

25
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**INMUNOLOGIA DE LA CISTICERCOSIS MURINA CAUSADA
POR EL CISTICERCO DE TÁENIA CRASSICEPS
VARIEDAD ORF**

**TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ
DIANA LEMUS RIVERA
LAVINIA DEL CARMEN TRUEBA ZEPEDA**

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
FAC. DE QUIMICA

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Diseño Experimental	
1. Variables de tratamiento	8
2. Variables de medida	8
3. Controles	9
4. Análisis estadístico	10
5. Diagrama de trabajo	11
Materiales y Métodos	
1. Valoración de la efectividad de la vacuna	12
1.1. Vacuna de <i>Taenia crassiceps</i>	12
1.1.1. Parásitos	12
1.1.2. Vacunación	13
1.1.3. Desafío	13
1.1.4. Muestras	14
1.2. Vacuna de <i>T. solium</i>	17
1.2.1. Parásitos	17
1.2.2. Vacunación y recolección de muestras	17
1.3. Controles experimentales	18
1.3.1. Ratones vacunados no desafiados (Control de vacuna)	18
1.3.2. Ratones desafiados no vacunados (Control de desafío)	18
2. Respuesta inmune humoral de los ratones infectados. Serología	18
2.1. Obtención de antígeno para serología	19
2.2. Ensayo Inmunoenzimático	19
2.3. Inmunolectrotransferencia	23

2.3.1. Elaboración de geles	23
2.3.2. Corrida electroforética	23
2.3.3. Transferencia	24
2.3.4. Revelado	24
2.3.5. Controles	25
2.3.6. Determinación de bandas antigénicas	26
Resultados	28
1. Efectos sencillos	46
1.1. Efecto del sexo	46
1.2. Efecto del tiempo de acción de la vacuna	47
1.3. Efecto del antígeno	48
1.4. Efecto de la dosis	49
1.5. Efecto de la vía	50
2. Interacciones dobles	50
2.1. Efecto de la interacción sexo-tiempo	50
2.2. Efecto de la interacción sexo-antígeno	51
2.3. Efecto de la interacción sexo-vía	52
2.4. Efecto de la interacción tiempo-dosis	53
2.5. Efecto de la interacción tiempo-vía	54
2.6. Efecto de la interacción antígeno-dosis	55
2.7. Efecto de la interacción antígeno-vía	56
3. Eficiencia y Riesgo Individual	58
4. Inmunoelctrotransferencia	63
Discusión	70
Conclusiones	75
Apéndice I	
Aspectos evolutivos de la relación huésped- parásito	76

Apéndice II

Taenia crassiceps

2.1. Clasificación	83
2.2. Características generales	83
2.3. Morfología y ciclo biológico	86
2.4. Susceptibilidad y respuesta inmunológica contra la larva de <i>Taenia crassiceps</i>	88
2.5. Antígenos comunes de <i>T. crassiceps</i> con otros cestodos	94

Apéndice III

Taenia solium

3.1. Clasificación	96
3.2. Antecedentes	96
3.3. Morfología	97
3.3.1. <i>T. solium</i>	97
3.3.2. <i>Eysticercus cellulosa</i>	99
3.4. Ciclo biológico	99
3.5. Transmisión de Teniasis/Cisticercosis	102
3.6. Patogenia	104
3.6.1. Teniasis	104
3.6.2. Cisticercosis humana	105
3.7. Diagnóstico	108
3.7.1. Diagnóstico de cisticercosis	108
3.7.2. Diagnóstico de teniasis	111
3.8. Tratamiento	112
3.8.1. Cisticercosis	112
3.8.2. Teniasis	114
3.9. Importancia socioeconómica	115

Apéndice IV

Inmunoparasitología	119
4.1. Respuesta inmune/cisticercosis humana	120

4.2. Vacunación experimental contra larvas de céstodos	121
4.2.1. Inmunización con oncósferas activas	122
4.2.2. Inmunización con oncósferas inactivadas	122
4.2.3. Inmunización con antígenos de secreción	123
4.2.4. Inmunización con extracto de estadios larvarios	124
4.2.5. Inmunización pasiva	124
4.3. Perspectivas de la inmunoparasitología	125

Apéndice V

Técnicas

5.1. ELISA

5.1.1. Principio	127
5.1.2. Uso de la interacción avidina-biotina en técnicas inmunoenzimáticas	128
5.1.3. Materiales	128
5.1.4. Lectura y valoración de los resultados	130
5.1.5. Ventajas y desventajas de la técnica	130
5.1.6. Aplicaciones	132
5.1.7. Preparación de reactivos	133
5.2. Inmunolectrotransferencia	133
5.2.1. Principio	134
5.2.2. Corrimiento electroforético	135
5.2.3. Transferencia	137
5.2.4. Inmunodetección	139
5.2.5. Ventajas	140
5.2.6. Aplicaciones	140
5.2.7. Preparación de reactivos	141

Apéndice VI

Gráficas complementarias	143
--------------------------	-----

ABREVIATURAS EMPLEADAS

A	Absorbancia
Ac's	Anticuerpos
Ag	Antígeno
BSA	Albúmina sérica bovina
E	Eficiencia
IET	Inmunolectrotransferencia
IP	Intraperitoneal
μ	Media aritmética
MNC	Medias mínimo cuadráticas
N	Número de parásitos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
Ri	Riesgo individual
SC	Subcutánea
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSI	Solución salina isotónica
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
V	Volumen de parásitos

RESUMEN

Las investigaciones sobre cisticercosis podrían resultar en una vacuna que disminuyera el riesgo de padecer esta enfermedad. Es necesario empezar con modelos experimentales que faciliten su diseño. El modelo empleado en el presente trabajo fue el cisticerco de *Taenia crassiceps* adaptado a la cavidad intraperitoneal de ratones. Se estudiaron diferentes condiciones de vacunación, evaluándose: dosis (100, 200 y 500 μg /ratón), vía de administración (subcutánea e intraperitoneal), fuente de antígeno para vacuna (cisticercos de *T. crassiceps* y cisticercos de *Taenia solium*), tiempo de acción de la vacuna (30 y 60 días) y efecto de sexo.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la carga parasitaria en los animales vacunados en contraste con los controles, y en especial cuando se vacunó con extracto antigénico de cisticercos de *T. solium* administrado por vía subcutánea, con dosis de 500 μg /ratón o con el cisticerco de *T. crassiceps* por vía subcutánea con dosis de 100 μg /ratón. Con esto se muestra una inmunoprotección cruzada entre ambos parásitos. Respecto al sexo, se encontraron diferencias de susceptibilidad a la infección, siendo los machos los más refractarios a enfermarse, aunque con la vacunación ambos sexos se ven igualmente protegidos.

La respuesta inmune humoral evaluada por ELISA e inmunoelctrotransferencia, no mostró ser la efectora de la protección de los animales.

Se concluye que la vacuna sí protege y lo hace por igual tanto en hembras como en machos y que la diferencia de susceptibilidad observada entre ambos sexos no está mediada inmunológicamente.

