



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis cuanti-cualitativo del perfil isotópico de la respuesta de anticuerpos en individuos potencialmente resistentes a la infección por *Echinococcus granulosus*.

Tesina para optar al Título de Licenciado en Bioquímica

Presentado por:

Bachiller SEBASTIÁN MILES SIERRA

Tutor:

Mag. Gustavo Mourglia Ettlín

Co-Tutora:

Dra. Sylvia Dematteis

Montevideo, Uruguay

2015

“Libera tu mente y así serás feliz. Vive para los demás sin dejar de pensar en ti”

Nach

Agradecimientos

- Un enorme agradecimiento a mi familia por su trabajo en silencio y sus palabras de aliento.
- A Gustavo y Sylvia, por la oportunidad que me han brindado, por compartir su pasión por la ciencia y la confianza que depositan en mí a pesar de nuestras discordancias.
- A Ana Hernández, por proporcionarnos la seroteca y ayudarnos en el inicio del proyecto.
- A los integrantes de la “casita de adelante” de la Cátedra de Inmunología: Sylvia Demmatteis, Gustavo Mourglia, Verónica Fernández, Verónica López, Agustina Irazusta, Claudio Rodríguez, Marco Navatta, Paula Arbildi, Cecilia Sóñora, Ana Hernández y Emilia Villamil.
- Al resto de los integrantes del laboratorio por su disposición
- A mis compañeros de facultad: Mauricio Castellano, Santiago Radío, Daniel Herrera, Guillermo Tramontin, Guzmán Carissimi, Florencia Rammauro, Martina Steglich, Sofía Varela y Sofía Lawlor
- Un agradecimiento especial a Romina Bolón
- A JMI por sus brazos largos y lengua corta.
- Al resto de las personas que se están quedando en el tintero, por su servicio en la sombra
- A la ANII por la beca de Iniciación a la Investigación

Resumen.

El éxito de la respuesta inmune contra agentes infecciosos resulta de la compleja interacción entre el patógeno y la capacidad del hospedero de responder al mismo. Trabajos de campo realizados en zonas endémicas para equinococosis quística (parasitosis causada por el cestodo *Echinococcus granulosus*) han sugerido que una proporción importante de casos mostraría regresión espontánea, reportándose la presencia de individuos sanos seropositivos para antígenos de *E. granulosus*. En este sentido, se ha propuesto que la resistencia/susceptibilidad frente *E. granulosus* puede estar mediada, al menos en parte, por la respuesta humoral particular que desarrolle cada individuo. En el presente trabajo se caracterizó el perfil de la respuesta de anticuerpos totales y específicos contra antígenos de *E. granulosus* en individuos potencialmente resistentes a la infección, así como en individuos con equinococosis quística e individuos sanos, tanto residentes en zona endémica (Caraguatá, Tacuarembó) como en zona no endémica (Montevideo). En dichos individuos se analizó la concentración de anticuerpos totales, el título de anticuerpos específicos y sus índices de avidéz (en todos los casos discriminando IgG, IgA e IgM). Los resultados obtenidos sugieren que los individuos potencialmente resistentes desarrollarían respuestas humorales específicas polarizadas hacia el isotipo IgG con índices de avidéz medios, complementadas con bajos títulos de IgA específicas pero de alta

avidez. Así, nuestros resultados apoyarían la hipótesis sobre la relevancia que la respuesta de anticuerpos específicos contra *E. granulosus* tendría en la resistencia o susceptibilidad de individuos residentes en zonas endémica.

Índice

Introducción	1
Infecciones por helmintos.....	2
<i>Echinococcus granulosus</i>	3
Ciclo de vida	
Equinococosis quística	5
Respuesta Inmune frente infecciones por helmintos.....	7
Respuesta inmune contra <i>E. granulosus</i>	9
Contexto y punto de partida	15
Hipótesis y Objetivos	20
Hipótesis de trabajo	20
Objetivo General	20
Objetivos específicos	20
Materiales y métodos	21
Muestras de suero humanas.....	21
Preparación de antígenos somáticos de protoscolecis	24
Determinación del contenido proteico en SPE	24

Determinación del contenido glucídico en SPE.....	24
Cuantificación de proteínas séricas totales: método de Bradford	25
Cuantificación de proteínas séricas totales: método de Biuret automatizado	26
Cuantificación de IgG, IgM e IgA totales	26
Titulación de Anticuerpos específicos contra SPE	27
Determinación del índice de avidéz de los anticuerpos específicos contra SPE.....	28
Análisis estadístico.....	29
Resultados	30
Cuantificación de proteínas totales	30
Cuantificación de IgG, IgM e IgA totales.....	33
Titulación de IgG, IgM e IgA específicas contra antígenos somáticos de protoscoleces	36
Análisis de la relación entre títulos de IgG e IgA específicas.....	38
Determinación del índice de avidéz de IgG, IgM e IgA específicas.....	39
Discusión	41
Bibliografía	50

Introducción

Desde los comienzos de la vida en la tierra han existido interacciones entre los seres vivos. Estas influyen en la supervivencia de al menos una de las partes, ya sea con carácter beneficioso para ambos individuos o como una relación ganancia/pérdida que permita a uno de los individuos utilizar al otro en su favor, aunque esto signifique la muerte de este último. En este sentido, los parásitos son un ejemplo interesante dado que utilizan al hospedero en su propio beneficio, ya sea aprovechando sus desechos como nutrientes o utilizándolo para su reproducción (pudiendo ocasionarle la muerte).

Las presiones evolutivas han llevado a los hospederos a desarrollar respuestas de protección frente a los parásitos, y estas respuestas han presionado a su vez a los parásitos a encontrar maneras de evadirlas. Desde un punto de vista evolutivo, las primeras armas generadas por las células eucariotas fueron los péptidos antimicrobianos (ejemplo, defensinas). Luego, en animales inferiores aparece el sistema inmune innato (células y moléculas especializadas en la neutralización y eliminación de patógenos, tales como macrófagos, neutrófilos y el sistema complemento); y finalmente, en los vertebrados apareció la respuesta inmune adaptativa (inmunidad mediada por anticuerpos y citotoxicidad mediada por linfocitos T) (Abbas *et al.*, 1995). En consecuencia, algunas de las estrategias desarrolladas por los parásitos para evadir la respuesta inmune del hospedero fueron la secreción de proteasas

capaces de degradar anticuerpos o moléculas del complemento (Chapman y Mitchell, 1982; Mejri y Gottstein, 2009), la inhibición de las vías de señalización de las células del hospedero (Stanley y Engwerda, 2007), la inhibición de la síntesis de citoquinas (McDowell y Sacks, 1999), la reclusión anatómica (Thompson, 1995; Handman, 1999; De Souza *et al.*, 2010), entre otras.

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 *et al.*, 2008). Los helmintos se pueden clasificar en 2 grandes grupos: los nemátodos y los platelmintos. Las infecciones por nemátodos, tanto en humanos como en el ganado, tienen un fuerte impacto en salud pública así como en pérdidas económicas. La Organización Mundial de la Salud estima que más de 1.000 millones de personas en el mundo están infectadas con una o más de las especies patógenas principales (*Trichuris trichuria*, *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenalis*) (Artis, 2006).

Muchos parásitos helmintos tienen complejos ciclos de vida que involucran varios hospederos. En los hospederos mamíferos los helmintos suelen crecer extensivamente y diferenciarse con el fin de producir estadios que permitan la transmisión hacia el siguiente hospedero. Generalmente, el estadio

responsable de infectar hospederos mamíferos es la larva, la cual debe migrar hasta un nicho apropiado para poder crecer y reproducirse. Debido a que los helmintos requieren distintos hospederos para completar su ciclo, deben alojarse en sitios anatómicos de los cuales puedan salir (Macdonald *et al.*, 2002)

Echinococcus granulosus.

Ciclo de vida

Dentro del grupo de platelmintos se encuentran los cestodos, los cuales requieren estrictamente de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida. *Echinococcus granulosus* es un cestodo cuyo hospedero definitivo (donde se desarrolla el gusano adulto) es generalmente un cánido, y su hospedero intermediario (donde se desarrolla la larva, quiste o metacestodo) pueden ser varios ungulados (y accidentalmente humanos) (Figura 1). El hospedero definitivo (carnívoro) se infecta por ingesta de protoscoleces contenidos en quistes fértiles, los cuales se desarrollan principalmente en las vísceras del hospedero intermediario. Los protoscoleces se desarrollan a gusanos adultos (de 3 mm de longitud) en el intestino del hospedero definitivo, donde producen huevos. El hospedero intermediario (herbívoro u omnívoro) se infecta por la ingesta accidental de huevos dispersados por las heces del hospedero definitivo. Los huevos de este

parásito son capaces de sobrevivir durante largos períodos en el medioambiente (Thompson, 1995).

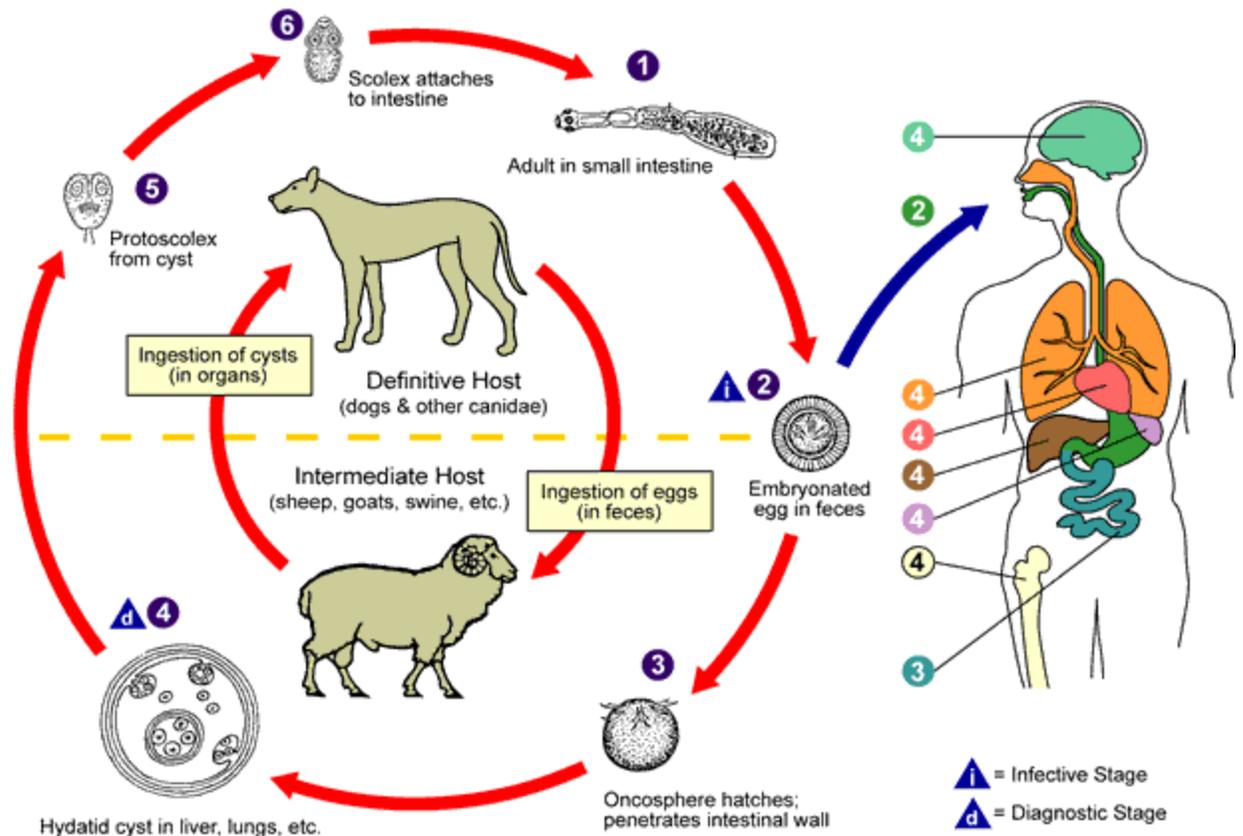


Figura 1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* (Tomada de Moro y Schantz, 2009).

