muy brevemente, se desnaturalizan las muestras durante 15 min. a 95^{o}C y seguidamente se aplican 40 ciclos de 15 segundos a 95^{o}C y 1 min. a 60^{o}C.

La calidad del ADNc se estudia analizando la β-actina y solo se incluyen en el análisis aquellas muestras con un valor de Ct menor a 20. Las cantidades relativas de los ARNm en cada muestra se calcularán utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak K.J. & Schmittgen T.D., 2001) donde $\Delta Ct = Ct_{analito} - Ct_{\beta\text{-actina}}$. Se expresan las mismas como el incremento en veces de la muestra en estudio respecto al promedio del grupo control.

PRIMER	**SECUENCIA**	**PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)**
β-actina-F	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	68
β-actina-R	CGTCATCCATGGCGAACTG	
IL-10-F	CATTTGAATTCCCTGGGTGAGA	101
IL-10-R	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	
IL-6-F	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	78
IL-6-R	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	
TNFα-F	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	63
TNFα-R	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	
IL-17A-F	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	69
IL-17A-R	GGGTCTTCATTGCGGTGG	
IFNγ-F	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	143
IFNγ-R	CCGCTTCCTGAGGCTGGAT	
IL-4-F	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	95
IL-4-R	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	
p35-IL12-F	ATCACACGGGACCAAACCA	72
p35-IL12-R	CAGGCAACTCTCGTTCTTGTGTAGT	
IL-5-F	AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT	117

IL-5-R	TCCAATGCATAGCTGGTGATT	
IL-13-F	GGAGCTGAGCAACATCACACA	142
IL-13-R	GGTCCTGTAGATGGCATTGCA	
IL-2-F	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	92
IL-2-R	CTTTCAATTCTGTGGCCTGCTTGGG	
IL-15-F	CATCCATCTCGTGCTACTTGTGTT	101
IL-15-R	AGGGAGACCTACACTGACACAGCCCAAAA	

Tabla 1. Primers específicos de secuencias murinas para qPCR de citoquinas. Se indica la secuencia para cada uno de los primers (forward y reverse) y el tamaño de los productos amplificados en pares de bases (pb).

7. Cuantificación de anticuerpos totales por ELISA.

La cuantificación de anticuerpos totales de los isotipos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 se realizó mediante ELISA de captura. Muy brevemente, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C con diluciones adecuadas de antisueros de cabra anti-isotipos de ratón (Sigma) en PBS. Se descartaron los sobrenadantes y se bloqueo con 200 µL/pocillo de PBS-Seroalbúmina Bovina (BSA)(1%) incubando durante 1 h. en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se descarto el sobrenadante y se lavaron las placas dos veces con 200 µL/pocillo de PBS-Tween(0.05%), incubando 3 min. cada vez, y se dispensaron 100 µL/pocillo de las muestras diluidas en PBS-BSA(1%)–Tween(0.05%). Se emplearon como estándares cada uno de los isotipos de ratón purificados (Sigma) realizando diluciones seriadas al medio en PBS-BSA(1%)–Tween(0.05%). Se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Luego se descartaron los sobrenadantes, se lavo la placa 3 veces con PBS-Tween(0.05%) y se dispensaron 100 µL/pocillo del segundo anticuerpo (anticuerpo monoclonal específico para cada isotipo conjugado a peroxidasa, Sigma) diluido en PBS-BSA(1%)-Tween(0.05%). Se incubó la placa durante 1 h. en cámara húmeda a 37°C y luego se lavaron 4 veces con PBS-Tween(0.05%), con un lavado final

con PBS. Por último, se dispensaron 100 µL/pocillo de solución de H_2O_2 30% como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) con agua MiliQ como cromógeno y se incubó durante 30 min. en cámara húmeda a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL/pocillo de H_2SO_4 3M y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro para placas (Titertek Multiscan Plus, Flow Laboratories, Helsinski, Finlandia).

8. Detección de anticuerpos específicos contra antígenos somáticos de protoescólex por ELISA.

Se analizó por ELISA los títulos de anticuerpos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 específicos contra antígenos somáticos de protoescólex (PSA) en suero. Muy brevemente, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C con PSA (10 µg/mL en proteínas) diluidos en PBS. Se descartaron los sobrenadantes y se bloqueó con 200 µL/pocillo de PBS-BSA(1%) incubando durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de descartas el sobrenadante, las placas se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de PBS-Tween(0.05%), incubando 3 min. cada vez, y se dispensaron 100 µL/pocillo de las muestras diluidas en PBS-BSA(0.5%)-Tween(0.05%). Se incubaron las placas durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de descartar los sobrenadantes y lavar las placas 3 veces con PBS-Tween(0.05%), se dispensaron 100 µL/pocillo de anticuerpo monoclonal específico para cada isotipo conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido en PBS-BSA(1%)-Tween(0.05%). Se incubaron las placas durante 1 h. en cámara húmeda a 37°C y luego se lavaron 4 veces con PBS-Tween(0.05%), con un lavado final con PBS. Por último, se dispensaron 100 µL/pocillo de solución de H_2O_2 30% como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) con agua MiliQ como cromógeno y se incubó durante 30 min. en cámara húmeda a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL/pocillo de H_2SO_4 3M y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro para placas (Titertek Multiscan Plus, Flow Laboratories, Helsinski, Finlandia).

9. Análisis estadístico de los datos.

Para evaluar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales y sus controles, se utilizó el test Mann-Whitney-Wilcoxon.

RESULTADOS

1.- Niveles tempranos de expresión de ARNm para citoquinas en células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados con protoscoleces de *E. granulosus*

Los resultados obtenidos por Cucher *et al*., (comunicación personal) muestran una diferencia bien importante en el resultado de la infección entre ratones de las cepas de Balb/c y la C57Bl/6.Esto nos llevó a plantear la hipótesis que el resultado de la infección, en estos dos modelos experimentales, podría estar asociado con una expresión diferencial del perfil de citoquinas en las primeras etapas de la infección secundaria por *E. granulosus*.

Por esta razón, se analizó en células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados, la expresión de varias citoquinas asociadas a perfiles de tipo-Th1/Th2 por qRT-PCR, durante un periodo de tiempo similar al considerado por Mourglia-Ettlin et al. (2011a) en ratones de la cepa Balb/c. Concretamente, se determinó en los días 1, 3, 5 y 7 pi., la expresión de ARNm para TNFα, IFN-γ, IL-2, IL-12, IL-15, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF-β sobre células peritoneales totales de ratones C57Bl/6 infectados con protoscoleces de *E. granulosus*.

Realizando un agrupamiento entre citoquinas que son tipo-Th1 (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12, IL-15) y aquellas que son tipo-Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), los resultados obtenidos fueron bien interesantes. En el caso de la expresión de citoquinas asociadas con un perfil tipo-Th1 (Figura 1), se observó un aumento significativo y sostenido en el nivel de expresión de IFN-γ en los días 1, 3 y 5 con respecto al grupo control. En cuanto a la expresión de TNF-α, el nivel fue mayor significativamente mayor al día 1, para luego pasar, en los días 3 y 5 a niveles de expresión no significativamente diferentes, y finalmente hacia día 7 pi. se observó una represión en el nivel de expresión; todos ellos referidos al grupo control (Figura 1A y 1B). Con respecto a las otras citoquinas, IL-15, IL-2 e IL-12, no se observó un cambio significativo con respecto al grupo control, con excepción de una represión en el nivel de expresión de IL-12 al día 7 pi., (Figura 1C).

En cuanto a la expresión de citoquinas asociadas con un perfil tipo-Th2, de manera interesante se observó un nivel de IL-5 significativamente mayor que el grupo control en todo el periodo de tiempo analizado (Figura 2B). Los niveles de IL-6 estuvieron significativamente aumentados recién hacia los días 5 y 7 (Figura 2E), mientras que el nivel de IL-4 e IL-13 fue significativamente mayor al grupo control, al día 7 y en los días 5-7, respectivamente (Figura 2C y 2D). Sorprendentemente, el nivel de expresión para IL-10 fue siempre no significativamente diferente al grupo control (Figura 2A).

Estos resultados en su conjunto muestran que, al día 7 pi. A expresión de citoquinas claramente es de tipo-Th2, concomitantemente con una expresión reprimida o similar de citoquinas asociadas con un perfil tipo-Th1 (IL-12, TNF-α e IFN-γ) a las observadas en el grupo control. Sin embargo, en una etapa más temprana de la infección se expresan niveles significativos de IFN-γ, TNF-α e IL-5. Estos resultados preliminares, son bien interesantes ya que estas citoquinas podrían estar relacionadas con el reclutamiento y activación de macrófagos, neutrófilos y/o eosinófilos (Klion A.D. *et al.*, 2004; Shim M.H. *et al.*, 2009) hacia el sitio en donde la infección se establece.