INTRODUCCION



INTRODUCCION

El objetivo inmediato de este trabajo es evaluar la capacidad de la vacunación en reducir el riesgo o la gravedad de la cisticercosis experimental del ratón. De concluirse positivamente, la vacunación se aplicaría a lechones expuestos a desechos naturales en situaciones de alta incidencia. De reducir el riesgo o nivel de parasitosis en el cerdo, la vacunación interrumpiría el ciclo de transmisión de la *Taenia solium* y podría pensarse a futuro la posibilidad de aplicarla también en humanos.

La cisticercosis causada por la larva de *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*) es una de las parasitosis de mayor importancia para la salud humana y economía de la porcicultura en México (Aluja, A. et al. 1986).

La más grave de las cisticercosis es la neurocisticercosis humana, que consiste en el establecimiento del parásito a nivel de Sistema Nervioso Central. En México y otros países de escaso desarrollo, la neurocisticercosis se presenta con relativa frecuencia (Aluja, A., et al 1985) y es generalmente de consecuencias fatales, ya que si bien se cuenta ya con fármacos parasitotóxicos efectivos (Escobedo, F., et al 1982), no se han encontrado las medidas terapéuticas que controlen los daños que ocasiona el cisticerco en el tejido cerebral (Aluja, A., et al, 1985) (Apéndice III).

Taenia solium es un parásito helmíntico obligado, cuya reproducción sexual se lleva a cabo en el hombre (huésped definitivo) y su estadio larva-

rio, el cisticerco, se aloja preferentemente en tejido muscular y cerebral, tanto del hombre como del cerdo (huéspedes intermediarios). La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevecillos de *Taenia solium* excretados en las heces de los portadores del parásito adulto. La enfermedad se transmite principalmente en lugares con condiciones higiénicas y habitacionales desfavorables, donde se practique el fecalismo al aire libre. Se considera que las áreas más afectadas corresponden a regiones de Asia, Africa y América Latina (Aluja, A., *et al.*, 1985). Se han estimado cuantiosas pérdidas originadas por cisticercosis porcina, puesto que la prevalencia de un alto índice de infección en el animal, trae como consecuencia la necesidad de desecharlo e incinerarlo (Acevedo, A., 1982; Tay, J *et al.*, 1985; Aluja, A. *et al.*, 1985).

Muchos autores han mencionado que las medidas de control para combatir la transmisión de la cisticercosis, estriban en la identificación y tratamiento del teniásico, el saneamiento de la porcicultura y la lucha contra la contaminación fecal del ambiente y los alimentos. Sin embargo, debido a la alta incidencia de la enfermedad, en una sociedad donde la mayor parte de la población corresponde a la clase socioeconómicamente baja, con cinturones de miseria marginados distribuidos en todo el país, y con muy pocas posibilidades inmediatas de unificación social, la educación de las masas conducente a un cambio radical de conducta parece ser utópica.

Por otro lado, las medidas terapéuticas con las que se cuenta, rara vez resultan en un resta-

blecimiento total del enfermo (Escobedo, F., *et al*, 1982). De ahí la necesidad de encontrar otros recursos que puedan proveer de protección tanto a los cerdos como a la población humana.

Un procedimiento que puede interrumpir el ciclo de vida del parásito, y así disminuir el riesgo tanto individual como comunitario de contraer una enfermedad infecciosa, sería la vacunación de los huéspedes intermediarios como el cerdo. La vacuna implica la administración deliberada de un organismo patógeno atenuado, inactivado o sus derivados, que pueda inducir en el receptor una respuesta inmune que impida el establecimiento del parásito una vez que éste ha penetrado en el organismo (Larralde, C., Flisser, A., and Pérez, M., 1982).

La vacunación es una medida que aprovecha la existencia de la respuesta inmune del organismo. Debido a que la enfermedad es un proceso que depende de varios factores como los inmunológicos, técnicos, temporales y sociales (Escobedo, F., *et al*, 1982), el presente trabajo pretende aprovechar la respuesta inmune del huésped para interrumpir el ciclo de vida del parásito (Apéndice IV).

Pensar en una vacuna contra la cisticercosis implica primero considerar todos los factores que están involucrados en la enfermedad, así como un aspecto de adaptación muy importante entre los parásitos, es decir, la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped, y segundo comprender los mecanismos de la relación huésped-parásito en esta enfermedad (Apéndice I).

Las perspectivas de vacunación contra parasiti-

tosis, se han incrementado en los últimos años, sobre todo en paludismo, leishmaniasis y babesiosis (Timms, P. *et al.*, 1986). Investigaciones recientes de vacunación en cerdos informan una disminución en el número de cisticercos establecidos después de la administración experimental de huevecillos (Molinari, *et al.*, 1983). Aún cuando no existen estudios confiables que evalúen la posibilidad de vacunación en el hombre o en el cerdo contra la cisticercosis por *T. solium* en situaciones experimentales, muchos autores han manifestado que la respuesta inmune humoral juega un papel importante contra el establecimiento temprano de larvas en otras cisticercosis de animales (Musoke and Williams, 1975; Rickard and Dutteridge, 1974). El papel de la respuesta inmune celular no ha sido evaluado.

El estudiar la relación céstodo-huésped y poder analizar las variables que participan en la eficiencia de la vacunación, implica someter a una población de individuos a distintas condiciones de experimentación. Lo ideal sería estudiar esta relación en el hombre, sin embargo por cuestiones tanto éticas como prácticas, es preferible utilizar modelos de laboratorio.

Freeman, en 1962, aisló de una infección natural, un céstodo perteneciente a la familia de los ténidos, denominado *Taenia crassiceps*. A partir de entonces los metacéstodos se han empleado para facilitar el estudio de la relación céstodo-huésped, así como la estimulación de la inmunidad a parásitos y su utilización como modelos experimentales de otras enfermedades por céstodos.

Las larvas de *T. crassiceps* ofrecen varias

ventajas para pensar en ellas como un modelo experimental de *T. solium*. En primer lugar, podríamos mencionar su capacidad de reproducirse asexualmente por gemaciones exógenas en su estadio larvario, propiedad que ha permitido mantenerlas fácilmente en ratones de laboratorio por pases intraperitoneales sucesivos (Freeman, R.S., 1962). En segundo lugar, se trata de un céstodo que infecta a cánidos como gusano adulto, y a roedores en su forma larvaria (Freeman, R.S., 1962); aún cuando se ha reportado un sólo caso excepcional de la infección en el hombre (Freeman, R.S., 1973), se puede considerar que no ofrece ningún daño potencial para el mismo. Finalmente, un aspecto muy importante, es que al estudiar la composición antigénica del cisticerco de *T. crassiceps* (Montoya, R.M., et al. VII Congreso Nacional de Inmunología, 1987), se ha encontrado que existe antigenicidad cruzada entre el metacéstodo de *T. crassiceps* y el de *T. solium*, y que los antígenos que comparten pueden ser importantes tanto para el diagnóstico como en la vacunación.