Equinococosis quística

La infección por *E. granulosus* se denomina equinococosis quística (popularmente conocida como hidatidosis). Presenta una distribución cosmopolita y la transmisión entre animales y humanos la clasifica como zoonosis (Thompson, 1995). La equinococosis quística humana presenta una prevalencia mundial estimada en 6 millones de individuos infectados (Siracusano *et al.*, 2008).

Como se mencionó previamente, el hospedero intermediario se infecta al ingerir huevos producidos por el gusano adulto. Una vez ingeridos, los huevos liberan los embriones (oncósferas) 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 quistes. El estadio de quiste se desarrolla en órganos internos del hospedero intermediario (principalmente hígado y pulmones), y está compuesto por dos láminas: una interna (capa germinal) y otra externa (capa laminar). La capa germinal está formada por una fina estructura celular que limita una cavidad llena de líquido (líquido hidático). El quiste se desarrolla en forma unilocular esférica y turgente, creciendo mediante incrementos en su diámetro (Díaz *et al.*, 2011). La capa germinal forma vesículas prolíferas que por gemación interna generan protoscoleces (Thompson, 1995). Separando la capa germinal de la matriz extracelular y de las células del

hospedero se encuentra la capa laminar, una envoltura acelular rica en carbohidratos. La capa laminar alcanza aproximadamente hasta 3 mm de espesor y se describe como una matriz extracelular especializada, diseñada evolutivamente para mantener la integridad física del quiste y para proteger las células de la capa germinal de la respuesta inmune del hospedero. La síntesis de la capa laminar ocurre justo al comienzo del desarrollo del quiste. En este sentido, se reportó que oncósferas de *E. granulosus* desarrolladas *in vitro* secretan material fibrilar 3 días después de su activación, aunque el primer material que se asemeja a la malla madura de la capa laminar aparece en el día 6. Es probable que cuando el quiste se desarrolla a partir de protoscoleces, que necesita ser reprogramado para el desarrollo reverso, la formación de la capa laminar se retrase, apareciendo *in vitro* aproximadamente a los 28 días o *in vivo* después de 20-40 días (revisado por Díaz *et al.*, 2011).

En humanos (hospedero intermediario accidental), los quistes crecen lentamente (de 1 a 5 cm de diámetro por año), pudiendo alcanzar en el hígado unos 20 cm. Con el tiempo se pueden formar septos internos y quistes hijos que perturban el patrón unilocular típico de los quistes jóvenes. En su desarrollo pueden comprimir estructuras adyacentes, fisurarse, romperse o infectarse. Cuando accidentalmente un quiste fértil se rompe, se produce una siembra de protoscoleces que pueden originar nuevos quistes (infección

secundaria) dada la capacidad de los protoscoleces de evolucionar a quistes en el hospedero intermediario (Thompson, 1995).

El espectro clínico de la equinocosis quística en humanos es amplio, pudiendo variar desde infecciones asintomáticas hasta severas y raramente fatales. En la actualidad existen cuatro aproximaciones para el tratamiento clínico de la enfermedad: cirugía, técnicas percutáneas, quimioterapia para los casos de quistes activos, y la observación permanente para los quistes inactivos. La decisión de cuál aproximación utilizar en cada paciente se basa en el estadio del quiste, su tamaño y localización anatómica, y las comorbilidades potencialmente asociadas (Brunetti y Junghanss, 2009).

Respuesta Inmune frente infecciones por helmintos.

El sistema inmune se encarga de contrarrestar la invasión por patógenos microscópicos (virus, bacterias, hongos y protozoarios) y macroscópicos (helmintos y ectoparásitos). Si bien se comprenden con bastante detalle los mecanismos de defensa contra patógenos microscópicos, aún no se ha alcanzado un nivel equivalente en el análisis de la inmunidad contra parásitos metazoarios. Los parásitos helmintos están generalmente muy adaptados a sus hospederos naturales; sin embargo, especies filogenéticamente relacionadas a dichos hospederos e incluso ciertos genotipos del hospedero natural, pueden ser resistentes a la infección. Las reglas que gobiernan la

susceptibilidad y resistencia frente a parásitos helmintos están comenzando a esclarecerse a medida que se describen mejor los mecanismos tanto innatos como adaptativos capaces de contrarrestar las infecciones por dichos patógenos. En los últimos años, se han reportado múltiples e intrincados mecanismos de defensa contra helmintos, en particular el papel integral de las células inmunes innatas como inductoras y efectoras en todas las etapas de la infección (Anthony *et al.*, 2007; Allen y Maizels, 2011). Las células innatas han sido reconocidas como las principales productoras de citoquinas claves (IL-4, IL-5 e IL-13) en el desarrollo de las respuestas canónicas del tipo Th2 contra helmintos (Koyasu *et al.*, 2010; Neill y McKenzie, 2011). El estereotipo de inmunidad adaptativa contra helmintos abarca las células efectoras Th2 y las células T reguladoras, las cuales minimizan la patogenicidad pero pueden llegar a bloquear la expulsión del parásito (Taylor *et al.*, 2012). Las células B poseen un papel ambivalente, pudiendo actuar tanto en detrimento (Harris y Gause, 2012) o a favor (Amu *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2010) de la inmunidad.

Durante una respuesta polarizada de tipo Th2, la IL-4 media el cambio de clase en la respuesta de las células B hacia IgE, la cual se une a mastocitos y basófilos vía el receptor de alta afinidad para la porción Fc de la inmunoglobulina. La unión subsiguiente de la IgE con su antígeno específico induce la desgranulación de los mastocitos y la liberación de mediadores

bioactivos solubles (Boyce, 2003). Sin embargo, en las infecciones por *Heligmosomoides polygrus* o *Nippostrongylus brasiliensis*, ni las IgE ni los mastocitos parecerían tener un papel esencial en el desarrollo de inmunidad protectora (Madden *et al.*, 2002). En cambio, los mastocitos pero no las IgE son necesarios para la inmunidad protectora contra *Trichinella spiralis* (Dawicki y Marshall, 2007). En estos casos, las citoquinas del perfil Th2 y otros factores parecerían ser suficientes para la degranulación de los mastocitos (Anthony *et al.*, 2007).

En infecciones por nemátodos, la IgM secretada es esencial para la expulsión a tiempo de las filarias (Rajan *et al.*, 2005). Este es el principal isotipo de anticuerpos capaz de reconocer antígenos parasitarios en estadios larvales, y podría ser producido de manera T-independiente. Teniendo en cuenta que los macrófagos expresan receptores para la porción Fc de la IgM, estos anticuerpos podrían ser también importantes en la eliminación de las filarias por macrófagos (Shibuya *et al.*, 2000).

Respuesta inmune contra *E. granulosus*.

La resistencia a la infección y la eliminación de los helmintos no recae solamente en un fenotipo celular particular o en un solo mecanismo molecular de eliminación, sino en un abanico de múltiples vías de desarmado, degradación y dislocación ("*disable, degrade and dislocate*") del parásito

llevando esto a su expulsión. Esta estrategia de eliminación resulta exitosa para varias infecciones por helmintos, pero en el caso de la equinococosis quística una vez establecido el quiste, ya no puede ser eliminado por el sistema inmune (Zhang *et al.*, 2012).

Las infecciones por helmintos 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 papel de estas respuestas en la interacción hospedero parásito permanece desconocido para muchas de estas infecciones y no se correlacionan con resistencia en todos los casos (Baz *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 estadios crónicos de la infección (Amri *et al.*, 2009).

Estudios de la respuesta inmune adaptativa llevados a cabo contra *E. granulosus* muestran que anticuerpos específicos contra antígenos de oncósferas jugarían un papel importante en la eliminación del parásito y serían centrales en la respuesta inmune protectora (Dempster *et al.*, 1992). Al desafiar ratones con oncósferas de *E. granulosus*, las primeras IgG contra antígenos de oncósferas aparecen a las 2 semanas del desafío. Para ovejas desafiadas con oncósferas, estas IgG aparecen a las 11 semanas (Yong *et al.*, 1984; Zhang *et al.*, 2003). A pesar de que los niveles de anticuerpos contra

oncósferas son bajos en etapas tempranas de la infección (Zhang *et al.*, 2003) los mecanismos para eliminar al parásito podrían involucrar reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (Beardsell y Howell, 1984; Rogan *et al.*, 1992).

En humanos en la fase crónica de la infección, es frecuente encontrar niveles elevados de anticuerpos, particularmente IgG, IgM e IgE (Dessaint *et al.*, 1975; Craig, 1986; Pinon *et al.*, 1987; Daeki *et al.*, 2000; Khabiri *et al.*, 2006), siendo IgG1 e IgG4 las subclases de IgG predominantes (Aceti *et al.*, 1993; Wen y Craig, 1994; Ioppolo *et al.*, 1996; Shambesh *et al.*, 1997; Sterla *et al.*, 1999; Daeki *et al.*, 2000).

Sin embargo, un 30-40% de los individuos con equinococosis quística no muestran niveles detectables de anticuerpos contra antígenos de líquido hidático, si bien en suero de muchos de estos pacientes es posible detectar niveles variables de inmunocomplejos circulantes. Estos inmunocomplejos podrían regular e inhibir la activación y proliferación de células B, tanto por mecanismos T reguladores actuando directamente sobre las células B (Zhang *et al.*, 2012).

En el líquido hidático se encuentra presente en grandes cantidades un antígeno lipoproteico llamado antígeno B (AgB) el cual ha demostrado tener características inmunomoduladoras (Riganò *et al.*, 2001; Mamuti *et al.*, 2006). A su vez, los niveles de subclases de IgG específicas contra AgB son buenos

marcadores del status de la infección, ya que títulos elevados de IgG4 se asocian con las fases evolutivas de la equinococosis quística (quistes tipo I, II y III según clasificación por ultrasonido), mientras que títulos elevados de IgG1, IgG2 e IgG3 se asocian con las fases involutivas de la enfermedad (quistes tipo IV y V según clasificación por ultrasonido) (Daeki *et al.*, 2000). Una comparación de la respuesta humoral de pacientes con infección primaria con aquella de pacientes con recidivas mostró que estos últimos presentan niveles mayores de IgE e IgG4 específicas contra líquido hidático (Riganò *et al.* 1995a; Riganò *et al.* 1995b; Riganò *et al.* 1996; Hernández-Pomi *et al.* 1997). Así, la información disponible sobre la respuesta humoral en pacientes con equinococosis quística sugiere que la calidad de las mismas (en términos de isotipos y subclases de anticuerpos inducidas) podría condicionar el desarrollo de la infección.