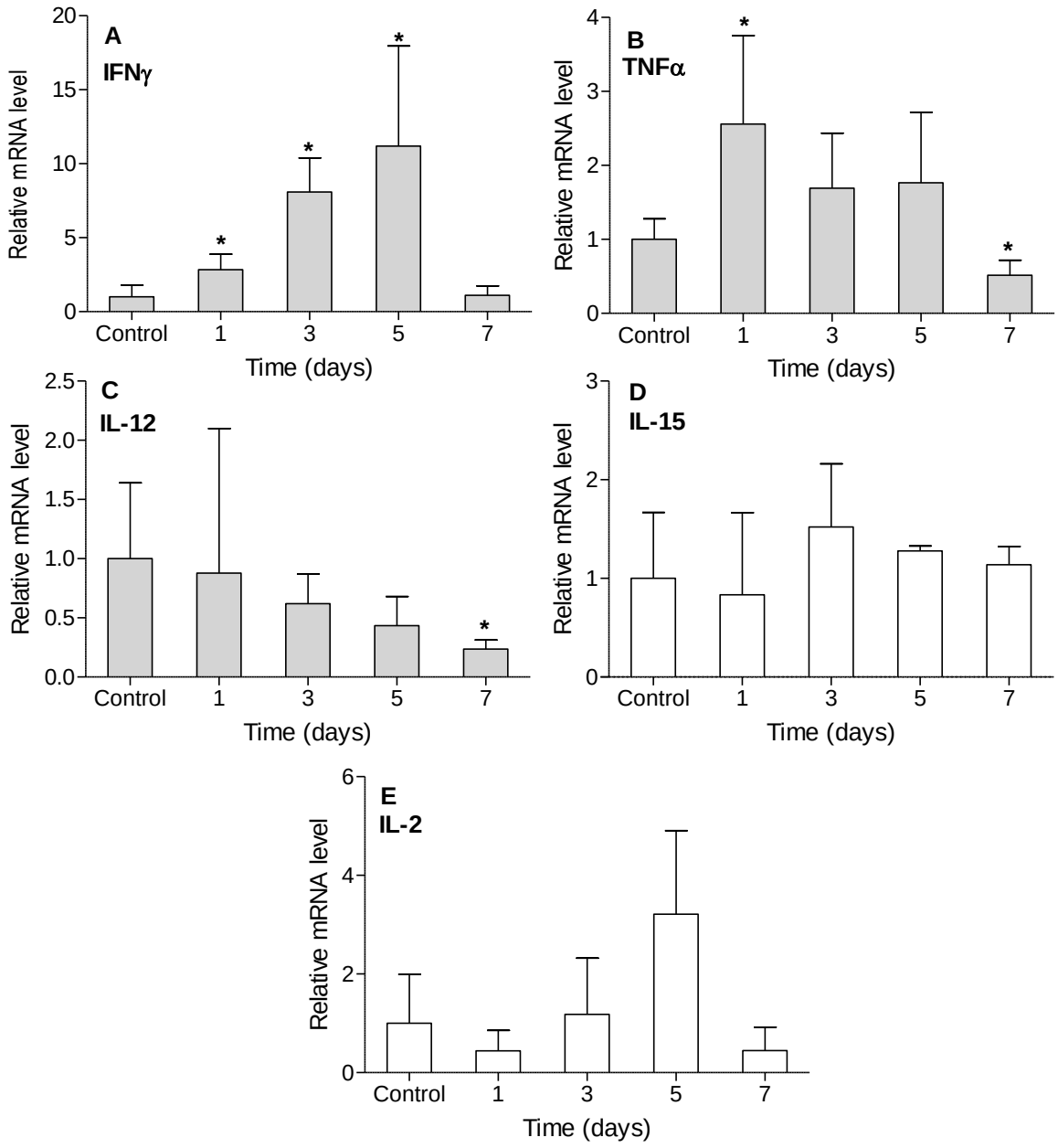

Figura 1. Expresión de citoquinas asociadas a un perfil tipo Th1 en C57BL/6. Se infectó un grupo de ratones C57BL/6 (n=12) con 2000 protoscoleces/ratón por vía i.p. y otro grupo (n=8) se inoculó con igual volumen de PBS estéril (grupo control). Luego de 1, 3, 5 y 7 días p.i. se sacrificó 3 animales infectados y 2 del grupo control. Niveles relativos de ARNm para IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12 e IL-15, fueron medidos a partir de células peritoneales totales por qRT-PCR. Las barras representan el valor promedio de los datos y las líneas verticales la

desviación estándar. Los resultados se analizaron utilizando el test de Wilcoxon's, las diferencias significativas ($p<0,05$) respecto al grupo control se indica con un asterisco (*).

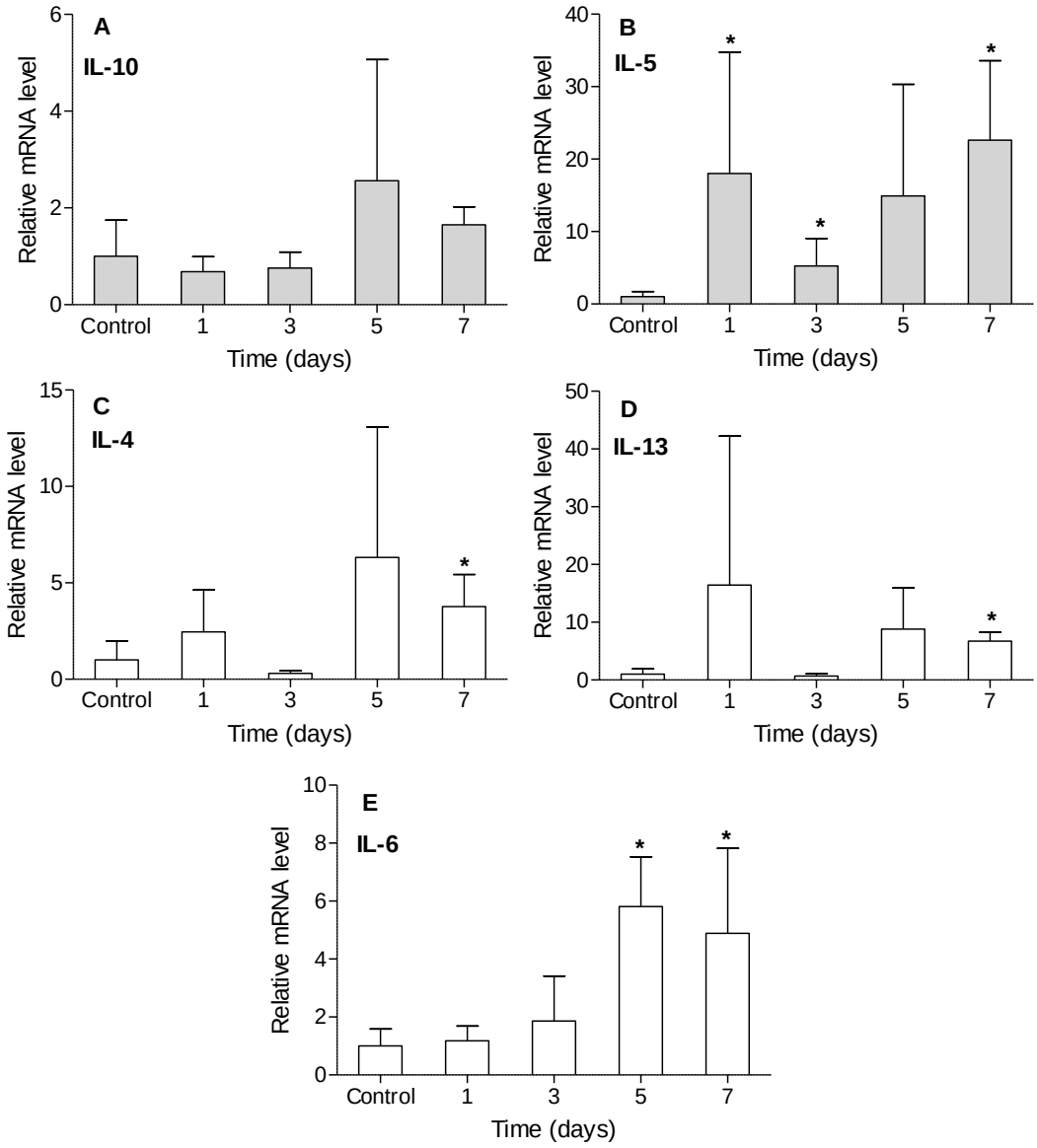

Figura 2. Expresión de citoquinas asociadas a un perfil Th2 en C57BL/6. Se infectó un grupo de ratones C57BL/6 (n=12) con 2000 protoscoleces/ratón por vía i.p. y otro grupo (n=8) se inoculó con igual volumen de PBS estéril (grupo control). Luego de 1, 3, 5 y 7 días p.i. se sacrificó 3 animales infectados y 2 del grupo control. Niveles relativos de ARNm para IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 fueron medidos a partir de células peritoneales totales. Las barras representan el valor promedio de los datos y las líneas verticales la desviación estándar. Los resultados se analizaron utilizando el test de Wilcoxon's, las diferencias significativas ($p<0,05$) respecto al grupo control se indica con un asterisco (*).