Respecto al modo de acción de los anticuerpos contra los cisticercos, las pocas observaciones realizadas, difieren radicalmente en sus posturas. Por un lado Gemmell, M.A. y MacNamara, F. (1972), manifestaron que existe una protección relativamente elevada contra la larva del gusano adulto, y que parece estar mediada por la inmunidad humoral principalmente, impidiendo el establecimiento de los estadios evolutivos tempranos. Los mismos autores reconocen que los cisticercos maduros parecen no ser susceptibles a la destrucción inmune. Chernin,

J. (1977) postula por el contrario que los anticuerpos producidos por el huésped no parecen ser efectivos contra la cisticercosis en ningún estadio evolutivo (Apéndice II).

Más específicamente, el objetivo de este estudio consiste en establecer si los antígenos comunes entre las larvas de *Taenia crassiceps* y *T. solium* proveen de protección cruzada a ratones de la cepa BALB/c inmunizados con un extracto crudo de *Cysticercus cellulosae* o cisticercos de *T. crassiceps* y desafiados con una carga parasitaria de cisticercos de *T. crassiceps*. Determinar la eficiencia de la vacunación a distintas dosis y administrada por diferentes vías a distintos tiempos entre la vacunación y el desafío. Intentaremos establecer el papel de la respuesta inmune humoral en esta parasitosis e identificar por inmunoelectrotransferencia los antígenos involucrados en la protección.

DISEÑO EXPERIMENTAL

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado en este estudio fue el completamente al azar (Bhattacharyya and Johnson, 1977) en un arreglo factorial, y comprende de dos tipos de variables: las variables de tratamiento y las variables de medición.

1. VARIABLES DE TRATAMIENTO

a) Sexo	Hembras, Machos
b) Vía de inoculación	Intraperitoneal, Subcutánea
c) Tiempo entre vacuna y desafío	30, 60 días
d) Dosis	100, 200 y 500 μ g/ratón
e) Antígeno de vacuna	Cisticercos de <i>T. oelium</i> Cisticercos de <i>T. crassiceps</i>

Las combinaciones de todos los niveles de estos factores (tratamientos) se estudiaron empleando grupos de 10 ratones de la cepa BALB/c (10 repeticiones por tratamiento), de 4-5 semanas de edad, manteniendo algunas variables constantes tales como desafío (10 cisticercos de *Taenia crassiceps* vía intraperitoneal) y tiempo de evolución de la enfermedad (30 días).

2. VARIABLES DE MEDIDA.

La enfermedad se midió solamente por carga parasitaria, y ésta de dos maneras:

a) % Eficiencia (E)

$$E = \frac{\text{Prom. Parásitos esperado} - \text{Prom. Parásitos encontrado}}{\text{Prom. Parásitos esperado}} \times 100$$

b) % Riesgo individual (RI)

$$RI = \frac{\text{Número de ratones enfermos}}{\text{Número de ratones totales}} \times 100$$

y la respuesta inmune se midió de dos formas:

- c) Anticuerpos reconocidos por ELISA (A 492 nm)
- d) Bandas reconocidas por Inmunolectrotransferencia

3. CONTROLES.

- a) Animales vacunados no desafiados
- b) Animales desafiados no vacunados
- c) Animales no vacunados no desafiados

Es importante hacer notar que la evaluación de la enfermedad tomando en cuenta el % de Eficiencia valora la disminución de la carga parasitaria de los individuos vacunados en función de los no vacunados. La evaluación por Riesgo individual es más demandante ya que considera que un individuo está enfermo cuando presente al menos 1 parásito; es decir, bajo este criterio están tan enfermos aquellos individuos que presenten 1 parásito como aquellos que presenten 1000 parásitos o más o menos.

4. ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados se analizaron por medio de un modelo completamente al azar de efectos fijos (Mendez, I. 1981) que se representa a continuación:

$$Y_{ijklmn} = \mu + S_i + T_j + A_k + D_l + V_m + (ST)_{ij} + (SA)_{ik} + (SD)_{il} + (SV)_{im} + (TA)_{jk} + (TD)_{jl} + (TV)_{jm} + (AD)_{kl} + (AV)_{km} + (DV)_{lm} + \epsilon_{(ijklm)n}$$

Donde:

Y_{ijklmn} es la n-ésima observación del número de parásitos o título de Ac's o volumen de parásitos en la m-ésima vía de inoculación de la l-ésima dosis de vacuna del k-ésimo antígeno en el j-ésimo tiempo entre la vacuna y el desafío para el i-ésimo sexo.

μ es la media general.

S_i es el efecto del i-ésimo sexo (i= H y M)

T_j es el efecto del j-ésimo tiempo entre la vacuna y el desafío (j= 30 y 60 días).

A_k es el efecto del k-ésimo antígeno de vacuna (k= cisticercos de *T. solium* y cisticercos de *T. crassiceps*).

D_l es el efecto de la l-ésima dosis de antígeno (l= 100, 200 y 500 μg /ratón).

V_m es el efecto de la m-ésima vía de administración de la vacuna (m= IP y SC).

$(ST)_{ij} + (SA)_{ik} + \dots + (DV)_{lm}$ son los efectos de las interacciones en dos sentidos de los factores.

$\epsilon_{(ijklm)n}$ es el error aleatorio dentro de todo el modelo.

El método utilizado para el análisis fue el de mínimos cuadrados descrito por Searle en 1971. Se empleó el paquete SAS (Statistical Analysis System) adaptado para IBM PC versión 6.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO.

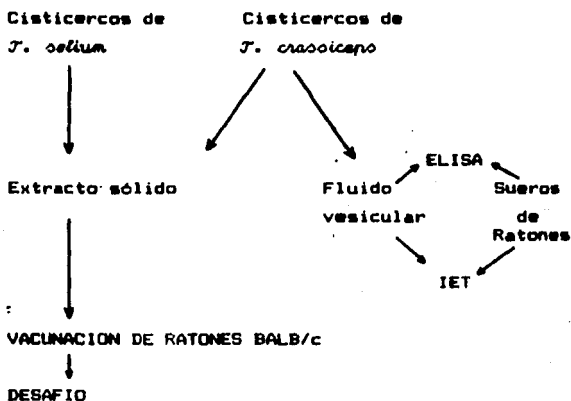


Fig. 1.

Esquema de flujo de materiales y acciones.

Se muestra que de los cisticercos se obtuvo separadamente extracto sólido y fluido vesicular. El primero empleado en la vacunación de los animales y el segundo utilizado como antígeno para detección de anticuerpos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. VALORACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA VACUNA.

1.1 Vacuna de *Taenia crassiceps*.

1.1.1. Parásitos.

El metacéstodo de *Taenia crassiceps*, variedad ORF, aislado en 1957, y empleado en el presente estudio, se obtuvo de un lote de parásitos mantenido por inoculación intraperitoneal, en ratones hembras, de la cepa BALB/c, infectados entre las 4-5 semanas de edad.