A partir de estudios de campo se ha sugerido que una proporción importante de casos de equinococosis quística mostraría regresión espontánea; es decir, la exposición a *E. granulosus* no siempre derivaría en el establecimiento de la infección. Por ejemplo, Gavidia *et al.* (2008) demostraron que en la sierra central de Perú si bien un 20% de la población mostró ser seropositiva contra antígenos de *E. granulosus*, solo un 3% presentó quistes confirmados por ultrasonografía o radiografía. Resultados similares se obtuvieron en el oeste de China, donde si bien el 26% de la población mostró ser seropositiva para

E. granulosus, solo se observó una prevalencia de 43/100.000 casos confirmados por cirugía (Zhang *et al.*, 1994).

Trabajos realizados en diferentes partes del mundo describen estos mismos resultados. Así, en un estudio llevado a cabo por Shambesh *et al.* (1999) en el norte de Libia, sobre un muestreo de 20.220 personas, un 1,7% fue diagnosticado positivamente para equinococosis quística. Paralelamente se encontró que el 11,2% de los individuos sin imagen quística compatible resultaron seropositivos contra antígenos de *E. granulosus*. En este mismo trabajo también se reportó que solo el 69% de los individuos diagnosticados con equinococosis quística fueron seropositivos contra líquido hidático por ELISA. En Turquía, un 13,2% de 750 individuos resultaron ser seropositivos contra antígenos de *E. granulosus*, y un 0,8% de 250 individuos presentaron imagen quística compatible por ultrasonido (Arda *et al.*, 2009). Así también, en Yirka (Israel) 68 de 758 individuos examinados (0,9%) resultaron ser seropositivos contra antígenos de *E. granulosus*, de los cuales 59 fueron examinados por ultrasonido en la zona abdominal y rayos X. Solamente 13 fueron diagnosticados positivamente (n=7) o poseían historia clínica de equinococosis quística (n=6) (Nahmias *et al.*, 1991).

En Uruguay, concretamente, varios estudios mostraron resultados en consonancia con los antes mencionados. Por ejemplo en un trabajo realizado por Bonifacino *et al.* en 1991, se analizaron individuos de las zonas de

Paysandú, Rivera y San José, se reportó que 17 de las 420 personas examinadas (4,05%) poseían anticuerpos contra líquido hidático. De los 17, solo 13 pudieron completar los estudios, hallándose solamente 4 individuos (0,95%) con equinococosis quística. En otro estudio llevado a cabo en la zona rural de La Paloma (Durazno) Cohen *et al.* (1998) encontraron que, luego de realizar una sonografía abdominal al 82,2% de la población residente, un 3,6% fueron diagnosticados con equinococosis quística. Además, un 2% poseía historia clínica de equinococosis quística. Tomando ambos resultados se concluyó que un 5,6% de la población residente estuvo infectada con *E. granulosus*. El 67% de los diagnosticados resultó ser seropositivo mediante ELISA contra líquido hidático o antígeno B purificado y un 0,36% del total de individuos analizados resultaron ser seropositivos a pesar de no poseer imagen compatible con quiste hidático.

Por otro lado, Hernández *et al.* (2005) encontraron que en Caraguatá (Tacuarembó) un 8,9% de los individuos examinados poseían IgG específicas contra antígenos de *E. granulosus*, mientras que solamente un 0,8% poseía imagen por ultrasonido compatible con quiste hidático. Estos datos epidemiológicos en su conjunto podrían sugerir que no todas las exposiciones a *E. granulosus* derivarían en la formación de quistes hidáticos.

Contexto y punto de partida.

El presente trabajo es una continuación del estudio epidemiológico realizado en la región de Caraguatá del departamento de Tacuarembó (Figura 2) por Hernández *et al.* (2005). Estudios previos realizados por el Hospital Regional de Tacuarembó mediante el análisis de 13.000 ecografías, mostraban que Caraguatá era una zona endémica para hidatidosis (1% de residentes infectados), y por ello Hernández *et al.* (2005) determinaron la prevalencia de equinocosis quística en individuos residentes en Caraguatá analizando: a) la reactividad de IgG séricas específicas contra antígenos de *E. granulosus* por ELISA, y b) imágenes obtenidas por ultrasonido de cavidad abdominal. Aquellos individuos con imagen primaria compatible con quiste hidático fueron luego reexaminados en el Hospital Regional de Tacuarembó mediante: a) una nueva ecografía, b) radiografía de tórax y c) tomografía computarizada axial para caracterización quística. Los antígenos de *E. granulosus* utilizados en los estudios serológicos fueron: a) antígenos crudos de *E. granulosus* (EgAg), y b) antígeno B purificado (AgB). Además, para discriminar entre sueros positivos para *E. granulosus* y sueros con reactividad cruzada, se utilizaron: a) antígenos de oncósferas de *Taenia hydatigena* (ThAg), y b) antígenos de excreción/secreción de *Toxocara canis* (TxAg) (Hernández *et al.*, 2005).

El estudio epidemiológico descrito por Hernández *et al.* (2005) abarcó nueve pueblos de la región de Caraguatá (Las Pajas, Rincón de Pereira, Cerro de Pereira, Las Chircas, Minuano, Las Toscas, Cuchilla de Caraguatá, Caraguatá al Sur, Clavijo) ubicados aproximadamente a 120 Km de distancia de la ciudad de Tacuarembó, y se realizó en dos etapas: una primera salida de campo en el año 1998 y una segunda salida en el año 2000.



Figura 2. Mapa de Uruguay. Se destaca la ubicación del departamento de Tacuarembó (en naranja) y la zona de Caraguatá (círculo negro). En verde se indica el departamento de Montevideo (zona no-endémica).

Los resultados obtenidos del análisis sonográfico de la primera salida de campo (año 1998) mostraron que 4 de 480 individuos examinados (0,8%) presentaban imagen compatible con quiste hidático. Los estudios serológicos sobre 305 muestras individualizadas (provenientes de los 480 individuos examinados por sonografía) mostraron que 27 (8,8%) exhibían títulos significativos de IgG específicas contra EgAg, a pesar de carecer de imagen compatible con quiste hidático. Este grupo de individuos fue denominado “grupo normal por ultrasonido”. Estos sueros se ensayaron además contra AgB purificado, teniendo en cuenta que este es un antígeno parasitario género-específico (Maddison *et al.*, 1989). Así, 9 muestras (33%) mostraron reactividad frente a AgB. Posteriormente, los sueros de estos 27 individuos fueron analizados contra ThAg y TxAg obteniéndose que 18 (67%) mostraron reactividad contra al menos uno de los dos antígenos. A su vez, 3 de los 9 sueros que mostraron reactividad frente a AgB también exhibían títulos significativos de IgG contra al menos uno de los antígenos ThAg y TxAg. Únicamente 4 de los 27 sueros de los individuos del “grupo normal por ultrasonido” (15%) no mostraron reactividad frente a AgB ni a ninguno de estos dos antígenos parasitarios.

En la segunda salida de campo (año 2000) los resultados obtenidos mostraron que 3 de 260 individuos (1,1%) tenían imagen compatible con quiste hidático. A su vez, se obtuvieron muestras de sangre de 20 de los 27 individuos del

“grupo normal por ultrasonido” de forma tal de hacer un seguimiento de la respuesta de IgG específicas 2 años después del primer estudio (1998). En este segundo análisis se encontró que 9 de 20 sueros mostraron reactividad frente a EgAg. Sin embargo las otras 11 muestras mostraban un título de IgG por debajo del umbral. El análisis sonográfico del “grupo normal por ultrasonido” en la segunda instancia mostró que solamente uno de los individuos poseía múltiples imágenes compatibles con quistes hidáticos calcificados en el hígado y bazo, las cuales fueron confirmadas mediante tomografía computarizada axial.

Es importante mencionar que Garcia *et al.* (2001) reportaron que individuos residentes en zonas endémicas para *Taenia solium* mostraron una respuesta de anticuerpos específicos transitoria contra antígenos parasitarios. Estos anticuerpos transitorios podrían formarse a partir de la exposición al patógeno sin el desarrollo de la enfermedad, o en una respuesta humoral exitosa frente a la infección, disminuyendo el título rápidamente una vez que la infección fuera resuelta. Así, Hernández *et al.* (2005) propusieron que este mismo mecanismo podría aplicarse para *E. granulosus* teniendo en cuenta que aproximadamente el 60% de los individuos del “grupo normal por ultrasonido” resultaron ser seronegativos 2 años después. Asimismo, sugirieron que las IgG específicas contra AgB en suero de individuos “normales por ultrasonido” podría contribuir a la resistencia adquirida frente a equinococosis quística.

Finalmente, los resultados de Hernández *et al.* (2005) sugieren que los humanos podrían desencadenar una respuesta de anticuerpos potencialmente capaz de limitar el desarrollo del quiste generando resistencia a la infección. Así, se reforzaría la idea de que no todo desafío natural con oncosferas de *E. granulosus* desencadena el establecimiento de la infección. Sin embargo la escasa comprensión de la interacción hospedero-parásito en humanos con equinococosis quística que existe hasta el momento, deja dicha sugerencia en un plano meramente hipotético.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo.

La resistencia/susceptibilidad frente *E. granulosus* podría estar mediada, al menos en parte, por la respuesta humoral particular que desarrolle cada individuo en términos de calidad (isotipos y avidéz) e intensidad de la misma.

Objetivo General.

Analizar las características de los anticuerpos específicos contra antígenos de *E. granulosus* en individuos potencialmente resistentes a la infección residentes en zona endémica.

Objetivos específicos.

Analizar en forma comparativa en individuos potencialmente resistentes a la infección por *E. granulosus* y en los individuos de los grupos control:

- 1.- La concentración sérica de IgG, IgM e IgA totales.
- 2.- El título de IgG, IgM e IgA sérico específico contra antígenos somáticos de protoscoleces.
- 3.- El índice de avidéz de las IgG, IgM e IgA séricas específicas contra antígenos somáticos de protoscoleces.

Materiales y métodos

Muestras de suero humanas.

Los sueros utilizados fueron obtenidos por Hernández *et al.* (2005) en el estudio llevado a cabo en la zona de Caraguatá (Tacuarembó) endémica para *E granulosus* y almacenados en la Cátedra de Inmunología. Por información adicional sobre la aprobación ética del estudio ver Hernández *et al.* (2005). En paralelo, se obtuvieron muestras de suero de voluntarios sanos residentes en la ciudad de Montevideo (zona no endémica).

Las muestras se dividieron en 4 grupos:

- 1)** Sueros de individuos residentes en zona endémica con serología positiva e imagenología no compatible con quiste hidático (n=15). En el presente trabajo este grupo se denominó Grupo Potencialmente Resistente.
- 2)** Sueros de individuos residentes en zona endémica con serología positiva e imagen quística compatible y confirmada por cirugía(n=6). En el presente trabajo este grupo se denominó Grupo Infectado.
- 3)** Sueros de individuos residentes en zona endémica con serología negativa e imagenología no compatible con quiste hidático (n=12). En el presente trabajo este grupo se denominó Grupo Control Zona Endémica.

4) Sueros de individuos saludables residentes en zona no endémica (ciudad de Montevideo) presumiblemente no infectados con *E. granulosus* (n=14). En el presente trabajo este grupo se denominó Grupo Control Montevideo.

En la Tabla 1 se muestra el resumen de datos sobre los individuos de cada grupo y en la Tabla 2 la descripción detallada de cada individuo.

Tabla 1. Características de los grupos en estudio.