Por otra parte, se analizó la expresión de citoquinas en células peritoneales de ratones Balb/c al día 1 pi. Los resultados se muestran en la Figuras 3 y 4, también bajo forma de agrupamiento de las citoquinas de tipo-Th1 y tipo-Th2. Se comparan además, con los niveles de expresión de las diferentes citoquinas obtenidos en el experimento anterior al día 1 pi., en ratones C57BL/6.

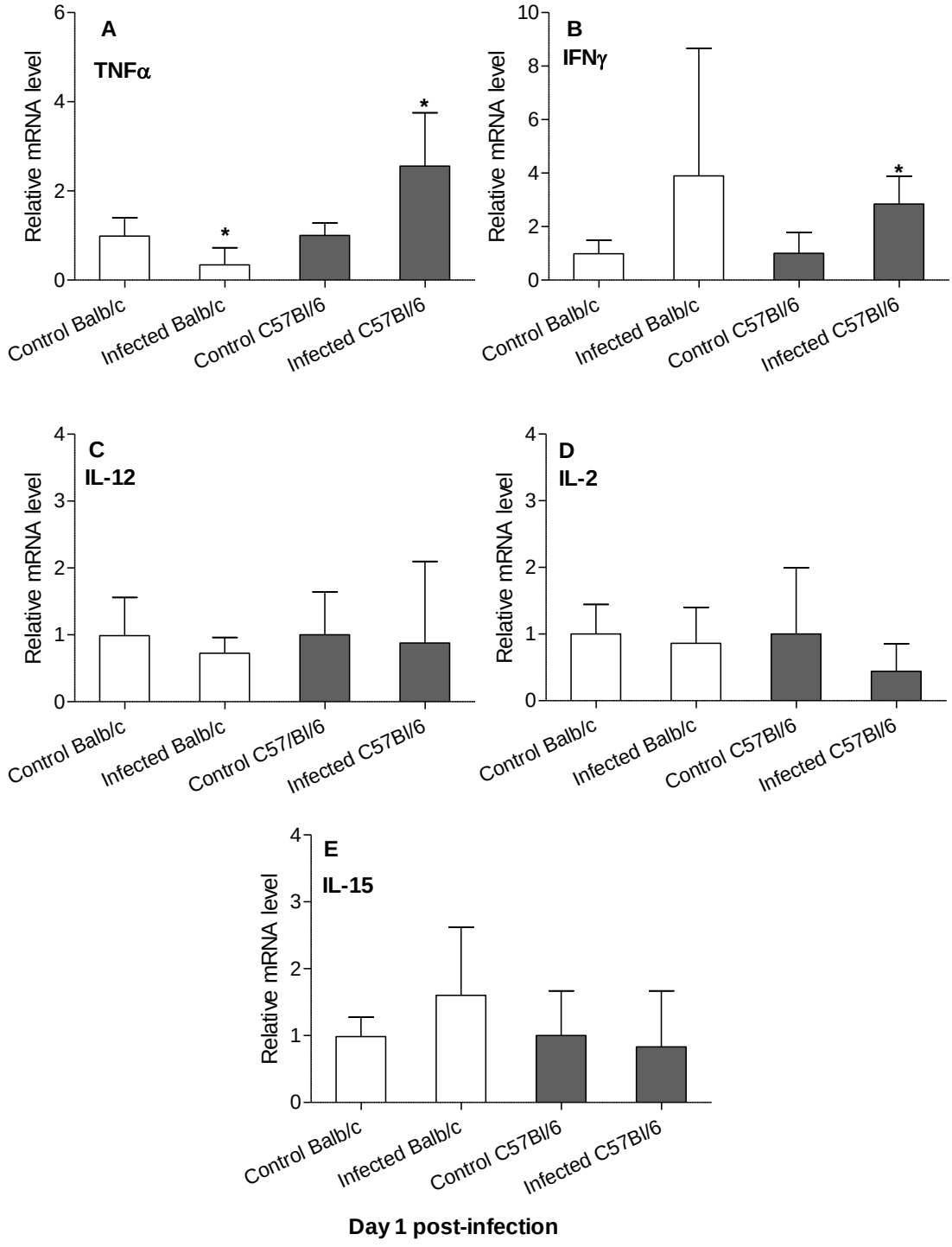
A
TNFα
Relative mRNA level
6
4
2
0
*
*
Control Balb/c
Infected Balb/c
Control C57Bl/6
Infected C57Bl/6
B
IFNγ
Relative mRNA level
10
8
6
4
2
0
*
Control Balb/c
Infected Balb/c
Control C57Bl/6
Infected C57Bl/6
C
IL-12
Relative mRNA level
4
3
2
1
0
Control Balb/c
Infected Balb/c
Control C57/Bl/6
Infected C57Bl/6
D
IL-2
Relative mRNA level
4
3
2
1
0
Control Balb/c
Infected Balb/c
Control C57Bl/6
Infected C57Bl/6
E
IL-15
Relative mRNA level
4
3
2
1
0
Control Balb/c
Infected Balb/c
Control C57Bl/6
Infected C57Bl/6
Day 1 post-infection

Figura 3. Expresión de citoquinas asociadas a un perfil tipo-Th1 al día 1 pi, en células peritoneales de ratones Balb/c y C57Bl/6. Se infectó un grupo de ratones BALB/c (n=4) con 2000 protoscoleces/ratón por vía i.p. y otro grupo (n=5) se inoculó con igual volumen de PBS estéril (grupo control). Luego al dia 1 p.i. se sacrificaron los 4 animales infectados y los 5 del grupo control. Niveles relativos de ARNm para IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12 e IL-15 fueron medidos a partir de células peritoneales totales. Las barras representan el valor promedio de los datos y las líneas verticales la desviación estándar. Los resultados se analizaron utilizando el test de Wilcoxon's, Las diferencias significativas ($p<0.05$) de los ratones infectados respecto al grupo control se indican con un asterisco (*).