Los pases sucesivos se realizaron en hembras porque en ellas crecen más rápido (Freeman, R., 1962; Sciutto, E., *et al*, VII Congreso Nacional de Inmunología, 1987), no son tan agresivas como los machos, y consecuentemente hay menos muertes entre ellas.

Para la elaboración de la vacuna, se llevaron a cabo las siguientes acciones:

- a) Colectar los metacéstodos de la cavidad intraperitoneal de hembras BALB/c, 60 días después de la infección.
- b) Lavar la cavidad intraperitoneal con fosfato de sodio 0.1M-NaCl 0.15M, pH 7.4 (PBS).
- c) Lavar los metacéstodos 4 veces con PBS (para disminuir las proteínas adheridas a la superficie externa de los cisticercos).
- d) Resuspender en PBS los cisticercos en relación de 3:1 (V:V).
- e) Homogeneizar en un Polytron, obteniendo un extracto crudo.
- f) Determinar concentración de proteínas y ajustar a (9 mg/ml por el método de Lowry) (Lowry, D.H.,

et al., 1951).

- g) Almacenar el extracto a -70°C , separado en alícuotas de 2 ml cada una hasta su uso.

1.1.2. Vacunación.

En la vacunación se emplearon ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, de 4-5 semanas de edad, mantenidos en grupos de 10 ratones del mismo sexo en jaulas de policarbonato de 16 cm de área de piso, con una tapa de barras tipo Cambridge de acero inoxidable, tapados con filtros de poliéster rígido tipo Kraft, y provistos de alimento (Mouse Diet 5015 de Ralston Purina San Luis Missouri) y agua *ad libitum*.

Para establecer si la dosis de la vacuna tenía alguna relación con la protección se administraron 3 diferentes dosis: 100 μg , 200 μg y 500 μg de proteína del extracto crudo/ratón.

Como adyuvante se utilizó $\text{Al}(\text{OH})_3$ en una proporción de 1.0 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ por 29.76 mg de proteína total de vacuna.

Para evaluar la eficacia de la vía de vacunación, se vacunó un lote por vía intraperitoneal con 0.2 ml y con las diferentes dosis de la vacuna, y un segundo lote por la vía subcutánea en el miembro posterior, cerca de los ganglios linfáticos con las mismas dosis que para la vía intraperitoneal.

1.1.3. Desafío.

Todos los ratones recibieron por vía intraperitoneal, 10 cisticercos de *Taenia crassiceps*, menores de 2 mm, sin gemaciones, en un volumen de

0.2 ml de PBS.

Con el fin de observar cuánto tiempo dura la protección conferida por la vacuna, un primer grupo de ratones sometidos a las condiciones anteriores fue desafiado 30 días después de la vacuna, y a un segundo grupo se le desafió 60 días después de la vacunación.

1.1.4. Muestras.

Todos los animales se procesaron 30 días después del desafío de la siguiente forma:

- a) Anestesiarse los ratones con éter.
- b) Sangrar por el plexo retro-orbital; almacenar la sangre a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y luego a 4°C durante toda la noche. Separar el suero del coágulo por centrifugación (10 min a 2000 rpm) y almacenar en tubos de vidrio a -20°C hasta su uso.
- c) Sacrificar los ratones por dislocación cervical.
- d) Revisar la cavidad peritoneal, la cavidad pleural y las gónadas. Remover los cisticercos presentes irrigando con PBS y recolectarlos en tubos graduados.
- e) Contar el número de parásitos y medir el volumen de cisticercos que portaba cada ratón (Fig.2 y 3).



Fig. 2. Conteo del número de cisticercos. Debido al gran tamaño que presentan los cisticercos, se facilita su recolección y conteo. Como puede observarse, el número de cisticercos se determinó por succión con una jeringa.



**Fig. 3. Medición del volumen ocupado por los
cisticercos.**

**Nótese que la determinación del volumen se faci-
lita notablemente por la estructura macroscópica
del parásito.**



**Fig. 8. Medición del volumen ocupado por los
cisticercos.**

Nótese que la determinación del volumen se facilita notablemente por la estructura macroscópica del parásito.

1.2. Vacuna de *Taenia solium*.

1.2.1. Parásitos.

Para establecer si el cisticerco de *T. solium* induce protección cruzada contra el metacéstodo de *Taenia crassiceps*, un grupo de ratones se vacunaron con antígenos de cisticercos de *T. solium* y se desafiaron con cisticercos de *T. crassiceps*. Los cisticercos de *T. solium* provenían de cerdos cisticercosos (Rastro de Industrial de Abastos, Ferrería, Cd. de México), a los cuales se les extrajeron los metacéstodos 24 h después de la matanza. Los cisticercos se disecaron del músculo esquelético del cerdo, evitando romper la pared vesicular, y se liberaron de la capsula de tejido conectivo que generalmente los recubre. La recolección se realizó en PBS frío evitando exponerlos a la luz solar y se lavaron 3 veces con PBS. Los cisticercos, por medio de un Polytron, se homogeneizaron obteniéndose así un extracto crudo que se mantuvo a -70°C , separado en alícuotas de 2 ml cada una, hasta su uso.

1.2.2. Vacunación y recolección de muestras.

La vacunación se realizó en forma similar que con *Taenia crassiceps*:

- a) Emplear 3 diferentes dosis, 100, 200 y 500 μg de proteínas/ratón, con $\text{Al}(\text{OH})_3$ en la misma relación, e inocular por vía intraperitoneal y subcutánea a ratones BALB/c de ambos sexos.
- b) Desafiar con 10 metacéstodos de *T. crassiceps* por ratón, todos menores de 2 mm, 30 y 60 días después de la vacunación.
- c) Sacrificar los ratones después de 30 días del

desafío.

- d) Extraer la sangre de todos los ratones para separación y análisis del suero.
- e) Determinar el número y volumen de parásitos desarrollados.

1.3. Controles experimentales.

1.3.1. Ratones vacunados, no desafiados (Control de vacuna).

Con el objeto de establecer si la vacunación, induce respuesta inmune, se inocularon ratones BALB/c de ambos sexos con extracto de las larvas de *Taenia crassiceps* y *Taenia oolium* en lotes por separado, con las tres diferentes dosis, por vía subcutánea e intraperitoneal y se sacrificaron a los 30 y 60 días después de la vacunación para analizar el contenido de anticuerpos séricos.

1.3.2. Ratones desafiados, no vacunados (Control de desafío).

Dos lotes de ratones de ambos sexos (con diez individuos cada uno) fueron desafiados con diez parásitos de 0.2 mm de diámetro y sacrificados 30 días después, para contar el número esperado de parásitos y la respuesta inmune a la infección. Estos animales se emplearon para evaluar la eficiencia de la vacunación.

2. RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE LOS RATONES INFECTADOS. SEROLOGIA.

La evaluación de los niveles de anticuerpos de los sueros y la identificación de los antígenos in-

munogénicos se realizó por Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

De cada lote de 10 ratones sometidos a las mismas condiciones, se seleccionaron 4 de los sueros que presentaran menor grado de hemólisis. Los sueros se procesaron por triplicado y en cada sesión se corrieron 4 placas con 12 sueros cada una (5 sueros de ratones de ambos sexos, vacunados y desafiados y 5 de ratones vacunados-no desafiados con las 3 diferentes dosis. Además se corrieron dos muestras de sueros provenientes de ratones normales en cada placa (sin vacunación ni desafío).