	Grupo Potencialmente Resistente	Grupo Infectado	Grupo Control Zona Endémica	Grupo Control Montevideo
Sexo (F/M)	13/2	3/3	6/6	7/7
Edad (años)	9-60	12-78	11-71	16-53
Serología	+	+	-	Individuos sanos de zona no-endémica
Imagen quística	-	Confirmada por cirugía	-	no infectados

Tabla 2. Características de los individuos de los cuatro grupos en estudio.

Grupo Potencialmente Resistente			
Muestra	Sexo	Edad (años)	Lugar de residencia
A.1	F	9	Caraguatá (Tacuarembó)
A.2	F	15	Caraguatá (Tacuarembó)
A.3	F	22	Caraguatá (Tacuarembó)
A.4	F	23	Caraguatá (Tacuarembó)
A.5	M	23	Caraguatá (Tacuarembó)
A.6	F	24	Caraguatá (Tacuarembó)
A.7	F	28	Caraguatá (Tacuarembó)
A.8	F	29	Caraguatá (Tacuarembó)
A.9	M	30	Caraguatá (Tacuarembó)
A.10	F	32	Caraguatá (Tacuarembó)
A.11	F	40	Caraguatá (Tacuarembó)
A.12	F	43	Caraguatá (Tacuarembó)
A.13	F	50	Caraguatá (Tacuarembó)
A.14	F	60	Caraguatá (Tacuarembó)
A.15	F	60	Caraguatá (Tacuarembó)

Grupo Control Zona Endémica			
Muestra	Sexo	Edad (años)	Lugar de residencia
C.1	F	11	Caraguatá (Tacuarembó)
C.2	M	12	Caraguatá (Tacuarembó)
C.3	F	31	Caraguatá (Tacuarembó)
C.4	F	32	Caraguatá (Tacuarembó)
C.5	M	34	Caraguatá (Tacuarembó)
C.6	M	34	Caraguatá (Tacuarembó)
C.7	F	35	Caraguatá (Tacuarembó)
C.8	F	45	Caraguatá (Tacuarembó)
C.9	M	50	Caraguatá (Tacuarembó)
C.10	M	57	Caraguatá (Tacuarembó)
C.11	F	66	Caraguatá (Tacuarembó)
C.12	M	71	Caraguatá (Tacuarembó)

Grupo Control Montevideo			
Muestra	Sexo	Edad (años)	Lugar de residencia
D.1	F	16	Ciudad de Montevideo
D.2	M	17	Ciudad de Montevideo
D.3	F	21	Ciudad de Montevideo
D.4	M	22	Ciudad de Montevideo
D.5	M	24	Ciudad de Montevideo
D.6	M	25	Ciudad de Montevideo
D.7	M	26	Ciudad de Montevideo
D.8	F	28	Ciudad de Montevideo
D.9	M	30	Ciudad de Montevideo
D.10	F	37	Ciudad de Montevideo
D.11	F	47	Ciudad de Montevideo
D.12	F	53	Ciudad de Montevideo
D.13	M	21	Ciudad de Montevideo
D.14	F	25	Ciudad de Montevideo

Grupo Infectado			
Muestra	Sexo	Edad (años)	Lugar de residencia
B.1	F	12	Caraguatá (Tacuarembó)
B.2	M	35	Caraguatá (Tacuarembó)
B.3	F	38	Caraguatá (Tacuarembó)
B.4	M	39	Caraguatá (Tacuarembó)
B.5	F	64	Caraguatá (Tacuarembó)
B.6	M	78	Caraguatá (Tacuarembó)

Preparación de antígenos somáticos de protoscoleces.

Los protoscoleces se obtuvieron por punción aséptica de quistes hidáticos bovinos fértiles según Baz *et al.* (1995). Los parásitos se lavaron varias veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2 conteniendo gentamicina (40 µg/mL). Los antígenos somáticos de protoscoleces (SPE) se obtuvieron mediante ruptura por ultrasonido según Baz *et al.* (1995). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana estéril de 0.22µm y se almacenó a -20°C hasta su uso. La reproducibilidad de la obtención de SPE se analizó comparando la relación carbohidratos-proteínas.

Determinación del contenido proteico en SPE.

La concentración proteica se determinó empleando el método del ácido bicinconínico (*Kit QuantiPro BCA Assay*, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Determinación del contenido glucídico en SPE.

El contenido en carbohidratos se determinó de acuerdo a White & Kennedy (1986) con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon 8 diluciones seriadas del estándar Dextrano T-2000 (entre 800 y 25 µg/mL en PBS), así como diluciones adecuadas de SPE en PBS. Se sembraron 40 µL por pocillo

de cada dilución de SPE y del estándar en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se dispensaron 160 μL por pocillo de resorcinol 2 mg/mL en H_2SO_4 (cc), mezclando suavemente. Luego se incubó a placa en cámara húmeda durante 40 minutos a 80°C en baño de agua. Finalmente, la placa se enfrió rápidamente en hielo, se agitó suavemente y se determinó la absorbancia a 492nm en un espectrofotómetro para placas (Titertek Multiscan Plus, Finlandia).

Cuantificación de proteínas séricas totales: método de Bradford.

La concentración de proteínas totales en cada muestra de suero, se cuantificó según el método de Bradford. Muy brevemente, se dispensaron 10 μL /pocillo de estándar para sistemas automatizados (CFAS: *Calibrator for Automated Systems*) en placas de microtitulación, en diluciones seriadas (3:4) en PBS (por duplicado) partiendo de una concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A su vez, se dispensaron 10 μL /pocillo de cada muestra en 4 diluciones seriadas al medio en PBS, partiendo de 1/500. Luego, se agregaron 200 μL /pocillo del reactivo de Bradford (Azul de coomasie G-250), se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm empleando un espectrofotómetro para placas (Titertek Multiscan Plus, Finlandia).

Cuantificación de proteínas séricas totales: método de Biuret automatizado.

La concentración de proteínas totales en cinco muestras de suero se determinó por el método de Biuret. Muy brevemente, en una cubeta para analizador automático Wiener Lab. se dispensó primero 3 μ L de suero y luego 120 μ L de Reactivo A (NaOH 600mM, KNaC₄H₄O₆ 127,6mM). Tras incubar por 120 segundos a 37°C se leyó la absorbancia a 540 nm de longitud de onda primaria, y 700 nm de longitud de onda secundaria. Luego se agregaron 40 μ L de Reactivo B (NaOH 600mM, KNaC₄H₄O₆ 127,6mM, KI 120mM, Cu₂SO₄ 48,9mM), y tras incubar durante 300 segundos, se leyó la absorbancia a 540nm de longitud de onda primaria, y 700nm de longitud de onda secundaria. La concentración proteica fue automáticamente calculada por el analizador.

Cuantificación de IgG, IgM e IgA totales.

La concentración total de IgG, IgM e IgA en los sueros se determinó por Inmunodifusión Radial (IDR). Para ello se utilizaron placas de 12 pocillos específicas para cada isotipo (Diffu-Plate, Biocientífica SA, Argentina). Se sembraron 5 μ L/pocillo de muestra entera, se incubaron las placas durante 48/72 horas a temperatura ambiente (según instrucciones del fabricante para

cada isotipo), y finalmente el halo de precipitación se determinó en forma manual. La concentración total de cada isotipo se obtuvo a partir de una relación entre el diámetro del halo y la concentración de inmunoglobulinas proporcionada por el fabricante.

Titulación de Anticuerpos específicos contra SPE.

El título de IgG, IgM e IgA sérica específica contra SPE se determinó por ELISA. Brevemente, placas de microtitulación de 96 pocillos se sensibilizaron con 100µL/pocillo de SPE (10 µg/mL en proteínas) en PBS incubando durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de descartar los sobrenadantes, las placas se lavaron con 200µL/pocillo con PBS-T (0,05% v/v) incubando 5 minutos. Después de bloquear las placas con 200µL/pocillo de PBS-Suero Fetal bovino 1% (v/v) (PBS-FCS), incubando durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con 200µL/pocillo de PBS-T y posteriormente se dispensaron 100µL/pocillo de los sueros diluidos en PBS-FCS-T en diluciones seriadas desde 1/100 (por duplicado). Tras incubación durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, descarte de los sobrenadantes y lavado con PBS-T, se dispensaron 100µL/pocillo de antisueros específicos para cada isotipo, conjugados a peroxidasa (anti-suero de conejo anti-IgG(humana), anti-suero de cabra anti-IgM(humana), anti-suero de cabra anti-IgA(humana)) todos diluidos en PBS-

FCS-T. Luego de una incubación por 1 hora en cámara húmeda a 37°C, lavado con PBS-T y PBS, se dispensaron 100 µL/pocillo de solución de revelado (orto-fenilendiamina 0.4 mg/mL en buffer fosfato citrato 50mM pH 5.5 como cromógeno con H₂O₂ al 30% como sustrato). Finalmente, luego de una incubación de 15/30/45 minutos (para IgG, IgM e IgA respectivamente) en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad, la reacción se detuvo con 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 1N y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro para placas (Titertek Multiscan Plus, Finlandia). El Título se definió como la dilución a la cual la absorbancia corresponde al 50% de la absorbancia de la muestra diluída 1/100.

Determinación del índice de avidéz de los anticuerpos específicos contra SPE.

El índice de avidéz de IgG, IgM e IgA sérica específica contra SPE se determinó por ELISA con elución caotrópica (Pullen *et al.*, 1986). Brevemente, placas de microtitulación de 96 pocillos se sensibilizaron y bloquearon como se mencionó anteriormente. A continuación se dispensaron 100µL/pocillo de los sueros adecuadamente diluidos en PBS-FCS-T en 6 pocillos. La dilución de trabajo para cada muestra se determinó en base a las curvas de titulación obtenidas para cada isotipo, eligiéndose la primera dilución fuera de la zona de saturación. Tras incubación durante toda la noche a 4°C en cámara

húmeda, descarte de los sobrenadantes y lavado con PBS-T y PBS, se dispensaron 100µL/pocillo de KSCN en PBS a distintas concentraciones (0.1, 0.5, 1.5 y 4.0 M). Luego de una incubación por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, descarte de los sobrenadantes y lavado con PBS-T, se dispensaron 100uL/pocillo de los antisueros específicos para cada isotipo conjugados a peroxidasa mencionados anteriormente, todos diluidos en PBS-FSC-T. Luego de una incubación por 1 hora en cámara húmeda a 37°C, lavado con PBS-T y PBS, se reveló de la misma manera ya mencionada, midiendo la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro para placas (Titertek Multiscan Plus, Finlandia). El índice de avidéz se definió como la concentración molar (M) de KSCN a la cual la absorbancia disminuye al 50% con respecto a la muestra en ausencia de KSCN.

Análisis estadístico.

Para evaluar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos en estudio, se utilizó el test U de Mann-Whithney.

Resultados

Cuantificación de proteínas totales.

Teniendo en cuenta que los sueros a utilizar en este trabajo estuvieron almacenadas por más de 10 años, se determinó la concentración de proteínas totales utilizando el método de Bradford, como primera aproximación para comprobar el estado de conservación de las muestras. El rango normal de concentración de proteínas totales en sueros de individuos adultos oscila entre 6.4 y 8.3 g/dL (Pagana y Pagana, 2010). Sin embargo, existen ciertas variaciones asociadas principalmente al género y la edad, las cuales fueron contempladas en los análisis. La cuantificación de proteínas totales por Bradford se determinó en 45/47 individuos ya que 2 muestras del Grupo Control Montevideo fueron incluidas posteriormente a este estudio. Los resultados obtenidos muestran que la concentración proteica fue mayor al rango normal en 38 individuos (Figura 3).