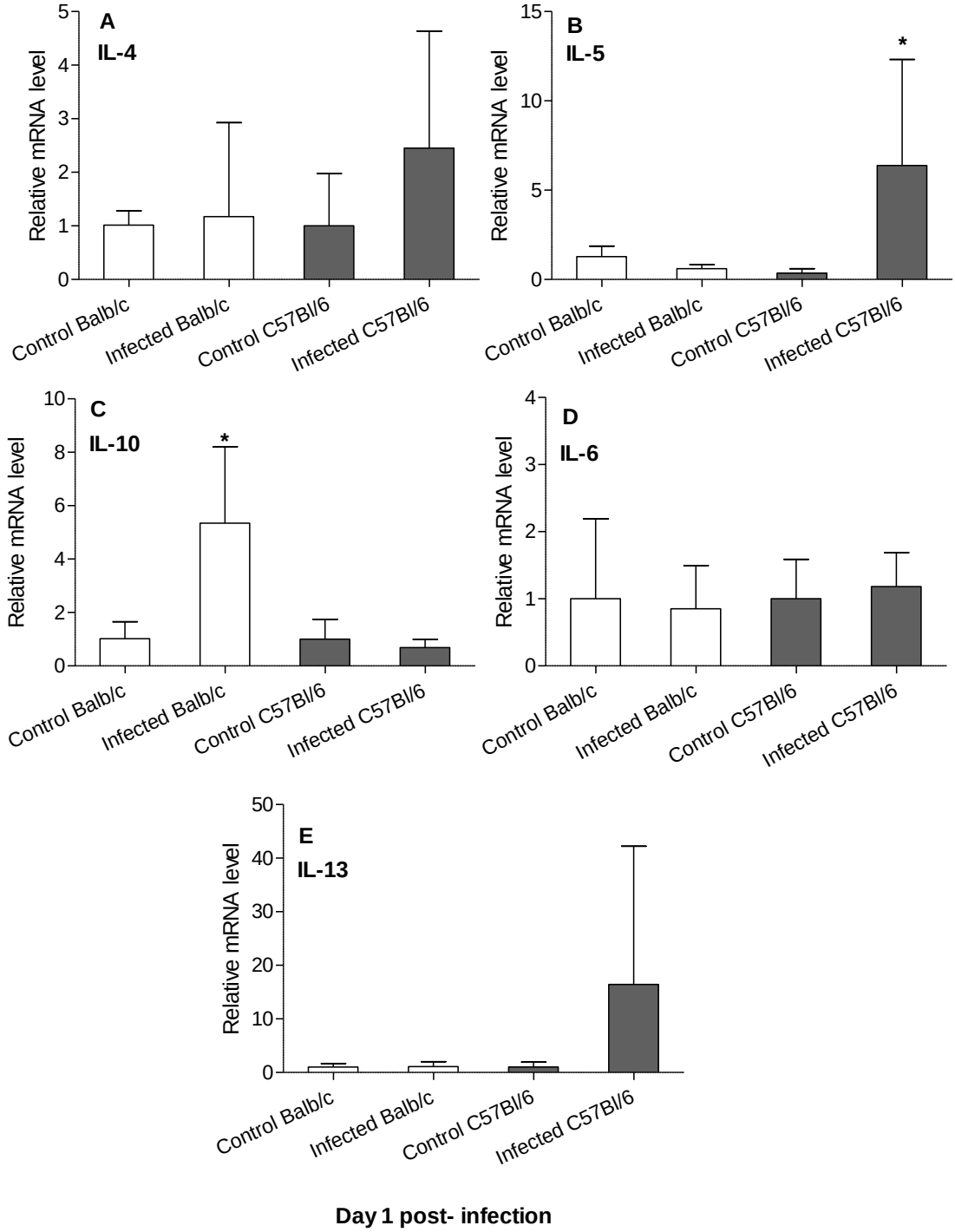

Figura 4. Expresión de citoquinas asociadas a un perfil tipo-Th2 a día 1 pi, en células peritoneales de ratones Balb/c y C57Bl/6. Se infectó un grupo de ratones BALB/c (n=4) con 2000 protoscoleces/ratón por vía i.p. y otro grupo (n=5)

se inoculó con igual volumen de PBS estéril (grupo control). Luego al día 1 p.i. se sacrificaron los 4 animales infectados y los 5 del grupo control. Niveles relativos de ARNm para IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 fueron medidos a partir de células peritoneales totales. Las barras representan el valor promedio de los datos y las líneas verticales la desviación estándar. Los resultados se analizaron utilizando el test de Wilcoxon's, las diferencias significativas ($p<0.05$) de los ratones infectados respecto al grupo control se indican con un asterisco (*).

Interesantemente, al día 1 pi el nivel de expresión de ARNm para TNF-α aparece reprimido en la cepa Balb/c mientras que en C57Bl/6 se encuentra aumentado respecto a sus respectivos grupos control (Figura 3). Esta citoquina participa en la activación del neutrófilo (Al-Qaoud K.M. *et al*., 2000), célula que juega un rol clave en el comienzo de muchos tipos de infecciones. Por otro lado el IFN-γ al día 1 pi ya se encuentra aumentado respecto a su grupo control en la cepa C57Bl/6, lo cual es más que interesante pues esta citoquina tiene un papel preponderante en la activación de muchas funciones del sistema inmune.

Los resultados al día 1 pi de las citoquinas de tipo Th2 en la cepa Balb/c muestran solo el aumento significativo de IL-10, lo cual es más que interesante por diversas razones (Figura 4). Por ejemplo, esta citoquina está asociada con actividades anti-inflamatorias, y tiene una gran influencia en las respuestas inmunes (Mosser D.M. & Zhang X., 2008).

Por otra parte, la citoquina IL-5 al día 1 pi marca otra diferencia en el perfil de expresión de citoquinas Th2 entre las cepas, la cual se encuentra significativamente aumentada respecto a su grupo control en C57Bl/6 y no así en Balb/c.

2. Respuesta sistémica de Anticuerpos Específicos contra PSA.

El hecho que células peritoneales de ratones infectados de estas dos cepas mostraran diferente expresión del perfil de citoquinas, nos llevo a estudiar si podrían también existir diferencias a nivel de la respuesta sistémica de anticuerpos específicos. Por esta razón, se analizó por ELISA el titulo de anticuerpos IgM, IgG1,

IgG2a, IgG2b e IgG3 específicos contra antígenos somáticos de protoscoleces (PSA) en suero de ratones C57BL/6 y BALB/c infectados en los días 0, 1 y 5 pi. (Figura 5).

Ni los ratones Balb/c, ni los C57Bl/6, mostraron un titulo de IgG1, IgG2a e IgG3 específicas significativamente diferente al de su respectivo grupo control. Sin embargo, los títulos de IgM e IgG2b mostraron diferencias interesantes entre las dos cepas de ratones estudiadas. El titulo de IgM únicamente mostró estar significativamente aumentado en la cepa Balb/c y solo al día 5 pi. Con respecto al título de IgG2b específicas, los ratones Balb/c mostraron títulos significativamente mayores al grupo control en los días 1 y 5 pi. Sin embargo, en el caso de los ratones C57Bl/6 el título de IgG2b solo se observó un aumento significativo al día 1 pi.

En resumen, los ratones C57Bl/6 muestran, al día 1 pi, únicamente niveles de IgG2b específicos significativamente mayores respecto a su grupo control. Interesantemente al día 5 pi solo los ratones Balb/c muestran niveles significativos de IgM e IgG2b, lo cual es coincidente con los resultados obtenidos por Mourglia-Ettlin G. *et al*. (2011a).

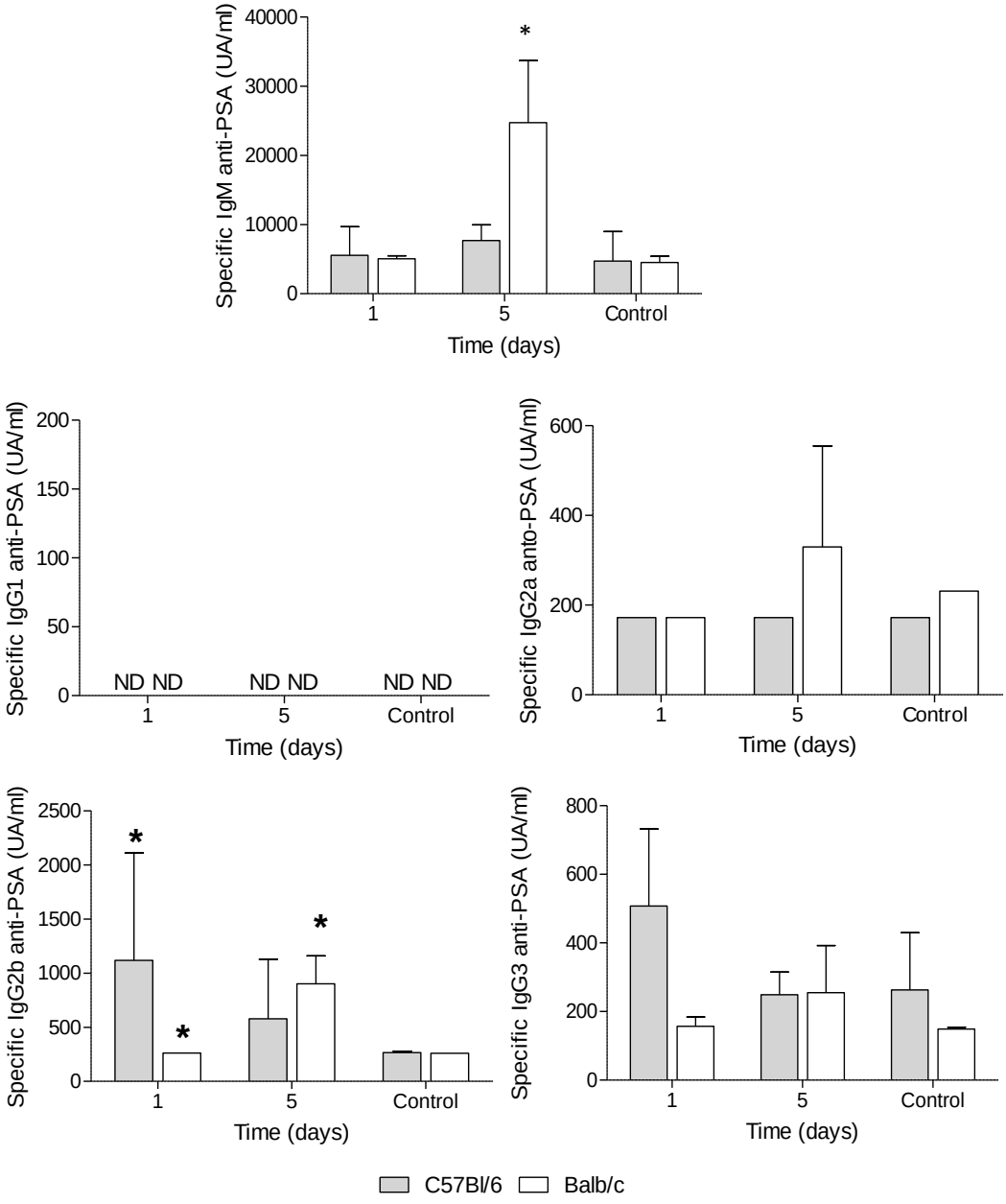
Specific IgM anti-PSA (UA/ml)
40000
30000
20000
10000
0
*
1
5
Control
Time (days)
Specific IgG1 anti-PSA (UA/ml)
200
150
100
50
0
ND ND
ND ND
ND ND
1
5
Control
Time (days)
Specific IgG2a anto-PSA (UA/ml)
600
400
200
0
1
5
Control
Time (days)
Specific IgG2b anti-PSA (UA/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
*
1
5
Control
Time (days)
Specific IgG3 anti-PSA (UA/ml)
800
600
400
200
0
1
5
Control
Time (days)
C57Bl/6
Balb/c