2.1 Obtención del Antígeno para serología.

El Ag empleado para el ELISA consistió en líquido vesicular del metacéstodo de *Taenia crassiceps* variedad ORF, el cual se obtuvo de la siguiente manera:

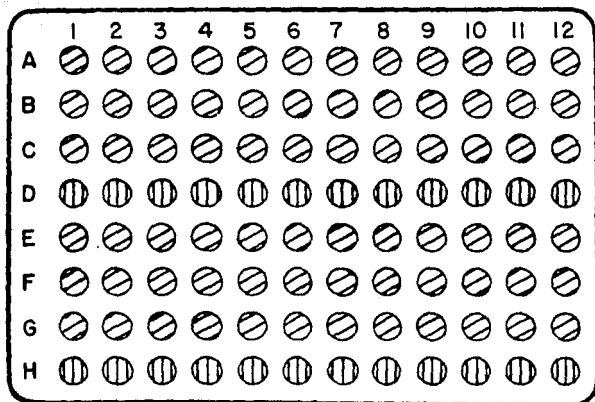
- a) Colectar cisticercos de la cavidad intraperitoneal de un lote de ratones de la cepa BALB/c.
- b) Lavar los cisticercos con PBS.
- c) Centrifugar a 15 000 rpm durante 1 hora a una temperatura entre 0-10°C.
- d) Determinar el contenido de proteínas por el método de Lowry y ajustar a 9 mg/ml.
- e) Almacenar a -70°C en alícuotas de 2 ml cada una.

2.2. Ensayo Inmuno Enzimático.

El ELISA se realizó empleando placas de Immulon con fondo en U de la siguiente forma:

- a) Sensibilizar unos pozos con 100 µl del fluido vesicular conteniendo 1% de proteína y otros con 100 µl de BSA al 1% en PBS) purificada y

- libre de inmunoglobulinas (Fig. 4).
- b) Incubar las placas a 37°C 1 h y toda la noche a 4°C. Lavar 3 veces con PBS-Tween al 0.1% para eliminar las proteínas no adheridas.
 - c) Adicionar a cada pozo 100 µl de BSA purificada al 1% en PBS e incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Lavar 3 veces con PBS-Tween 0.1%.
 - d) Incubar cada pozo con 100 µl de cada suero diluido 1:20 en PBS-BSA al 0.1%, 2 h a 37°C. (Fig. 5). Lavar 3 veces con PBS-Tween.
 - e) Agregar a cada pozo 100 µl de anti-inmunoglobulina de ratón biotinilada (Amersham), preparada en carnero, diluida 1:2000 en PBS. Incubar las placas 1 h a 37°C. Lavar 3 veces con PBS-Tween.
 - f) Añadir a cada pozo 100 µl de estreptoavidina-peroxidasa (Amersham) diluida 1:2000 en PBS. Incubar 1 h a 37°C. Lavar 3 veces con PBS-Tween.
 - g) Adicionar a cada pozo 100 µl de ortofenilendiamina (Sigma) 0.4 mg/ml y H₂O₂ al 0.03% en amortiguador de citrato fosfato (0.1M, pH 5), para determinar la actividad enzimática. Incubar 30 min a 37°C.
 - h) Agregar a cada pozo 50 µl de H₂SO₄ 4 N para detener la reacción.
 - i) Determinar la absorbancia a 492 nm en el Procesador Automático Behring para ELISA, cuantificando los anticuerpos anti-cisticerco unidos a cada pozo.



POZOS SENSIBILIZADOS CON $1\mu\text{g/ml}$ de Ag (fluido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps*)

POZOS SENSIBILIZADOS CON BSA 1%

Fig. 4. Sensibilización de los pozos en las placas para ELISA utilizados en la evaluación del nivel de Ac's. La sensibilización con BSA al 1% se realizó con el objeto de determinar adherencias inespecíficas en un primer paso.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero tratado por triplicado	A	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	B	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	C	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
CONTROL	D	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	E	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	F	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	G	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	H	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗

⊗ Sueros de individuos
vacunados y desafiados

⊗ Sueros de individuos
vacunados no desafiados

⊗ Sueros de individuos
no vacunados
no desafiados

Fig. 5. Tipo de muestras evaluadas por ELISA. Nótese que para cada uno de los sueros se corre un control de BSA (de acuerdo con el esquema anterior). Las columnas 11 y 12 se trataron con sueros de individuos no vacunados-no desafiados (normales).

2.3. Inmunolectrotransferencia.

2.3.1. Elaboración de geles.

La electroforesis del fluido vesicular con dodecil sulfato sódico (SDS) y mercaptoetanol, se realizó en geles de poliacrilamida (PAGE), en base al siguiente protocolo (Larralde, C., *et al*, 1986):

- a) Preparar un gel inferior con acrilamida al 7% y SDS al 0.1% y montarlo entre 2 placas de vidrio, de tal manera que sus medidas sean 14 cm de largo, 13 cm de ancho y 1.5 mm de espesor.
- b) Permitir la polimerización del gel en forma recta, adicionando unas gotas de isopropanol sobre su superficie (aproximadamente 45 min).
- c) Lavar con agua destilada 2 veces el borde superior del gel y adicionar amortiguador para su conservación (Tris-Cl 0.37 M, SDS 0.1%, pH 8), dejar reposar toda la noche tapado.
- d) Preparar el gel superior con 3% de acrilamida y SDS al 0.062% (14 cm de largo, 2.5 cm de ancho y 1.5 mm de espesor. Colocar sobre el gel inferior y adicionar isopropanol.
- e) Permitir la polimerización (aproximadamente 30 min) y lavar 2 veces con agua destilada.

2.3.2. Corrida Electroforética.

- a) Adicionar a la cámara electroforética el amortiguador Tris 0.25 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH 8.3.
- b) Montar el sistema de geles en la cámara electroforética.
- c) Adicionar el antígeno previamente preparado a volúmenes iguales con una solución amortigua-

dora (ver pág.141 ,Apéndice V), 2 ml totales por gel y calentar a ebullición 4 min.

- d) Realizar la electroforesis a 20 V hasta que el frente de corrida haya atravesado el gel superior (aproximadamente 1 h), y luego a 40 V hasta que el antígeno llegue al borde inferior del gel (2-3 h), manteniendo la temperatura a 10 °C.

2.3.3. Transferencia.

La Inmunolectrotransferencia se llevó a cabo sobre papel de nitrocelulosa a 2 A, durante 60 min en amortiguador Tris-Glicina, pH 8.35, manteniéndola a una temperatura menor a 37°C. El papel con los antígenos transferidos, se guardó en BSA 3% en PBS-Tween 0.3% durante toda la noche a 4°C.