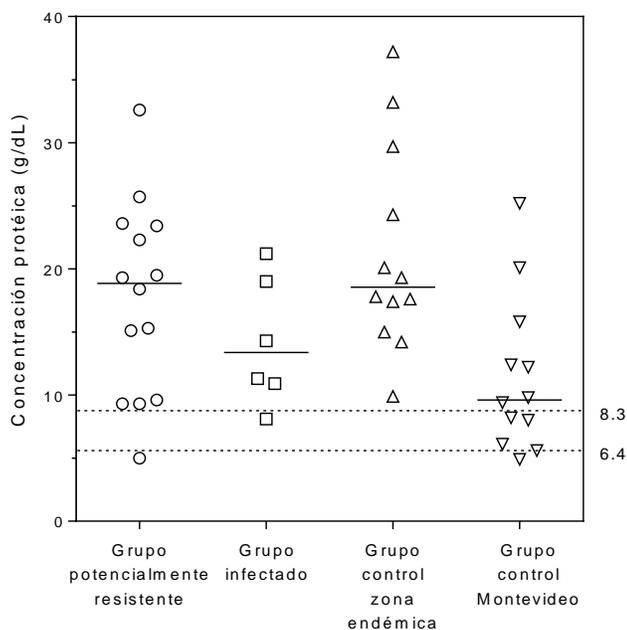


Figura 3. Proteínas totales en suero determinadas utilizando método de Bradford. El contenido proteico en suero de las muestras fue cuantificado por el método de Bradford. El gráfico muestra los valores individuales (g/dL) y las líneas sólidas horizontales representan los valores de la mediana de cada grupo. Las líneas punteadas horizontales muestran el rango normal de proteínas en suero (6.4 - 8.3 g/dL).

Teniendo esto en cuenta, se procedió a analizar algunas de las muestras utilizando el método de Biuret automatizado (método de rutina utilizado en laboratorios de análisis clínicos). Debido a que nuestro laboratorio no cuenta con un analizador automático, algunas muestras cuidadosamente seleccionadas fueron enviadas para su análisis en un Laboratorio de Análisis Clínicos. El criterio de selección de las muestras consistió en tratar de cubrir un rango amplio de concentración proteica con los resultados obtenidos

empleando el método de Bradford. Así, se seleccionaron cinco muestras del Grupo Control Zona Endémica: 1) dos con valores de concentración proteica altos, 2) dos con valores de concentración proteica bajos, y 3) una con concentración proteica cercana a la mediana. Los resultados obtenidos muestran que el valor de concentración proteica determinado por el método de Biuret automatizado fue similar en las cinco muestras y dentro del rango normal (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de los valores de concentración de proteínas totales obtenidas por método de Bradford y Biuret automatizado. Cinco muestras de suero de individuos Grupo Control Zona endémica se analizaron por el método de Bradford y Biuret automatizado. Los valores de concentración de proteínas totales se muestran a continuación. El rango normal de proteínas en suero se encuentra entre 6.4 - 8.3 g/dL.

Muestra	Concentración de proteínas totales (g/dL)	
	Método de Bradford	Método de Biuret
C.3	14.2	7.18
C.4	37.2	7.94
C.6	9.9	7.24
C.8	15.0	7.88
C.9	33.2	7.55

Estos resultados sugieren que los valores obtenidos por Bradford no representarían el contenido proteico real de las muestras. A su vez, dado que las 5 muestras analizadas por Biuret automatizado caen dentro del rango normal de proteínas en suero (6.4 – 8.3 g/dL), y a su vez estas abarcaban el rango más amplio de los valores obtenidos por Bradford, asumimos que todas las muestras podrían hallarse dentro del rango normal.

Cuantificación de IgG, IgM e IgA totales.

Como segunda aproximación para comprobar el estado de conservación de las muestras, realizamos una cuantificación de IgG, IgM e IgA totales y en base a ello decidimos con cuáles muestras continuaríamos nuestro estudio. La concentración total de IgG, IgM e IgA en cada muestra se determinó por inmunodifusión radial (IDR). Los resultados mostrados en la Figura 4 muestran que el estado de conservación de las muestras sería el apropiado para proseguir con los estudios. Una de las muestras del Grupo Potencialmente Resistente mostró no tener valores detectables de IgA total y por esta razón esta muestra se excluyó de todos los ensayos posteriores.

Al analizar los valores obtenidos se observó que la mayoría de las muestras de todos los grupos se encuentran dentro de los rangos normales de concentración de inmunoglobulinas en suero (Figura 4D), y que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 4A, 4B y

4C). Sin embargo, el valor de algunas muestras se encontró por fuera del rango normal reportado por el fabricante de placas de IDR. Según el fabricante, dicho rango se determinó analizando un número elevado de individuos presuntamente sanos pero sin tomar en cuenta posibles diferencias genéticas correspondientes a distintos lugares geográficos de residencia de los individuos. Por lo tanto, en este trabajo se tuvo en cuenta además, el rango de los valores de inmunoglobulinas obtenidos para las muestras del Grupo Control Montevideo como valores de referencia de individuos sanos locales. Comparando los resultados obtenidos para los individuos en estudio respecto al rango normal indicado por el fabricante (Figura 4D) y al rango normal obtenido a partir del Grupo Control Montevideo (IgG: 877-1656 mg/dL, IgM: 57-194 mg/dL, IgA: 125-394 mg/dL), se observó que la gran mayoría de las muestras se encuentran dentro de ambos rangos normales (Figura 4A, 4B y 4C).

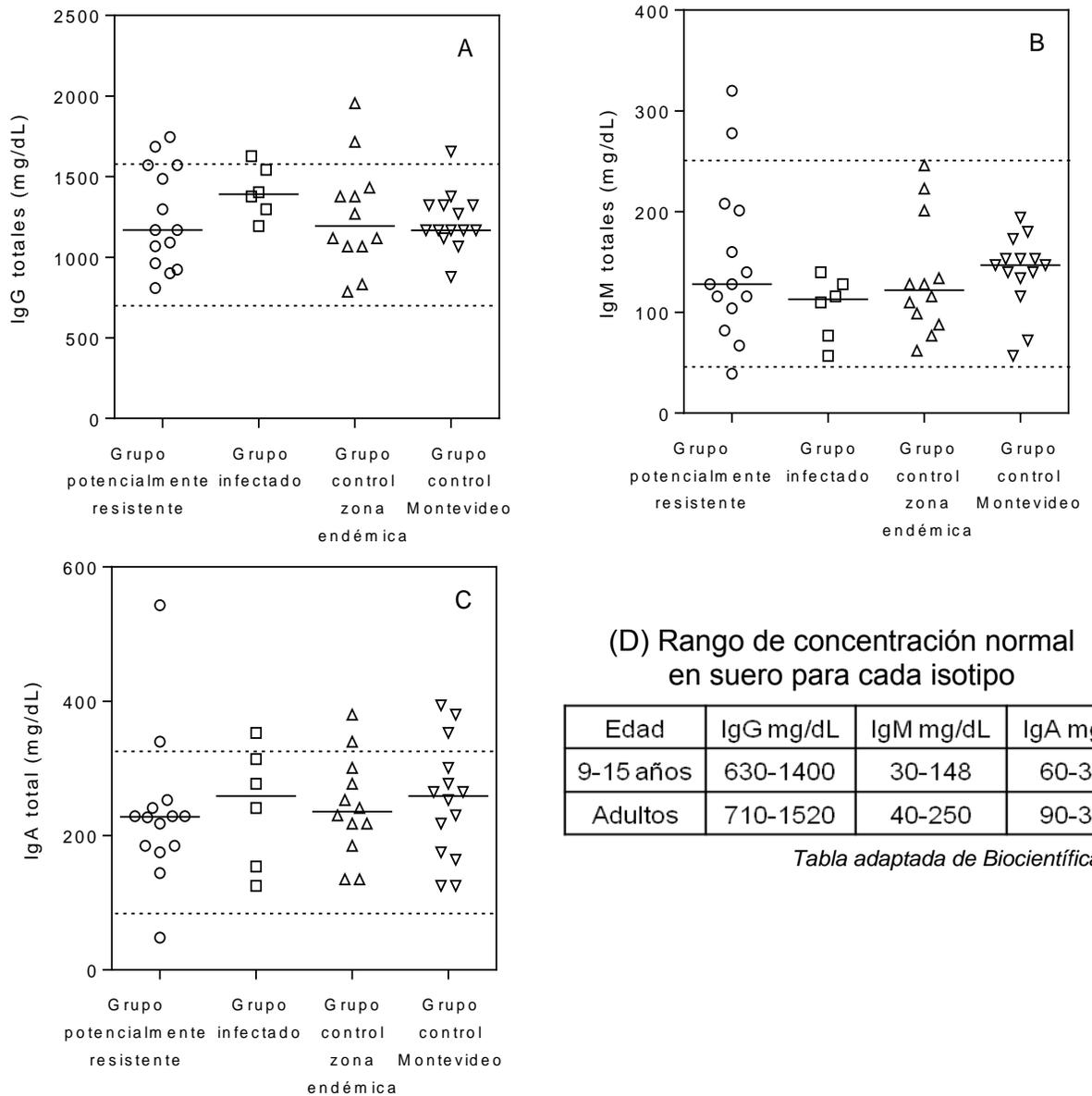


Figura 4 – Concentración de IgG, IgM e IgA totales. La concentración de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) totales en las muestras fue cuantificada por IDR. Los valores individuales (mg/dL) de las muestras de cada grupo se muestran en símbolos. Las líneas sólidas horizontales representan el valor de la mediana de cada grupo. Las líneas punteadas horizontales muestran los valores del rango de concentración sérica normal de cada isotipo según el fabricante de placas de IDR (D).

Titulación de IgG, IgM e IgA específicas contra antígenos somáticos de protoscolec.

De acuerdo a lo reportado hasta la fecha, la equinococosis quística no se caracteriza por ser una infección con una respuesta humoral exacerbada, ya que este parásito tiene un crecimiento lento y posee características inmunomoduladoras (Frider *et al.*, 1999; Moreau y Chauvin, 2010; Riganò *et al.*, 2001). Sin embargo, los anticuerpos específicos contra antígenos parasitarios podrían estar relacionados con la resistencia/susceptibilidad a la infección por *E. granulosus* (Beardsell y Howell, 1984). Asimismo, la resistencia podría estar influenciada por anticuerpos específicos de alta avidéz, aún a bajas concentraciones.

Para comprobar esta hipótesis se analizó el título de IgG, IgM e IgA específicos contra SPE. Realizando una comparación entre los grupos en estudio de los títulos obtenidos para cada isotipo, se observó una diferencia interesante en sintonía con la hipótesis planteada. Esta diferencia muestra que los individuos potencialmente resistentes presentan valores significativamente mayores de título IgG específicas (Figura 5.A) y menores de título IgA específicas (Figura 5.C) respecto al Grupo Infectado y los dos grupos control. Además, tanto el Grupo Potencialmente Resistente como el Grupo Infectado muestran títulos de IgM específicas significativamente

menores a ambos controles (Figura 5.B). Estas diferencias entre el Grupo Potencialmente Resistente y el resto de los grupos sugieren que los anticuerpos podrían tener un papel importante en los fenómenos de resistencia/susceptibilidad en individuos sanos residentes en zona endémica.