Figura 5. Respuesta sistémica de anticuerpos específicos en ratones C57Bl/6 y Balb/c infectados con protoscoleces de *E. granulosus*. Se determinó por ELISA el título específico de anticuerpos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en suero contra antígenos somáticos de protoscólex (PSA). Los ratones fueron sangrados en al día 1 pi y al día 5 pi. Los resultados fueron analizados utilizando el test no de Wilcoxon's, la diferencia significativas ($p<0.05$) de los ratones infectados respecto al grupo control se indican con un asterisco (*). Las barras representan el valor medio del grupo y las líneas verticales la desviación estándar.

DISCUSIÓN

Resultados recientes obtenidos por Cucher M. *et al*. (manuscrito en preparación) demuestran que la cepa de ratones C57Bl/6 tiene una menor susceptibilidad a la infección secundaria por *E. granulosus* que la cepa de ratones Balb/c. Esto nos llevó a plantearnos la siguiente hipótesis: "la diferencia en la susceptibilidad entre estas dos cepas de ratones puede estar asociada con una expresión diferencial en el perfil de citoquinas en el sitio en donde la infección se establece". Por otra parte, una parte importante de los eventos tempranos a nivel peritoneal de ratones Balb/c infectados por *E. granulosus* fue recientemente reportada por Mourglia-Ettlin G. *et al*. (2011a). Por esa razón, el presente trabajo está centrado en un análisis de la expresión de citoquinas en células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados con protocoleces de *E. granulosus,* durante un periodo de tiempo post-infección similar (aunque no exactamente igual) a aquel seleccionado por Mourglia-Ettlin G. *et al*., (2011a).

Para esto, se determinó la expresión de citoquinas tipo-Th1 (IFN-γ, IL-12, TNF-α, IL-2 e IL-15) y tipo-Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 e IL-13) en células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados, en los días 1, 3, 5 y 7 pi. Para facilitar el análisis se muestran por separado los resultados obtenidos para las citoquinas tipo-Th1 (Figura 1) y para las tipo-Th2 (Figura 2). La Figura 1 muestra que en los días 1, 3 y 5 pi., los ratones infectados expresan niveles significativamente aumentados de IFN-γ, mientras que en el caso del TNF-α, el nivel de expresión solo fue significativamente mayor al día 1 pi., en ambos casos comparados con respecto al grupo control. Sin embargo, en el caso de la expresión de IL-2, IL-12 e IL-15, los niveles no fueron significativamente diferentes al grupo control, durante todo el período de tiempo en que este análisis fue realizado. Con respecto al nivel de expresión de citoquinas tipo-Th2 observado antes del día 5 pi., (Figura 2) únicamente se detectaron niveles significativamente mayores al grupo control en el caso de la IL-5. Estos resultados preliminares en su conjunto, son bien interesantes ya que indican antes del días 5 pi., de todas las citoquinas analizadas solo se observa una expresión significativa de IFN-γ, TNF-α y de IL-5. Este perfil temprano de expresión de citoquinas es bien diferente al reportado recientemente por Mourglia-Ettlin G. *et al*. (2011a). En efecto, estos autores reportaron que antes del dia 5 pi.,

células peritoneales de ratones Balb/c infectados con *E. granulosus*, muestran niveles de expresión significativamente mayores, al grupo control, de IL-2, IL-15, IFN-γ y de IL-10. Los autores proponen que la IL-2 y la IL-15 podrían estar involucradas en la activación y proliferación de células NK, las que a través de la secreción de IFNγ, podrían a su vez activar macrófagos peritoneales. Estas últimas, podrían in vivo tener un efecto potencialmente dañino sobre el parásito, al igual que como fue descrito previamente in vitro (Dematteis S. *et al*., 2003). Aunque la respuesta inmune que genera la cepa de ratones Balb/c en las primeras etapas de la infección no es protectora, ya que la infección se establece, podría ser responsable de la eliminación de un número importante (93%) de los protoscoleces (PSC) que se administran (Cucher *et al*., manuscrito en preparación). El resto de los PSC del inoculo (7%), podrían diferenciarse a quiste a través de mecanismos de evasión y/o modulación de la respuesta del hospedador que favorezcan su sobrevida (Baz A. *et al*., 1998; Rogan M.T. & Craig P.S., 1997; Rogan M.T., 1998; Dematteis S. et al., 1999).

Sin embargo, en el caso de los ratones C57Bl/6 solamente el 2% del inoculo inicial de PSC es capaz de diferenciarse a quiste, observándose además una importante reducción de la carga parasitaria (Cucher M. *et al*., manuscrito en preparación). La diferencia en la expresión del perfil de citoquinas antes del día 5 pi., sugiere que los mecanismos protoscolicidas en esta cepa de ratones podrían ser diferente al propuesto por Mourglia-Ettlin G. *et al*. (2011a), aunque es claro que un análisis más profundo debe realizarse en la cepa de ratones C57BL/6. Sin embargo, algunas hipótesis podrían plantearse. Desde hace bastante tiempo se conoce que la IL-5 tiene un papel esencial en la activación de los eosinófilos asi como sobre la eosinofilia. La IL-5 es sintetizada predominantemente por linfocitos Th2, pero también aunque en menores cantidades por otros tipos celulares como los mastocitos y los eosinófilos. Walker C. *et al*. (1998) utilizando un modelo de inflamación alérgica en ratones C57Bl/6, mostraron que las células NK son capaces de secretar *in vivo* IL-5, y que además estas células contribuyen en el desarrollo de la respuesta inflamatoria mediada por eosinófílos a nivel de la cavidad peritoneal (Walker C. *et al*., 1998). Teniendo en cuenta que los eosinofilos

tienen un papel efector importante en algunas infecciones por helmintos (Klion A.D. *et al*., 2004), podrían también tener un papel importante en la infección de ratones C57Bl/6 con *E. granulosus.* Esto podría estar apoyado por lo descrito por Ramos *et al*. (2006) donde muestran que in vitro la proteína cationica recombinante de eosinófilos humanos es capaz de dañar protoscoleces in vitro (Ramos A. *et al*., 2006).

Por otra parte, se ha reportado que los neutrófilos tendrían también un papel importante en las infecciones por helmintos (Al-Qaoud *et al*., 2000; Panopoulos A.D. *et al*. 2008). Rajan *et al*., (2002) y Ramalingam *et al*., (2003) utilizando el modelo de infección experimental por *Brugia malayi* y *Brugia pahangi,* mostraron que 24 horas pi., la principal población celular aumentada en cavidad peritoneal de ratones infectados eran neutrófilos. Además, observaron que 48 horas pi. el número de estas células disminuye, y que desaparece completamente al día 3 pi. Al-Qaoud *et al*. (2000) infectando ratones Balb/c con *L. sigmodontis*, reportaron que la producción de IL-5 resultaba esencial para la formación de nódulos inflamatorios, dependientes de los neutrófilos, alrededor del parásito los cuales mediaban el control de la infección. Además, mostraron que en los ratones tratados con anti-IL-5, los niveles de citoquinas conocidas en promover directamente la acumulación de neutrófilos como TNF-α, el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF) y KC (IL-8) estaban fuertemente reducidos, mientras que el nivel de IL-10 (citoquina que desactiva a los neutrófilos) estaba aumentado (Al-Qaoud *et al*., 2000).