2.3.4. Revelado.

- a) Lavar 3 veces el papel de nitrocelulosa con PBS-Tween 0.3%. Dejar secar.
- b) Cortar el papel en tiras de 0.3 cm cada una, paralelas al eje de migración del antígeno.
- c) Incubar cada tira con 100 µl de suero diluido 1:20 en PBS, utilizando las mismas muestras que para el ELISA, manteniéndolas 4 h en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- d) Lavar 3 veces con PBS-Tween 0.3%.
- e) Sumergir las tiras en una dilución en PBS 1:400 Anti-inmunoglobulina de ratón biotinilada (Amersham) e incubar a temperatura ambiente en agitación suave durante 1 h. Lavar 3 veces con PBS-Tween.
- f) Sumergir las tiras en una dilución 1:400 de estreptoavidina-peroxidasa (Amersham) en PBS, incu-

bándolas 30 min a temperatura ambiente en agitación suave. Lavar 3 veces con PBS-Tween, y 2 veces con PBS.

- g) Sumergir las tiras en la solución de revelado que contiene el sustrato (30 mg de o-cloronaf-tol (Sigma)), 10 ml de metanol, 50 ml de PBS y 50 μ l de H_2O_2 , adicionados inmediatamente antes de usarse. Los anticuerpos unidos a las bandas de proteínas, se tificaron de color azul violeta 5-10 min después de la inmersión de las tiras. Lavar exhaustivamente con agua corriente.

2.3.5. Controles.

Durante la Inmuno-electrotransferencia se manejaron 2 controles:

- a) Control de electroforesis.- Con el objeto de ver si había una adecuada separación de las bandas protéicas a lo largo del gel, se separó una tira de éste después de la corrida electroforética y se tificó con Azul de Coomassie durante 24 h a temperatura ambiente, después de las cuales se destificó con ácido acético al 10% para observar las bandas de proteínas.
- b) Control de transferencia.- Para observar si las bandas de proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a la matriz inmovilizadora, se cortó una tira de papel de nitrocelulosa inmediatamente después de realizada la transferencia, se lavó 2 veces con PBS-Tween al 0.3% durante 10 min cada baño, y se sumergió en una solución de tinta china diluida 1:1000 en PBS-Tween durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lo cual, se lavó la tira ex-

tensivamente con agua corriente durante 2 min , para examinar la presencia y posición de las bandas.

2.3.6. Determinación de bandas antigénicas.

Se elaboró un patrón de bandas (Fig. 6) que mostrará todos los antígenos reconocidos por los sueros de los animales sometidos a los diferentes tratamientos, así como sus controles.

En base a este patrón se determinaron las bandas antigénicas reconocidas por los sueros de los animales así como la frecuencia de reconocimiento de cada banda (FB_i).

$$FB_i = \frac{\text{No. de veces que se reconoce}}{\text{No. total de individuos del grupo}}$$

PATRON DE COMPARACION DE BANDAS

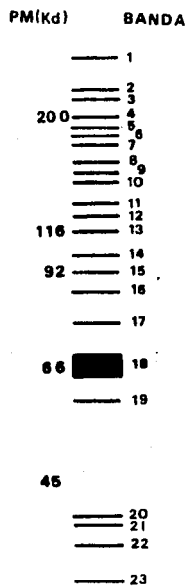


Fig. 8. Patrón de reconocimiento de bandas
A la izquierda de la figura se muestra el peso molecular y la posición que ocupan diferentes sustancias conocidas, a la derecha aparece el patrón antigénico de la inmunoelectrotransferencia.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados que se muestran en las tablas 1,2,3 y 4 corresponden a las evaluaciones de número de parásitos (N), volumen de cisticercos (V), cantidad de anticuerpos (Ac's) y medias aritméticas (μ) en los animales sometidos a las diferentes variables de tratamiento.

La Absorbancia a 492nm se reportará como cantidad de anticuerpos, debido a la proporcionalidad directa existente entre ellas.

Los parámetros de respuesta a la vacunación de los diferentes controles planeados en el diseño experimental, así como su respuesta inmune humoral, se ilustran en las tablas 5,6,7,8,9 y 10.

Las tablas 5,6,7 y 8 corresponden al control de vacuna, mostrando consecuentemente la lectura de Absorbancia (A) a 492 nm (Ac's) y su μ .

En la tabla 9 se muestran las variables (número, volumen y Ac's) de los animales desafiados-no vacunados (control de desafío).

Por último, en la tabla 10, aparecen los valores de Ac's medidos por ELISA y la μ de los animales no vacunados-no desafiados (normales).

Con el fin de evaluar la eficacia de la vacuna y su relación con la respuesta inmune humoral, se determinaron 4 variables de medida: a) Eficiencia de la vacuna, definida como la reducción de la carga parasitaria respecto al control de desafío. b) Riesgo individual, considerado como el porcentaje de animales enfermos dentro de un mismo grupo. c) Ac's (A 492nm) como medida de cuantificación de respuesta inmune humoral. d) Bandas antigénicas reconocidas por inmunoelectrotransferencia (IET).

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF VIA INTRAPERITONEAL, DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO.																			
Tiempo de acción de la vacuna:		30 días									60 días								
Dosis*	0	100			200			500			100			200			500		
sexo	N	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac
HEMBRAS	200	15	0.05	> 2.2	144	1.5	1.451	187	1.0	> 2.2	24	0.5	> 2.2	133	1.4	1.823	175	1.5	> 2.2
	100	5	0.05	> 2.2	77	1.2	1.596	158	1.4	> 2.2	20	0.5	1.491	109	1.7	> 2.2	140	1.2	> 2.2
	180	0	0	> 2.2	41	0.2	1.383	41	0.3	> 2.2	2	0.05	1.442	68	0.7	1.292	105	1.7	1.810
	128	0	0	> 2.2	36	0.3	1.675	7	0.1	> 2.2	0	0	1.499	46	0.5	1.393	102	0.9	> 2.2
	114	12	0.01		52	0.5		46	0.2		19	0.4		94	0.8		133	0.2	
	100	4	0.05		42	0.5		43	0.3		4	0.1		55	0.2		113	1.5	
	119	1	0.05		59	0.2		101	0.7		2	0.2		71	0.7		137	1.5	
	100	24	0.3		58	0.5		112	1.0		0	0		76	0.7		135	1.7	
	1	1	0.05		43	0.5		104	0.5		28	0.8		80	0.5		154	2.0	
	66	66	0.50		95	0.8					0	0		75	0.7		145	1.7	
Prom.	138	12.8	0.12	> 2.2	67.7	0.62	1.526	88.78	0.72	> 2.2	9.9	0.25	1.658	80.7	0.79	1.677	133.9	1.4	2.100
HACIOS	49	0	0	0.729	5	0.5	1.709	30	0.1	> 2.2	20	0.3	1.399	34	0.7	1.788	40	0.3	> 2.2
	43	0	0	0.974	4	0.3	1.040	24	0.3	> 2.2	8	0.05	1.688	30	0.7	> 2.2	35	0.5	> 2.2
	10	0	0	0.729	1	0.5	1.412	0	0	> 2.2	0	0	> 2.2	8	0.05	1.298	23	0.3	1.559
	3	0	0	0.974	3	0.6	1.109	1	0.05	> 2.2	0	0	> 2.2	1	0.05	1.397	15	0.3	> 2.2
	20	0	0		2	0.2		5	0.1		2	0.05		20	0.3		23	0.2	
	18	0	0		2	0.2		17	0.2		3	0.05		16	0.6		27	0.6	
	31	0	0		2	0.3		6	0.2		0	0		15	0.2		30	0.4	
	17	0	0		4	0.3		22	0.2		1	0.05		16	0.1		37	0.4	
	25	0	0		2	0.3		4	0.5		1	0.05		19	0.4		30	0.5	
	0	0	0		1	0.5					5	0.1		33	0.7		27	0.3	
Prom.	24	0	0	0.85	2.6	0.33	1.31	12.11	0.13	> 2.2	4	0.06	1.871	19.2	0.38	1.668	28.7	0.37	2.039