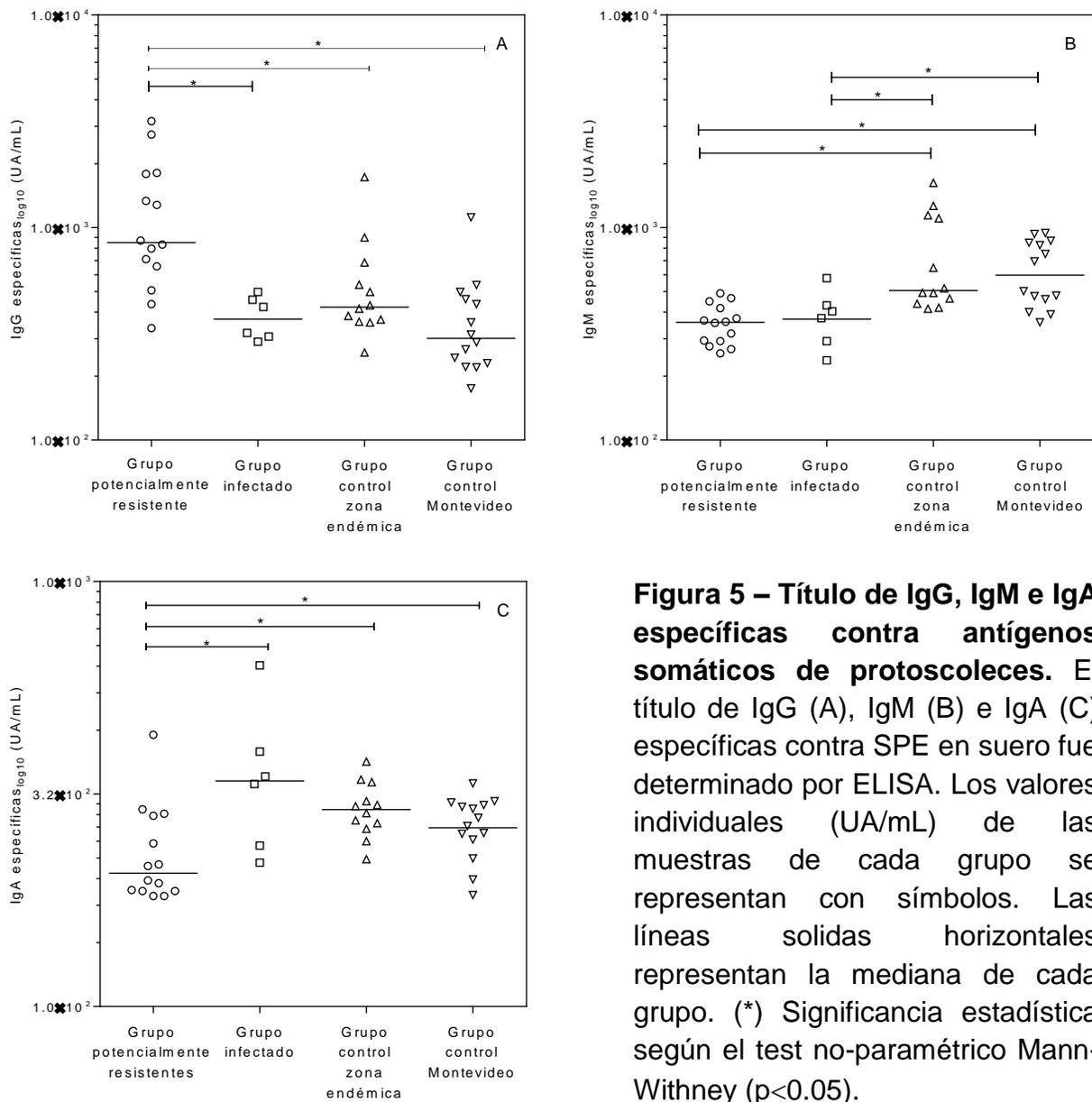


Figura 5 – Título de IgG, IgM e IgA específicas contra antígenos somáticos de protozoos. El título de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicas contra SPE en suero fue determinado por ELISA. Los valores individuales (UA/mL) de las muestras de cada grupo se representan con símbolos. Las líneas solidas horizontales representan la mediana de cada grupo. (*) Significancia estadística según el test no-paramétrico Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Análisis de la relación entre títulos de IgG e IgA específicas.

Trabajos recientes muestran que en algunos modelos experimentales la relación IgG/IgA se correlaciona directamente con la eficiencia de los mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Este hecho, sumado a que ADCC es una de las estrategias de eliminación prometedora en el estudio de la resistencia frente a *E. granulosus*, nos llevó a calcular la relación IgG/IgA específicas. El análisis estadístico muestra que el Grupo Potencialmente Resistente tiene una relación IgG/IgA significativamente mayor que el Grupo Infectado y los grupos control (Figura 6). Estos resultados sugerirían que la inducción de una respuesta humoral con alto título de IgG podría ser más efectiva en la eliminación del patógeno que una respuesta polarizada hacia IgA.

individuos potencialmente resistentes y los demás grupos. Estos resultados sugerirían que si bien el Grupo Potencialmente Resistentes muestra niveles bajos en el título de IgA específicas (Figura 5.C), la calidad de las mismas en términos de avidez podría estar relacionada con los fenómenos de resistencia/susceptibilidad frente la infección por *E. granulosus*.

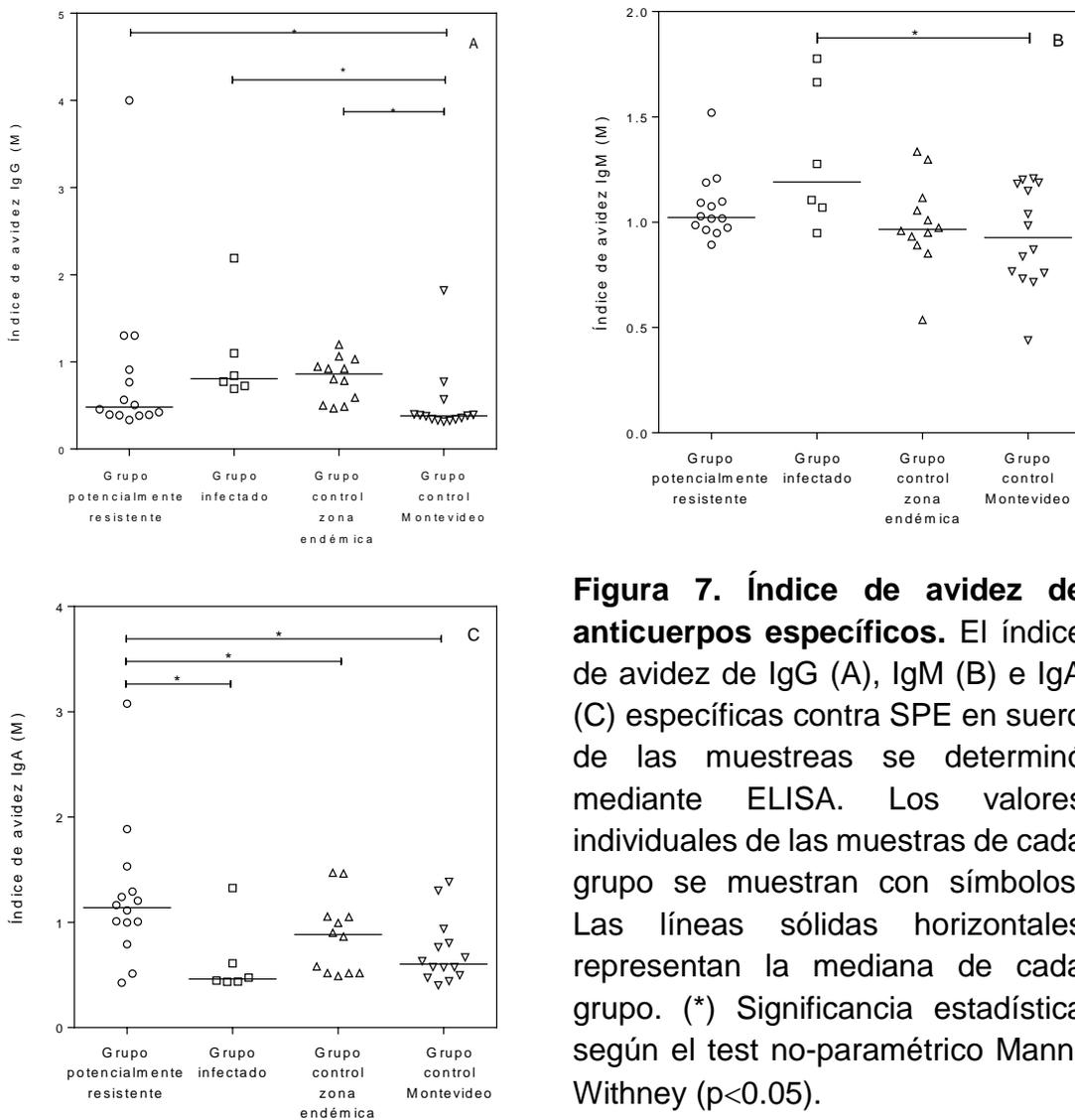


Figura 7. Índice de avidez de anticuerpos específicos. El índice de avidez de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicas contra SPE en suero de las muestras se determinó mediante ELISA. Los valores individuales de las muestras de cada grupo se muestran con símbolos. Las líneas sólidas horizontales representan la mediana de cada grupo. (*) Significancia estadística según el test no-paramétrico Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Discusión

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo mostraron que individuos residentes en una zona endémica (prevalencia aproximada de 1%) para equinococosis quística en Uruguay (Caraguatá, Tacuarembó), resultaron ser seropositivos para IgG contra antígenos crudos de *E. granulosus* pero no presentaban imagen quística compatible por ultrasonido y radiografía en la zona abdomen-torácica (con un seguimiento a lo largo de 2 años). Estos resultados concuerdan con reportes similares provenientes de diferentes países, como Perú (Gavidia *et al.*, 2008), China (Zhang *et al.*, 1994), Libia (Shambesh *et al.*, 1999), Turquía (Arda *et al.*, 2009), Israel (Nahmias *et al.*, 1991) y anteriormente en Uruguay (Bonifacino *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1998). La existencia de individuos sanos residentes en zonas endémicas para *E. granulosus* con serología positiva pero con resultados imagenológicos no compatibles con quiste hidático, ha sugerido que dichos individuos podrían ser resistentes a la equinococosis quística.

La falta de estudios de caracterización sobre individuos potencialmente resistentes a *E. granulosus*, nos llevó a realizar un estudio más detallado sobre los mismos con el fin de poder identificar algún parámetro humoral diferencial entre ellos y los pacientes con equinococosis quística. A partir de las muestras de suero obtenidas y utilizadas por Hernández *et al.* (2005) y en base a datos clínicos, serológicos e imagenológicos, definimos tres grupos de

individuos residentes en zona endémica: (1) individuos potencialmente resistentes (serología positiva sin imágenes quísticas compatibles), (2) individuos infectados (serología positiva con imágenes quísticas compatibles, y confirmadas por cirugía) y (3) individuos no infectados (serología negativa sin imágenes quísticas compatibles). Además, en este estudio se incluyó un cuarto grupo definido como individuos sanos residentes en zona no endémica (ciudad de Montevideo). La descripción de dichos grupos se resume en la Tabla 1.