Por otra parte Saeftel *et al*. (2003) observaron también que durante la infección por *L. sigmodontis*, el IFN-γ y la IL-5 actuaban de forma sinérgica en el control de la infección. Según los autores, estos efectos sinérgicos para el control de este parásito estaban, al menos en parte, mediado por los neutrófilos. Además, mostraron que deficiencias en la producción de IL-5 y/o IFN-γ, reducían el nivel de TNF-α secretado por macrófagos de la cavidad torácica, citoquina importante para el reclutamiento de neutrófilos (Saeftel *et al*., 2003).

De acuerdo a los datos existentes hasta el momento, y teniendo en cuenta que las células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados con *E. granulosus*, expresan inicialmente INF-γ, TNF-α e IL-5, podría ser posible que exista un reclutamiento temprano de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal, y que junto con macrófagos y eosinófilos estas células puedan mediar mecanismos efectores con actividad protoscolicida.

Considerando los resultados obtenidos, a partir del día 5 pi. el perfil de la expresión de citoquinas en células peritoneales de ratones C57Bl/6 infectados, sufre un cambio hacia un típico perfil tipo-Th2. En efecto, los resultados (Figura 2) muestran que se produce un aumento significativo en los niveles de expresión de IL-4, IL-5, IL-16 e IL-13 concomitantemente con una represión (Figura 1) en los niveles de IFNγ y de IL-12. Estos resultados son coincidentes con los reportados por Mourglia-Ettlin G. *et al*. (2011a), para la cepa Balb/c. En efecto, los autores reportan que hacia el día 5-7 pi., se produce un cambio en la expresión de citoquinas hacia un perfil tipo Th2. Esto podría explicar porque también en ratones de la cepa C57Bl/6 algunos de los PSC (aunque menos que en el caso de la cepa Balb/c) logran desarrollarse a quiste. En su conjunto, estos resultados sugieren que *E. granulosus* sería capaz de inducir un rápido cambio en la expresión de citoquinas hacia un típico perfil tipo-Th2 para favorecer su sobrevida.

El segundo conjunto de experimentos estuvo basado en la comparación entre estas dos cepas de ratones de los niveles de expresión de citoquinas en células de cavidad peritoneal tan pronto como al día 1 pi. Los resultados (Figuras 3 y 4) muestran que como se mencionó anteriormente los ratones C57Bl/6 expresan niveles aumentados y significativos de TNF-α, IFN-γ y de IL-5 con respecto a su grupo control. Sin embargo, en los ratones Balb/c solamente se observan niveles de expresión significativamente aumentados de IL-10, mientras que la expresión de TNF-α está reprimida con respecto al grupo control.

Estos resultados, juntos con los obtenidos en el primer conjunto de experimentos, mas los reportados por Mourglia-Ettlin *et al*. (2011a), son bien interesantes ya que muestran

que la expresión de niveles significativos de IL-10 en cavidad peritoneal de ratones Balb/c infectados se produce a partir del día 1 pi., y además en forma sostenida hasta el día 9 pi. Por el contrario, el nivel de expresión de esta citoquina en los ratones C57Bl/6 nunca fue significativamente diferente al del grupo control. Teniendo en cuenta la importante función reguladora de la IL-10, su expresión local, temprana y sostenida en ratones Balb/c, podría estar asociada con la mayor susceptibilidad a la infección de esta cepa de ratones comparada con la observada en ratones C57Bl/6.

Finalmente, el último conjunto de experimentos estuvo centrado en el análisis comparativo de los niveles de anticuerpos sistémicos específicos (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) contra antígenos de protoscolex (PSA) entre las dos cepas de ratones en los días 1 y 5 pi. Los resultados mostrados en la Figura 5, indican que los ratones C57Bl/6 muestran únicamente títulos de IgG2b específicas significativamente diferentes al grupo control al día 1 pi. Sin embargo, los ratones Balb/c muestran títulos de IgM especificas significativamente mayores que el grupo control al día 5 pi; mientras que los títulos de IgG2b especificas estuvieron significativamente aumentados tanto al día 1 como al día 5 pi. Estos resultados, son por demás interesantes, ya que Mourglia-Ettlin *et al*. (2011a), reportaron que células peritoneales obtenidas al día 5 de ratones Balb/c infectados, eran capaces de secretar in vitro IgM e IgG2b específicas. Si bien es algo que debe ser demostrado, estos resultados podrían indicar que los anticuerpos específicos IgG2b detectados a nivel sistémico tan pronto como al día 1 pi., podrían derivar de células productoras de anticuerpos peritoneales, conectando de esta forma la respuesta local con la sistémica. Es interesante mencionar que en la infección experimental con *T. cruzi*, la cepa de ratones Balb/c es más susceptible a la infección que la cepa de ratones C57BL/6 (Bryan *et al*., 2010). Según estos autores, la respuesta tipo-Th2 en Balb/c está asociada con una amplificación de activación policlonal B que conduce a una disminución de la inmunidad humoral específica, que vuelve la cepa más susceptible. Esto está siendo analizado en estos momentos en nuestro laboratorio para el caso de la infección experimental por *E. granulosus.*

En resumen, estos resultados preliminares (junto con los de otros), tomados en su conjunto muestran que en la primera etapa de la infección experimental (días 1-3), hay una clara diferencia en la expresión de citoquinas tipo-Th1/Th2 en células peritoneales de ratones Balb/c y C57Bl/6 infectados por *E. granulosus*. Mientras que, las células peritoneales de ratones Balb/c muestran una mayor y significativa expresión de los niveles de IFN-γ, IL-15, IL-2 e IL-10 (Mourglia-Ettlin G. *et al*., 2011a); células peritoneales de ratones C57Bl/6 muestran una significativo aumento en expresión de IFN-γ, TNF-α y de IL-5. Esto sugiere que los mecanismos moleculares y celulares que ocurren a nivel local serían diferentes, y podrían ser la base de la susceptibilidad diferencial a la infección entre estas dos cepas de ratones. Sin embargo, hacia el día 5-7 pi, la expresión de citoquinas en las dos cepas de ratones es claramente de tipo-Th2. Este cambio la expresión del perfil de citoquinas observado en estas dos cepas, podrían estar relacionados con mecanismos de evasión/modulación de la respuesta del hospedador activamente inducido por *E. granulosus* para favorecer su sobrevida. Dos escenarios hipotéticos, sobre los eventos inmunológicos que tendrían lugar en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c y C57Bl/6, en la etapa temprana de la infección experimental son mostrados (Figura 6 y Figura 7).

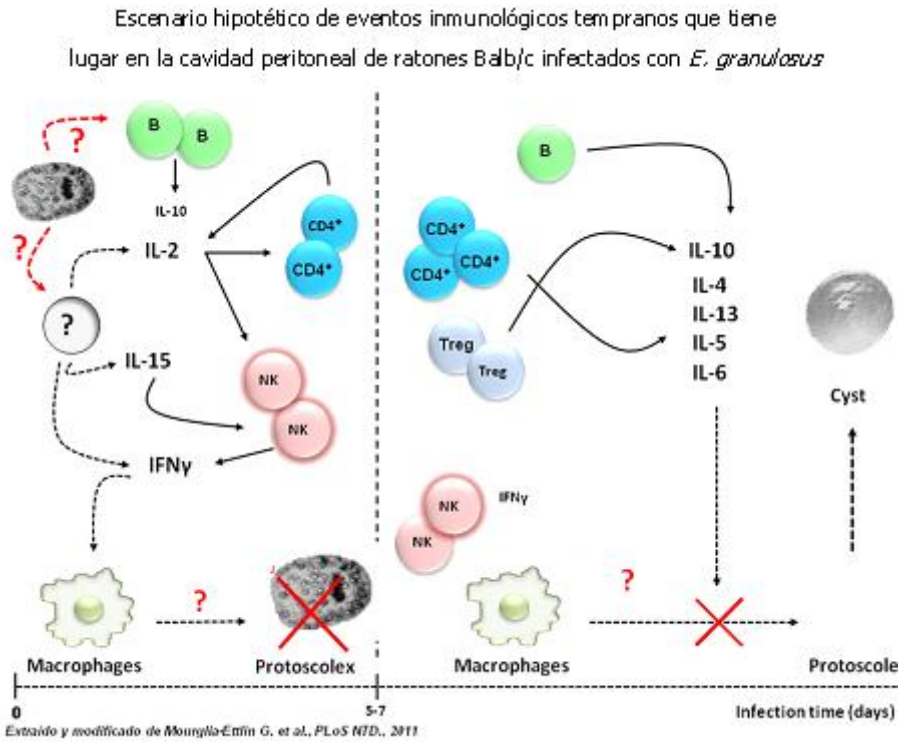

Figura 6. Luego de la administración de protoscoleces a ratones Balb/c solamente el 7% de los parásitos finalmente desarrollan quistes hidáticos. Así, la respuesta inmune temprana, aunque no es óptima en prevenir el establecimiento de la infección, es probablemente no totalmente inefectiva. Mourglia-Ettlin G. *et al.*, (2011a) sugieren que las células NK tendrían un papel importante en la etapa muy temprana de la infección. Células NK activadas a través de la producción de IFNγ podrían ser parcialmente responsables de la activación de macrófagos residentes induciendo su actividad protoscolicida. De esta forma, los macrófagos residentes activados podrían ser parcialmente responsables de la eliminación del 93% del inóculo inicial de protoscoleces. Hacia el día 5-7 pi *E. granulosus* podría ser capaz de sesgar la respuesta de citoquinas hacia un perfil tipo-Th2, bloqueando los efectos disparados inicialmente por el IFN-γ favoreciendo la sobrevida del parásito.