TABLA 1: * (mcg/ratón). El volumen está expresado en ml y Ac equivale a la lectura de Absorbancia (A=492 nm).
 De los resultados que se muestran puede observarse que sin vacunación los ratones presentan el mayor
 número de parásitos. Las mejores condiciones (máxima reducción de la carga parasitaria) se presenta
 ron a dosis de 100 mcg/ratón a los 30 días.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE *T. crassiceps* ORF VIA SUBCUTANEA DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE *T. crassiceps* ORF Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO.

Tiempo de acción de la vacuna:		30 días									60 días								
Dosis *	0	100			200			500			100			200			500		
sexo	N	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac
H E M B R A S	200	65	0.7	> 2.2	64	1.0	1.067	108	2.0	1.410	85	0.6	> 2.2	140	1.2	> 2.2	190	1.2	> 2.2
	100	38	0.7	> 2.2	63	1.2	> 2.2	93	0.7	1.139	61	0.7	1.421	81	0.7	1.39	182	1.7	1.653
	180	15	0.2	1.776	23	0.5	1.666	28	0.5	1.504	35	0.4	1.010	65	0.5	> 2.2	110	0.2	> 2.2
	128	5	0.1	1.657	20	0.2	1.724	20	0.4	> 2.2	26	0.5	1.328	64	0.9	1.36	105	0.7	> 2.2
	114	32	1.0		55	0.5		66	1.0		57	0.7		85	0.7		121	1.4	
	100	25	0.5		44	0.3		70	0.7		56	0.8		82	0.8		132	1.3	
	119	58	0.8		35	0.6		34	0.5		50	0.2		104	0.6		124	1.3	
	100	20	0.8		39	0.65		30	0.4		44	0.7		128	1.0		140	1.2	
	119	16	0.1		39	0.2		36	0.7		51	0.6		133	1.5		118	1.0	
		28	0.2		46	0.2		99	1.7		43	0.6		73	1.3		135	1.4	
Prom.	138	30.2	0.51	1.96	42.8	0.54	1.664	58.2	0.86	1.583	50.8	0.58	1.489	95.5	0.92	1.79	135	1.14	2.063
H A C H O S	49	8	0.1	0.453	25	0.5	0.714	52	0.7	1.158	17	0.7	1.181	40	0.3	1.204	47	0.7	1.414
	43	6	0.05	2.2	21	0.4	0.915	49	0.5	0.293	12	0.3	1.138	26	0.4	1.029	40	0.2	> 2.2
	10	0	0	0.619	19	0.3	1.186	11	0.05	1.023	12	0.15	> 2.2	17	0.2	> 2.2	15	0.2	1.269
	J	0	0	0.941	3	0.05	1.320	9	0.4	1.423	1	0.05	1.149	9	0.15	1.250	11	0.2	1.269
	20	4	0.1		4	0.1		12	0.05		7	0.1		13	0.2		26	0.3	
	18	0	0		3	0.1		11	0.1		7	0.4		10	0.3		29	0.7	
	31	5	0.05		12	0.5		22	0.2		13	0.05		22	0.5		17	0.3	
	17	5	0.05		9	0.2		13	0.05		11	0.2		16	0.2		24	0.4	
	25	2	0.05		5	0.05		17	0.2		12	0.3		10	0.2		27	0.4	
		1	0.05		16	0.4		36	0.4		7	0.1		26	0.5		18	0.1	
Prom.	24	3.1	0.05	1.053	11.7	0.26	1.03	23.2	0.27	0.97	9.9	0.23	1.417	18.9	0.3	1.420	25.4	0.35	1.538

TABLA 2: * (mcg/ratón): El volumen está expresado en ml y Ac equivale a la lectura de Absorbancia (A=492 nm)
De los resultados que se muestran puede observarse que sin vacunación los ratones presentan el mayor número de parásitos. Las mejores condiciones de vacunación (máxima reducción de la carga parasitaria) se presentaron a dosis de 100 mcg/ratón a los 30 días.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. solium</i> VIA INTRAPERITONEAL, DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO																			
Tiempo de acción de la vacuna:																			
30 días										60 días									
Dosis*		100			200			500			100			200			500		
sexo	N	H	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	H	V	Ac	H	V	Ac
H E M B R A S	200	176	1.2	> 2.2	108	1.1	1.288	125	1.5	1.463	190	2.5	> 2.2	148	1.2	1.32	131	1.5	1.069
	180	117	0.8	> 2.2	90	0.9	1.902	108	1.5	1.378	187	1.5	> 2.2	56	0.6	1.517	19	0.3	1.212
	180	0	0	1.958	13	0.3	0.538	26	0.2	1.265	21	0.5	> 2.2	36	0.3	0.995	0	0	1.533
	128	0	0	1.736	3	0.05	0.301	20	0.3	1.873	1	0.05	1.572	0	0	1.797	0	0	1.309
	114	35	0.4		14	0.3		60	1.0		179	2.0		0	0		27	0.3	
	100	44	0.5		47	0.5		100	1.0		120	1.2		144	1.5		5	0.1	
	119	56	0.5		90	0.8		78	0.9		160	2.0		15	0.3		0	0	
	100	0	0		17	0.4		115	1.5		74	1.0		106	0.9		3	0.05	
	119	30	0.3		50	0.5		103	1.0		185	1.5		170	2.0		1	0.05	
	6	0.05		46	0.5					86	0.9		0	0		32	0.05		
Prom.	138	46.4	0.34	2.023	47.8	0.45	1.007	73.5	0.89	1.49	120.2	1.31	2.043	67.5	0.68	1.4	21.9	0.24	1.28
M A C H O S	49	7	0.1	1.835	3	0.05	1.277	44	1.0	1.523	8	0.05	1.425	15	0.3	> 2.2	6	0.2	1.410
	43	3	0.05	1.652	2	0.05	1.189	38	0.5	1.278	3	0.05	1.510	2	0.05	0.994	0	0	0.915
	10	0	0	1.768	0	0	1.309	4	0.1	1.340	0	0	1.463	0	0	0.791	0	0	0.778
	3	0	0	1.433	0	0	1.394	1	0.05	1.222	0	0	> 2.2	0	0	1.092	0	0	1.136
	20	0	0		1	0.05		51	0.3		1	0.5		21	0.3		7	0.2	
	18	0	0		0	0		19	0.4		0	0		10	0.2		3	0.05	
	31	0	0		0	0		14	0.1		0	0		6	0.1		0	0	
	17	0	0		0	0		13	0.5		0	0		0	0		0	0	
	25	0	0		2	0.05		15	0.3		0	0		14	0.15		0	0	
	0	0		0	0		5	0.05		0	0		5	0.1		0	0		
Prom.	24	0.1	0.01	1.67	0.8	0.02	1.29	20.4	0.33	1.34	1.2	0.01	1.649	7.0	0.12	1.269	1.6	0.23	1.06