Previo a la realización de los análisis específicos, se buscó conocer el estado de conservación de las muestras para descartar una posible descomposición de las mismas durante el tiempo de almacenado. Para esto se realizó en primera instancia una cuantificación de proteínas totales en suero, utilizando el método de Bradford. Los resultados obtenidos por esta metodología mostraron un gran número de muestras con valores superiores al rango normal de concentración de proteínas en suero (Figura 3). En este sentido cabe aclarar que los métodos colorimétricos para cuantificación de proteínas tienen sus limitaciones, y en particular el método de Bradford tiende a sobreestimar en más del doble la concentración de albúmina (Harlow y Lane, 1988). Dado que el rango de concentración normal de albúmina en suero humano es de 3,5 – 5,0 g/dL, representando así aproximadamente un 55-60% del total de proteínas séricas (Nicholson *et al.*, 2000), este podría ser el motivo

de hallar tan alto número de muestras por fuera del rango normal. Por ello, para obtener un valor más exacto de concentración proteica en suero se enviaron algunas muestras seleccionadas a un laboratorio clínico para ser analizadas mediante el método de Biuret automatizado (método de rutina utilizado en estudios paraclínicos). Debido a que el volumen de suero solicitado por dicho laboratorio fue relativamente grande, se eligieron 5 muestras del total de forma tal que cubrieran el mayor rango posible de valores de concentración proteica hallada por el método de Bradford. Los resultados muestran que los 5 sueros analizados presentaban valores dentro del rango normal de concentración de proteínas en suero (Tabla 3), confirmando de esta manera que el método de Bradford no es el más adecuado para el análisis de contenido proteico en suero.

En segundo lugar, dado que solamente 5 muestras fueron analizadas mediante el método de Biuret automatizado, lo cual hace imposible concluir sobre el estado de conservación del total de muestras, se realizó una cuantificación de IgG, IgM e IgA totales en las mismas. Los resultados de la cuantificación de isotipos de anticuerpos totales mostraron que la amplia mayoría de las muestras se encuentran dentro de los rangos normales reportados, salvo algunas con valores levemente superiores a los rangos normales (Figura 4). En este sentido, la información disponible de los individuos no permite descartar la posibilidad de que en algunos de ellos

existiese un aumento particular en algún isotipo debido al desarrollo de un proceso infeccioso (ajeno a *E. granulosus*) al momento de la obtención de la muestra. Por otro lado, es interesante mencionar que una de las muestras del Grupo Potencialmente Resistentes (A.6) mostró valores indetectables de IgA total, pero valores normales de IgG e IgM. En este sentido, aunque no podemos concluir sobre las causas de la ausencia de IgA detectable en dicho individuo, se decidió excluir la muestra del resto de los estudios. La ausencia de IgA se confirmó además mediante un ensayo de ELISA de captura específico cuya sensibilidad es aproximadamente 6×10^6 veces mayor que la reportada para la IDR utilizada (datos no mostrados).

Al analizar los valores de concentración de isotipos de anticuerpos entre los grupos en estudio, no se observaron diferencias significativas entre los mismos (Figura 4.A, 4.B y 4.C). Asimismo, en todas las muestras se observó el patrón normal de relaciones de concentración entre inmunoglobulinas séricas (IgG > IgA > IgM) (Regueiro *et al.*, 2010). Estos resultados nos permitieron intuir que no existió descomposición de inmunoglobulinas en el transcurso del tiempo de almacenado. Además, el hecho de no encontrar valores significativamente elevados en los individuos infectados concuerda con reportes previos que indican que la equinococosis quística no se caracteriza por ser una infección con una respuesta humoral exacerbada, ya sea porque el parásito es de crecimiento lento o porque la infección tiene

fuerzas características inmunomoduladoras (Frider *et al.*, 1999; Moreau y Chauvin, 2010; Riganò *et al.*, 2001).

Por otro lado, los resultados obtenidos de la titulación de anticuerpos específicos contra SPE resultaron interesantes a la hora de establecer diferencias entre los componentes humorales capaces de diferenciar a los grupos en estudio. En este sentido, consideramos pertinente tener presente cuáles son los mecanismos efectores capaces de ser desencadenados por cada uno de los isotipos de anticuerpos específicos estudiados, para luego poder discutir más fácilmente los resultados obtenidos. Así, la activación del sistema complemento por vía clásica es posible de darse en presencia de IgM y/o IgG (particularmente IgG1, IgG2 e IgG3). La unión de dichos anticuerpos al antígeno produce un cambio conformacional en sus regiones Fc que permite su unión al componente C1q y de esta forma desencadenar la activación del sistema complemento. Una vez activado, éste puede producir la lisis de microorganismos y la activación de múltiples mecanismos inflamatorios. Los mismos isotipos, sumado a IgA, también pueden neutralizar patógenos y/o moléculas tóxicas, disminuyendo así los fenómenos de infectividad y/o toxicidad. A su vez, los isotipos IgG e IgA son importantes opsoninas que favorecen la fagocitosis, y posterior degradación, de los antígenos o patógenos mediante fagocitos mononucleares o granulocitos. Por otro lado, ciertos isotipos IgG e IgE pueden participar de

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por su sigla en inglés). Este fenómeno consiste en la inducción de muerte en las células dianas mediada por diferentes tipos de leucocitos capaces de reconocer la región Fc de dichos anticuerpos; principalmente células NK para el caso de IgG y eosinófilos para IgE (Regueiro *et al.*, 2010). Interesantemente, se ha sugerido también que el isotipo IgA podría participar en mecanismos de ADCC (Teillaud, 2012).

En el presente trabajo se analizó el título de IgG, IgM e IgA específicas contra antígenos de *E. granulosus*, específicamente contra antígenos somáticos de protoscolec. En este punto cabe mencionar que Hernández *et al.* (2005) trabajaron con antígenos crudos de *E. granulosus* (EgAg), los cuales incluían líquido hidático. Esta diferencia en antígenos, entre otras (número de individuos control, reactivos, equipamientos, etc.), podría explicar al menos parcialmente por qué nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el título IgG de los individuos infectados y los grupos control (Figura 5.A). Sin embargo, nuestros resultados mostraron diferencias significativas importantes en cuanto a los títulos de IgG e IgA específicos, siendo los mismos mayores para IgG y menores para IgA en el Grupo Potencialmente Resistentes respecto a los restantes tres grupos (Figura 5.A y 5.C). Además, los individuos potencialmente resistentes mostraron menores títulos de IgM que ambos grupos control (Figura 5.B). Estas diferencias

cualitativas y cuantitativas podrían apoyar la hipótesis sobre el papel de los anticuerpos en la inmuno-resistencia frente a *E. granulosus* planteada por Beardsell *et al.* (1984) y Rogan *et al.* (1992).

Más recientemente, se ha propuesto que mecanismos de ADCC podrían ser importantes en la eliminación de parásitos helmintos en etapas tempranas de la infección, básicamente antes de desarrollarse la infección crónica (Moreau y Chauvin, 2010; Rogan *et al.*, 2015). En este sentido, se ha reportado que IgG, IgE e IgA podrían participar en mecanismos de ADCC frente a helmintos (Moreau y Chauvin, 2010). Sin embargo, existen reportes contradictorios sobre sinergia (Shen y Fanger, 1981) y antagonismo (Mathew *et al.*, 1981) de IgA e IgG en mecanismos generales de ADCC. Por ejemplo, en un estudio reciente donde se evaluó la ADCC mediada por IgG específicas contra la envoltura viral de VIH, se encontró que el cociente entre los títulos de IgG e IgA específicas (relación IgG/IgA) está directamente relacionado a la eficacia del protocolo vacunal en estudio (Tomaras *et al.*, 2013). Así, los autores sugirieron que los anticuerpos IgA específicos competirían con los IgG de igual especificidad por el antígeno, disminuyendo su eficacia en la inducción de mecanismos de ADCC anti-viral (Tomaras *et al.*, 2013). Salvando las enormes diferencias existentes entre una infección por VIH y una por *E. granulosus*, nuestros resultados sobre el cociente entre títulos específicos IgG e IgA contra SPE muestran que los individuos potencialmente resistentes

posee valores significativamente mayores que el resto de los grupos, y en particular que el grupo de individuos infectados (Figura 6). En la infección por *E. granulosus* se ha sugerido que los mecanismos de ADCC serían relevantes en la respuesta inmune del hospedero (Tabar y Borji, 2010; Rogan *et al.*, 2015) . Así, nuestros resultados sobre la relación IgG/IgA podrían explicar al menos parcialmente la presumible resistencia de los individuos en estudio mediante la inducción de mecanismos de ADCC más eficientes.

Por último, completamos el análisis de los anticuerpos específicos anti-SPE mediante la determinación del índice de avidéz de los mismos (Figura 7). La avidéz de los anticuerpos es una propiedad fisicoquímica influenciada por la afinidad de cada parátipe por su epítipe y por el número de parátipes que posea el anticuerpo (2 en el caso de IgG e IgA sérica y 10 para IgM). Habitualmente se la relaciona con la calidad de la respuesta, mientras que los títulos se asocian a la intensidad de la misma. Así, de la relación final existente entre título y avidéz se puede tener una visión global de la respuesta humoral. Los resultados obtenidos sobre índice de avidéz mostraron que no existen diferencias significativas en IgG e IgM entre los individuos residentes en zona endémica (Figura 7.A y 7.B). Sin embargo, los valores de índice de avidéz para IgA mostraron ser significativamente mayores en Grupo Potencialmente Resistente respecto a los demás grupos en estudio (Figura 7.C). Así, nuestros resultados sugerirían que una maduración preferencial de IgA respecto a IgG,

podrían influir sobre el grado de susceptibilidad a la infección por *E. granulosus*.

Finalmente, teniendo presente los resultados globales obtenidos sobre los distintos parámetros en estudio, podemos sugerir que los individuos sanos residentes en zona endémica potencialmente resistentes a la infección por *E. granulosus*, se caracterizan por presentar respuestas IgG específicas de alta intensidad con valores medios de avidéz, acompañadas de respuestas IgA específicas de baja intensidad pero alta avidéz. Además, las respuestas IgM específicas no parecerían ser relevantes en estos individuos. Así, en el presente trabajo observamos la existencia de un perfil diferencial en la respuesta de anticuerpos entre individuos potencialmente resistentes a la infección e individuos infectados. Estos resultados apoyarían la hipótesis sobre un papel activo del sistema inmune en los fenómenos de resistencia/susceptibilidad frente a la infección por *E. granulosus*.

Bibliografía

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1995). Capítulo 1. In *Inmunología Celular Y Molecular*, pp. 4–8.

Aceti, A., Pennica, A., Teggi, A., Fondacaro, L., Caferro, M., Leri, O., Tacchi, G., Celestino, D., Quaranta, G., and Rosa De, F. (1993). IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. *Int Arch Allergy Immunol* 102, 347–351.

Allen, J.E., and Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375–388.

Amri, M., Mezioug, D., Bouaziz, S., Abdi, S.-Z., and Touil-Boukoffa, C. (2009). Modulation of nitric oxide production by Th1/Th2/Th17/Treg cytokines in culture of *Echinococcus granulosus* protoscoleces: Possible presence of parasitic iNOS. *Cytokine* 48, 79.