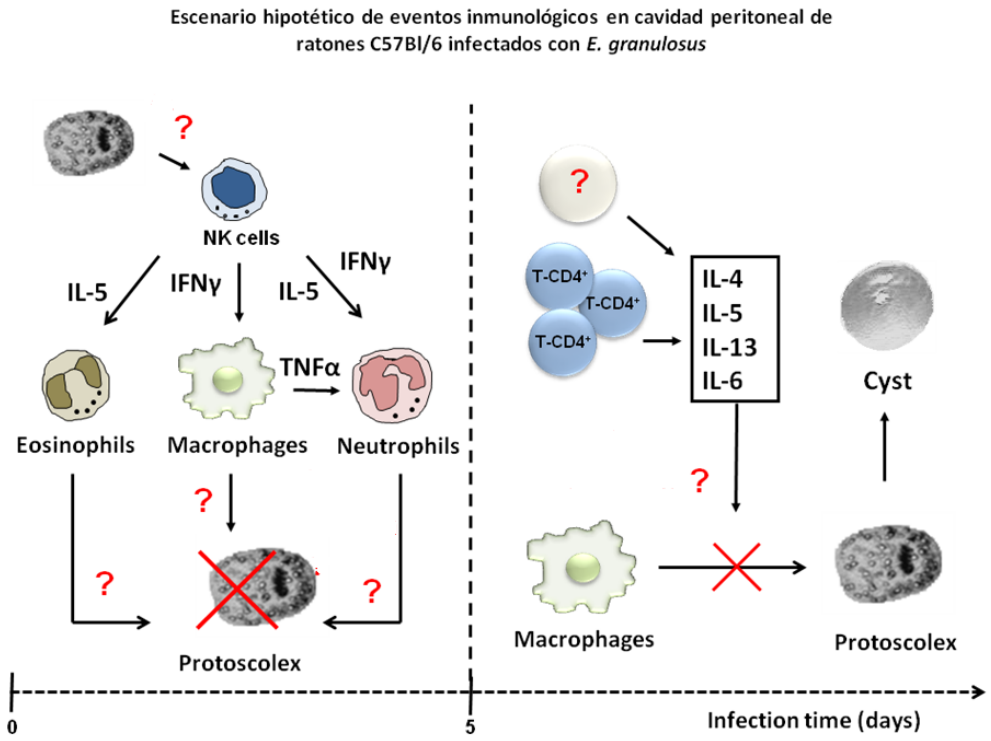

Figura 7. Luego de la administración de protoscoleces a ratones C57Bl/6, únicamente el 2% de los parásitos finalmente desarrollan quistes hidáticos. Así, la respuesta inmune temprana aunque no es óptima para prevenir el establecimiento de la infección, es probablemente más efectiva que la respuesta inmune de ratones de la cepa Balb/c. Basados en los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, planteamos que las células NK activadas vía IFN-γ podrían activar macrófagos residentes induciendo la secreción de TNF-α. La IL-5 actuando en forma sinérgica con el TNF-α podrían inducir el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de infección. Además, la expresión temprana de IL-5 podría ser responsable de la inducción de eosinofilia. Esto podría indicar que otras células además de macrófagos activados, como neutrófilos y eosinófilos podrían tener una papel en la eliminación del 98% del inoculo inicial de protoscoleces. A partir del día 5-7 pi los protoscoleces con capacidad de modular la respuesta de citoquinas hacia un perfil tipo-Th2 serían capaces de establecer la infección.

BIBLIOGRAFÍA

Aitken A. **14-3-3 proteins: a historic overview.** Semin Cancer Biol. 2006; 16(3):162-72.

Al-Qaoud KM, Pearlman E, Hartung T, Klukowski J, Fleischer B, Hoerauf A. **A new mechanism for IL-5-dependent helminth control: neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5.** Int Immunol. 2000;12(6):899-908.

Al-Qaoud KM, Abdel-Hafez SK. **Humoral and cytokine response during protection of mice against secondary hydatidosis caused by *Echinococcus granulosus*.** Parasitol Res. 2005; 98(1):54-60.

Al-Qaoud KM, Abdel-Hafez SK. **The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis.** Parasitol Res. 2008; 102(6):1151-5.

Amri M, Aissa SA, Belguendouz H, Mezioug D, Touil-Boukoffa C. **In vitro antihydatic action of IFN-gamma is dependent on the nitric oxide pathway.** J Interferon Cytokine Res. 2007; 27(9):781-7.

Amri M, Mezioug D, Touil-Boukoffa C. **Involvement of IL-10 and IL-4 in evasion strategies of *Echinococcus granulosus* to host immune response.** Eur Cytokine Netw. 2009; 20(2):63-8.

Artis D. **New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes.** Int J Parasitol. 2006; 36(6):723-33.

Baz A, Carol H, Fernández V, Mourglia-Ettlin G, Nieto A, Orn A, Dematteis S. ***Echinococcus granulosus*: induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection.** Exp Parasitol. 2008; 119(4):460-6.

Baz A, Ettlin GM, Dematteis S. **Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*.** Immunobiology. 2006; 211(1-2):3-9.

Baz A, Richieri A, Puglia A, Nieto A, Dematteis S. **Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*.** Parasite Immunol. 1999; 21(3):141-50.

Baz A, Carol H, Marco M, Casabó L, Jones F, Dunne D, Nieto A. **Fc-binding molecules specific for human IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscoleces.** Parasite Immunol. 1998 Sep;20(9):399-404.

Blader IJ, Saeij JP. **Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence.** APMIS. 2009; 117(5-6):458-76.

Breijo M, Anesetti G, Martínez L, Sim RB, Ferreira AM. ***Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation.** Exp Parasitol. 2008; 118(2):188-96.

Breijo M, Spinelli P, Sim RB, Ferreira AM. ***Echinococcus granulosus*: an intraperitoneal diffusion chamber model of secondary infection in mice.** Exp Parasitol. 1998; 90(3):270-6.

Bryan MA, Guyach SE, Norris KA. **Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice.** PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(7):e733.

Carmena D, Benito A, Eraso E. **Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update.** Acta Trop. 2006; 98(1):74-86.

Chapman CB, Mitchell GF. **Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*.** Vet Parasitol. 1982; 11(2-3):165-78.

Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grencis RK. **Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion.** Science. 2005; 308(5727):1463-5.

Cucher M, Prada L, Mourglia-Ettlin G, Dematteis S, Camicia F, Asurmendi S, Rosenzvit M. **Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes.** Int J Parasitol. 2011; 41(3-4):439-48.

de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction.** Int J Cell Biol. 2010; pii: 295394.

Dematteis S, Rottenberg M, Baz A. **Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by *Echinococcus granulosus*.** Parasite Immunol. 2003; 25(4):189-97.

Dematteis S, Pirotto F, Marqués J, Nieto A, Orn A, Baz A. **Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice.** Parasite Immunol. 2001; 23(1):1-9.

Dematteis S, Baz A, Rottenberg M, Fernández C, Orn A, Nieto A. **Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces.** Parasite Immunol. 1999; 21(1):19-26.

Díaz A, Casaravilla C, Irigoín F, Lin G, Previato JO, Ferreira F. **Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure.** Trends Parasitol. 2011; 27(5):204-13.

Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, Smith P, McKenzie AN. **IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13.** Immunity. 2002; 17(1):7-17.

Ferragut G, Nieto A. **Antibody response of *Echinococcus granulosus* infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation.** Parasite Immunol. 1996; 18(8):393-402.

Ferreira AM, Breijo M, Sim RB, Nieto A. **Contribution of C5-mediated mechanisms to host defence against *Echinococcus granulosus* hydatid infection.** Parasite Immunol. 2000; 22(9):445-53.