Amu, S., Gjertsson, I., and Brisslert, M. (2010). Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scand. J. Immunol.* 71, 275–282.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J., and Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975–987.

Arda, B., Pullukçu, H., Yamazhan, T., Sipahi, O.R., Tamsel, S., Demirpolat, G., and Korkmaz, M. (2009). Prevalence of *Echinococcus granulosus* detected using enzyme immunoassay and abdominal ultrasonography in a group of students staying in a state dormitory in Turkey. *Turkish J. Med. Sci.* 39, 791–794.

Artis, D. (2006). New weapons in the war on worms: Identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol* 36, 723–733.

Baz, A, Hernández, A, Dematteis, S., Carol, H., and Nieto, A (1995). Idiotypic modulation of the antibody response of mice to *Echinococcus granulosus* antigens. *Immunology* 84, 350–354.

Baz, A., Ettlín, G.M., and Dematteis, S. (2006). Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*. *Immunobiology* 211, 3–9.

Beardsell, P.L., and Howell, M.J. (1984). Killing of *Taenia hydatigena* oncospheres by sheep neutrophils. *Parasitol. Res.* 70, 337–344.

Bonifacino, R., Malgor, R., Barbeito, R., Balleste, R., and Rodriguez, M.J. (1991). Seroprevalence of *Echinococcus granulosus* infection in a Uruguayan rural human population.

Boyce, J. A. (2003). Mast cells: Beyond IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 24–32.

Brunetti, E., and Junghanss, T. (2009). Update on cystic hydatid disease. *Curr. Opin. Infect Dis.* 5, 497–502.

Chapman, C.B., and Mitchell, G.F. (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 11, 165–178.

Cohen, H., Paolillo, E., Bonifacino, R., Botta, B., Parada, L., Cabrera, P., Snowden, K., Gasser, R., Tessier, R., Dibarboure, L., et al. (1998). Human cystic echinococcosis in a Uruguayan community: a sonographic, serologic, and epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 620–627.

Craig, P.S. (1986). Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite Immunol.* 8, 171–188.

Daeki, A O., Craig, P.S., and Shambesh, M.K. (2000). IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 319–328.

Dawicki, W., and Marshall, J.S. (2007). New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 31–38.

De Souza, W., De Carvalho, T.M.U., and Barrias, E.S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.* 2010.

Dempster, R.P., Harrison, G.B., Berridge, M. V, and Heath, D.D. (1992). *Echinococcus granulosus*: use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response. *Int. J. Parasitol.* 22, 435–441.

Dessaint, J.P., Bout, D., Watre, P., and Capron, A (1975). Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology* 29, 813–823.

Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J.O., and Ferreira, F. (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–213.

Frider, B., Larrieu, E., and Odriozola, M. (1999). Long-term outcome of asymptomatic liver hydatidosis. *J. Hepatol.* 30, 228–231.

Garcia, H.H., Gonzalez, A. E., Gilman, R.H., Palacios, L.G., Jimenez, I., Rodriguez, S., Verastegui, M., Wilkins, P., Tsang, V.C.W., Torres, P., et al. (2001). Short report: Transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions - A major contributor to high seroprevalence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 31–32.

Gavidia, C.M., Gonzalez, A.E., Zhang, W., McManus, D.P., Lopera, L., Ninaquispe, B., Garcia, H.H., Rodríguez, S., Verastegui, M., Calderon, C., et al. (2008). Diagnosis of cystic echinococcosis, central peruvian highlands. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 260–266.

Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* 44, 1–39.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory).

Harris, N., and Gause, W.C. (2011). B cell function in the immune response to helminths. *Trends Immunol.* 32, 80–88.

Hernández, A, Cardozo, G., Dematteis, S., Baz, A, Trias, N., Nuñez, H., Barragué, A, López, L., Fuentes, J., López, O., et al. (2005). Cystic echinococcosis: analysis of the serological profile related to the risk factors in individuals without ultrasound liver changes living in an endemic area of Tacuarembó, Uruguay. *Parasitology* 130, 455–460.

Hernández-Pomi, A, Borrás-Salvador, R., and Mir-Gisbert, A (1997). Analysis of cytokine and specific antibody profiles in hydatid patients with primary infection and relapse of disease. *Parasite Immunol.* 19, 553–561.

Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., and Jacobson, J. (2008). Review series Helminth infections: the great neglected tropical diseases. 118, 1311–1321.

Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Profumo, E., Franchi, C., Ortona, E., Rigano, R., and Siracusano, A. (1996). Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.* 18, 571–578.

Khabiri, A. R., Bagheri, F., Assmar, M., and Siavashi, M.R. (2006). Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol.* 28, 357–362.

Koyasu, S., Moro, K., Tanabe, M., and Takeuchi, T. (2010). Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. *Adv. Immunol.* 108, 21–44.

Macdonald, A.S., Araujo, M.I., Edward, J., and Pearce, E.J. (2002). Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect. Immun.* 70, 427–433.

Madden, K.B., Whitman, L., Sullivan, C., Gause, W.C., Urban, J.F., Katona, I.M., Finkelman, F.D., and Shea-Donohue, T. (2002). Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *J. Immunol.* 169, 4417–4422.

Maddison, S., Slemenda, S., Schantz, P., Fried, J., Wilson, M., and Tsang, V. (1989). A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDA. *Am J Trop Med Hyg.* 40, 377–383.

Mamuti, W., Sako, Y., Nakao, M., Xiao, N., Nakaya, K., Ishikawa, Y., Yamasaki, H., Lightowers, M.W., and Ito, A. (2006). Recent advances in characterization of Echinococcus antigen B. *Parasitol. Int.* 55, 57–62.

Mathew, G.D., Qualtiere, L.F., Neel, H.B., and Pearson, G.R. (1981). IgA antibody, antibody-dependent cellular cytotoxicity and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* 27, 175–180.

McDowell, M.A., and Sacks, D.L. (1999). Inhibition of host cell signal transduction by Leishmania: Observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 438–443.

Mejri, N., and Gottstein, B. (2009). *Echinococcus multilocularis* metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. *Parasitol. Res.* 105, 1253–1260.

Moreau, E., and Chauvin, A. (2010). Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.

Moro, P., and Schantz, P.M. (2009). Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 125–133.

Nahmias, J., Goldsmith, R., Schantz, P., Siman, M., and el-On, J. (1991). High prevalence of human hydatid disease (echinococcosis) in communities in northern Israel: epidemiologic studies in the town of Yirka. *Acta Trop.* 50, 1–10.

Neill, D.R., and McKenzie, A.N.J. (2011). Nuocytes and beyond: New insights into helminth expulsion. *Trends Parasitol.* 27, 214–221.

Nicholson, J.P., Wolmarans, M.R., and Park, G.R. (2000). The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.* 85, 599–610.

Pagana, K.D., and Pagana, T.J. (2010). Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests (St. Louis, Mo.: Mosby/Elsevier).

Pinon, J.M., Poirriez, J., Lèpan, H., Geers, R., Penna, R., and Fernandez, D. (1987). Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by enzyme-linked immuno-filtration assay. Eur. J. Clin. Microbiol. 6, 291–295.

Pullen, G.R., Fitzgerald, M.G., and Hosking, C.S. (1986). Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. J. Immunol. Methods 86, 83–87.

Rajan, B., Ramalingam, T., and Rajan, T. V (2005). Critical role for IgM in host protection in experimental filarial infection. J. Immunol. 175, 1827–1833.

Regueiro, J.R., López, C., González, S., and Martínez, E. (2010). Los anticuerpos: ligandos y receptores. In Inmunología. Biología Y Patología Del Sistema Inmune, pp. 39–48.

Riganò, R., Profumo, E., Di Felice, G., Ortona, E., Teggi, A., and Siracusano, A. (1995a). In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. Clin Exp Immuno 99, 433–439.

Riganò, R., Profumo, E., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Ortona, E., Teggi, A., and Siracusano, A. (1995b). Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. Clin. Exp. Immunol. 102, 281–285.

Riganò, R., Profumo, E., Teggi, A., and Siracusano, A (1996). Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. Clin. Exp. Immunol. 105, 456–459.

Riganò, R., Profumo, E., Bruschi, F., Carulli, G., Azzarà, A., Buttari, B., Ortona, E., Margutti, P., Teggi, A., and Azzara, A. (2001). Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. Infect. Immun. 69, 288–296.

Rogan, M.T., Craig, P.S., Zehyle, E., Masinde, G., Wen, H., and Zhou, P. (1992). In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. *Acta Trop.* 51, 291–296.

Rogan, M.T., Bodell, A. J., and Craig, P.S. (2015). Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple? *Parasite Immunol.* 37, 1–9.

Shambesh, M. A, Craig, P.S., Macpherson, C.N., Rogan, M.T., Gusbi, A M., and Echuish, E.F. (1999). An extensive ultrasound and serologic study to investigate the prevalence of human cystic echinococcosis in northern Libya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 462–468.

Shambesh, M.K., Craig, P.S., Wen, H., Rogan, M.T., and Paolillo, E. (1997). IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Trop.* 64, 53–63.

Shen, L., and Fanger, M.W. (1981). Secretory IgA antibodies synergize with IgG in promoting ADCC by human polymorphonuclear cells, monocytes, and lymphocytes. *Cell. Immunol.* 59, 75–81.

Shibuya, a, Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., et al. (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat. Immunol.* 1, 441–446.

Siracusano, A., Riganò, R., Ortona, E., Profumo, E., Margutti, P., Buttari, B., Delunardo, F., and Teggi, A. (2008). Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp. Parasitol.* 119, 483–489.

Stanley, A.C., and Engwerda, C.R. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol. Cell Biol.* 85, 138–147.

Sterla, S., Sato, H., and Nieto, A. (1999). *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. *Parasite Immunol.* 21, 27–34.

Tabar, G.R.H., and Borji, H. (2010). Antibody Responses to Hydatid Cyst in Experimentally Infected Lambs. *World Appl. Sci. J.* 8, 1001–1006.

Taylor, M.D., van der Werf, N., and Maizels, R.M. (2012). T cells in helminth infection: The regulators and the regulated. *Trends Immunol.* 33, 181–189.

Teillaud, J. (2012). Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). eLS. John Wiley Sons Ltd 1–8.

Thompson, R.C.. (1995). *Echinococcus and Hydatid Disease.* (Wallingford: CAB International).

Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.-X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., et al. (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9019–9024.

Wen, H., and Craig, P.S. (1994). Immunoglobulin G Subclass Responses in Human Cystic and Alveolar Echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 741–748.

White, C.A., and Kennedy, J.. (1986). Oligosaccharides. In *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, M.F. Chaplin, and J.F. Kennedy, eds. (IRL Press. Oxford), pp. 37–54.

Wilson, M.S., Taylor, M.D., O’Gorman, M.T., Balic, A., Barr, T. A., Filbey, K., Anderton, S.M., and Maizels, R.M. (2010). Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur. J. Immunol.* 40, 1682–1696.

Yong, W., Heath, D., and Van Knapen, F. (1984). Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* infections in sheep. *Res. Vet. Sci.* 36, 24–31.

Zhang, W., Zhang, Z., Alili, H., and Chi, P. (1994). An investigation of factors influencing the hyperendemic of echinococcosis in Xinjiang. *Chin. J. Zoonoses* 10, 204–205.

Zhang, W., Li, J., and Mcmanus, D.P. (2003). Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 18–36.

Zhang, W., Wen, H., Li, J., Lin, R., and McManus, D.P. (2012). Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 101895.