Ferreira AM, Trecu T, Reisin I. ***Echinococcus granulosus*: study of the in vitro complement activation by protoscoleces by measuring the electric potential difference across the tegumental membrane.** Exp Parasitol. 1992;75(3):259-68.

Haag KL, Gottstein B, Ayala FJ. **The EG95 antigen of *Echinococcus spp*. contains positively selected amino acids, which may influence host specificity and vaccine efficacy.** PLoS One. 2009; 4(4):e5362.

Handman E. **Cell biology of *Leishmania*.** Adv Parasitol. 1999; 44:1-39.

Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV. **Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*.** J Immunol. 1993; 151(12):7038-47.

Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. **Helminth infections: the great neglected tropical diseases.** J Clin Invest. 2008; 118(4):1311-21.

Huby F, Nano JL, Mallet S, Hoste H. **Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines.** Int J Parasitol. 1999; 29(5):697-702.

Jabbar A, Jenkins DJ, Crawford S, Walduck AK, Gauci CG, Lightowlers MW. **Oncospheral penetration glands are the source of the EG95 vaccine antigen against cystic hydatid disease.** Parasitology. 2011; 138(1):89-99.

Klion AD, Nutman TB. **The role of eosinophils in host defense against helminth parasites.** J Allergy Clin Immunol. 2004; 113(1):30-7.

LaRosa DF, Stumhofer JS, Gelman AE, Rahman AH, Taylor DK, Hunter CA, Turka LA. **T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*.** Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(10):3855-60.

Lightowlers MW, Rickard MD. **Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses.** Parasitology. 1988; 96 Suppl:S123-66.

Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Health DD. **Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen.** Parasite Immunol. 1996; 18(9):457-62.

Lightowlers MW, Jensen O, Fernandez E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, Jenkins DJ, Heath DD. **Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep.** Int J Parasitol. 1999; 29(4):531-4.

Lightowlers MW, Heath DD. **Immunity and vaccine control of *Echinococcus granulosus* infection in animal intermediate hosts.** Parasitología. 2004; 46(1-2):27-31.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. **Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms.** Nat Rev Immunol. 2003; 3(9):733-44.

Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers MW, Ito A. **Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B.** Parasitol Int. 2006; 55 Suppl:S57-62.

McDowell MA, Sacks DL. **Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses.** Curr Opin Microbiol. 1999; 2(4):438-43.

McManus DP, Thompson RC. **Molecular epidemiology of cystic echinococcosis.** Parasitology. 2003; 127 Suppl:S37-51.

Mejri N, Müller N, Hemphill A, Gottstein B. **Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development.** Parasitol Int. 2011; 60(1):45-53.

Mejri N, Gottstein B. **Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in C57BL/6 mice affects CD40 and B7 costimulator expression on peritoneal macrophages and impairs peritoneal T cell activation.** Parasite Immunol. 2006; 28(8):373-85.

Mejri N, Gottstein B. ***Echinococcus multilocularis* metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine.** Parasitol Res. 2009; 105(5):1253-60.

Mezioug D, Touil-Boukoffa C. **Cytokine profile in human hydatidosis: possible role in the immunosurveillance of patients infected with *Echinococcus granulosus*.** Parasite. 2009; 16(1):57-64.

Míguez M, Baz A, Nieto A. **Carbohydrates on the surface of *Echinococcus granulosus* protoscoleces are immunodominant in mice.** Parasite Immunol. 1996; 18(11):559-69.

Montes CL, Acosta-Rodríguez EV, Merino MC, Bermejo DA, Gruppi A. **Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host?** J Leukoc Biol. 2007; 82(5):1027-32.

Moro P, Schantz PM. **Echinococcosis: a review.** Int J Infect Dis. 2009; 13(2):125-33.

Mourglia-Ettlin G, Marqués JM, Chabalgoity JA, Dematteis S. **Early Peritoneal Immune Response during *Echinococcus granulosus* Establishment Displays a Biphasic Behavior**. PLoS Negl Trop Dis, 2011a, 5(8): e1293.

Mourglia-Ettlin G, Amezcua-Vesely MC, Fraga R, Baz A, Merino MC, Gruppi A, Dematteis S. ***Echinococcus granulosus* glycoconjugates induce peritoneal B cell differerntiation into antibody-secreting cells and cytokine production**. Parasite Immunology, 2011b;33 (11):621-31.

Murray PJ. **The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration.** J Immunol. 2007; 178(5):2623-9.

Rajan TV, Ganley L, Paciorkowski N, Spencer L, Klei TR, Shultz LD. **Brugian infections in the peritoneal cavities of laboratory mice: kinetics of infection and cellular responses**. Exp Parásitol. 2002; 100(4):235-47.

Ramalingam T, Rajan B, Lee J, Rajan TV. **Kinetics of cellular responses to intraperitoneal *Brugia pahangi* infections in normal and immunodeficient mice**. Infect Immun. 2003; 71(8):4361-7.

Ramos AL, Discipio RG, Ferreira AM. **Eosinophil cationic protein damages protoscoleces in vitro and is present in the hydatid cyst.** Parasite Immunol. 2006; 28(8):347-55.

Richards KS, Arme C, Bridges JF. ***Echinococcus granulosus* equinus: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts.** Parasitology. 1983; 86 (Pt 3):407-17.

Riganó R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzará 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.** Infect Immun. 2001; 69(1):288-96.

Riganó R, Profumo E, Buttari B, Teggi A, Siracusano A. **Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis.** Clin Exp Immunol. 1999; 118(1):95-101.

Rikihisa Y, Letonja T, Pratt N, Chin Lin Y. ***Taenia taeniaeformis*: characterization of larval metabolic products and growth of host gastric cells in vitro.** Exp Parasitol. 1984; 58(3):230-8.

Rogan MT. **T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of *Echinococcus granulosus* in BALB/c mice.** Parasite Immunol. 1998; 20(11):527-33.

Rogan MT, Craig PS. **Immunology of *Echinococcus granulosus* infections.** Acta Trop. 1997 Sep 15;67(1-2):7-17.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. **Eosinophil trafficking in allergy and asthma.** J Allergy Clin Immunol. 2007; 119(6):1303-10; quiz 1311-2.

Saeftel M, Arndt M, Specht S, Volkmann L, Hoerauf A. **Synergism of gamma interferon and interleukin-5 in the control of murine filariasis.** Infect Immun. 2003; 71(12):6978-85.

Sambrook J. & Russel D.W. **Molecular Cloning: Laboratory Manual**. 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

Sanderson CJ. **The biological role of interleukin 5.** Int J Cell Cloning. 1990; 8 Suppl 1:147-53.

Schmittgen TD, Livak KJ. **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** Nat Protoc. 2008; 3(6):1101-8.

Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H. ***Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria.** Am J Trop Med Hyg. 2010; 82(5):871-4.

Severi MA, Ferragut G, Nieto A. **Antibody response of *Echinococcus granulosus* infected mice: protoscolex specific response during infection is associated with decreasing specific IgG1/IgG3 ratio as well as decreasing avidity.** Parasite Immunol. 1997; 19(12):545-52.

Shin MH, Lee YA, Min DY. **Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection.** Korean J Parasitol. 2009;47 Suppl:S125-31.

Siracusano A, Riganò R, Ortona E, Profumo E, Margutti P, Buttari B, Delunardo F, Teggi A. **Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection.** Exp Parasitol. 2008; 119(4):483-9.

Siles-Lucas M, Merli M, Mackenstedt U, Gottstein B. **The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis.** Vaccine. 2003; 21(5-6):431-9.

Stanley AC, Engwerda CR. **Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis.** Immunol Cell Biol. 2007; 85(2):138-47.

Sun J, Wang Y, Li Z, Ma R, Ji H, Xiong Y, Wang Y, Li Z, Zhao W. ***Echinococcus granulosus*: immunoprotection accompanyied by humoral and cytokine response against secondary hydatidosis in mice immunized with rEg.myophilin.** Vet Res Commun. 2011; 35(4):193-200.

Taylor AW. **Review of the activation of TGF-beta in immunity.** J Leukoc Biol. 2009; 85(1):29-33.

Thompson RC, McManus DP. **Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus***. Trends Parásitol. 2002; 18(10):452-7.

Thompson RC. **The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*.** Exp Parasitol. 2008; 119(4):439-46.

Thompson R.C.A. & Lymbery A.J. ***Echinococcus* and Hydatid Disease**. CAB International, Wallingford, 1995, pp. 1-50.

Walker C, Checkel J, Cammisuli S, Leibson PJ, Gleich GJ. **IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation.** J Immunol. 1998;161(4):1962-9.