TABLA 3: * (mcg/ratón). El volumen está expresado en ml y Ac equivale a la lectura de Absorbancia (A=492 mμ)
 De los resultados que se muestran puede observarse que sin vacunación los ratones presentan el mayor número de parásitos. Las mejores condiciones de vacunación (máxima reducción de la carga parasitaria) se presentaron para hembras a dosis de 500 mcg/ratón a los 60 días, mientras que para machos fue a dosis de 100 mcg/ratón a los 30 días.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. solium</i> VIA SUBCUTANEA, DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO																			
Tiempo de acción de la vacuna:		30 días									60 días								
Dosis	* 0	100			200			500			100			200			500		
sexo	N	H	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac	N	V	Ac
H E M B R A S	200	30	0.4	1.940	37	0.9	1.362	34	0.5	2.2	327	5.2	1.56	88	1.0	1.248	28	1.0	1.950
	180	3	0.2	1.305	35	0.5	1.277	16	0.5	1.384	137	1.5	1.127	68	0.6	1.734	21	0.6	1.375
	180	0	0	1.573	3	0.05	1.279	10	0.4	1.119	73	1.0	2.2	33	0.6	2.2	7	0.2	1.284
	128	0	0	1.183	2	0.05	1.243	7	0.1	1.794	15	0.3	1.93	0	0	2.2	0	0	1.537
	114	5	0.15		7	0.3		10	0.5		100	1.0		49	1.0		8	0.3	
	100	50	0.3		10	0.2		20	0.7		117	1.0		42	1.0		3	0.1	
	119	0	0		7	0.3		12	0.6		18	0.4		40	0.9		7	0.3	
	100	0	0		26	0.4		28	0.5		111	1.5		15	0.3		15	0.5	
	119	21	0.2		18	0.7		11	0.2		106	1.0		36	0.5		17	0.6	
		7	0.2		0	0		11	0.2		118	1.5		60	0.7		14	0.3	
Prom.	133	1.6	0.14	1.5	14.5	0.34	1.29	15	0.42	1.624	112	1.44	1.704	43.1	0.66	1.845	12	0.39	1.536
M A C H U S	49	0	0	1.82	5	0.05	0.948	8	0.05	0.996	36	0.7	1.229	30	0.3	2.2	13	0.1	1.230
	43	0	0	1.046	4	0.05	1.406	8	0.1	1.948	29	0.3	1.206	20	0.4	1.513	8	0.2	1.230
	10	0	0		0	0	1.265	1	0.05	1.412	13	0.5	1.485	11	0.2	0.750	0	0	0.872
	3	0	0		0	0	0.945	0	0	0.957	12	0.2	1.756	10	0.4	1.197	0	0	0.913
	20	0	0		1	0.05		1	0.05		30	1.2		23	0.4		1	0.05	
	18	0	0		2	0.05		2	0.05		27	0.7		28	0.5		2	0.05	
	31	0	0		2	0.05		7	0.05		24	0.3		15	0.3		7	0.2	
	17	0	0		3	0.05		1	0.05		27	0.5		29	1.0		1	0.1	
	25	0	0		2	0.05		16	0.1		18	0.4		26	0.3		0	0	
		0	0		0	0		2	0.05		20	0.2		15	0.3		7	0.1	
Prom.	24	0	0	1.433	1.9	0.003	1.141	4.6	0.005	1.32	23.6	0.5	1.419	20.7	0.41	1.415	3.9	0.08	1.406

TABLA 4: * (mcg/ratón). El volumen está expresado en ml y Ac equivale a la lectura de Absorbancia (A=492 nm)
 De los resultados que se muestran se observa que sin vacunación los ratones presentan el mayor número de parásitos.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF VIA INTRAPERITONEAL, NO DESAFIADOS							
Tiempo de acción de la vacuna:		30 días			60 días		
Dosis	(mcg) ratón	100	200	500	100	200	500
Sexo		Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
H E M B R A S	1	0.967	1.248	1.400	1.600	1.137	2.2
	2	0.793	1.227	1.121	0.701	2.2	1.440
	3	1.059	1.135	0.741	0.909	1.142	1.236
	4	0.687	1.131	1.155	0.682	0.997	2.2
	Prom.	0.876	1.185	1.104	0.973	1.369	1.769
M A C H O S	1	0.334	0.788	0.936	1.023	1.219	1.567
	2	0.574	0.667	0.858	0.797	0.939	1.183
	3	0.488	0.745	0.791	0.809	1.546	1.029
	4	0.521	0.735	0.976	0.633	0.905	1.712
	Prom.	0.479	0.733	0.890	0.815	1.152	1.372

TABLA 5. La lectura de absorbancia (A a 492 nm) por ELISA, muestra que los niveles de anticuerpos para machos son más bajos que para las hembras. Puede considerarse que los valores son significativos, dado que las lecturas de Absorbancia para los sueros normales no son mayores de 0.060.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF VIA SUBCUTANEA, NO DESAFJADOS							
Tiempo de acción de la vacuna:		30 días			60 días		
Dosis Ag	($\frac{mcg}{ratón}$)	100	200	500	100	200	500
SEXO		Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
H E M B R A S	1	1.128	0.866	0.905	1.101	1.591	1.251
	2	0.965	0.692	0.973	0.778	1.114	1.463
	3	1.428	1.399	0.630	0.902	0.692	1.512
	4	0.815	1.202	0.481	1.016	0.905	0.673
	P r o m	1.084	1.039	0.747	0.949	1.075	0.974
M A C H O S	1	0.542	0.517	1.354	0.421	0.835	1.072
	2	0.433	1.078	0.561	0.682	0.804	0.849
	3	0.581	0.610	0.480	0.703	0.638	1.107
	4	0.578	0.454	0.580	0.598	0.760	0.890
	P r o m	0.533	0.664	0.743	0.601	0.759	0.979

TABLA 6: La lectura de absorbancia (A a 492 nm) por ELISA, muestra que los niveles de anticuerpos para machos son más bajos que para las hembras. Puede considerarse que los valores son significativos, dado que las lecturas de Absorbancia para los sueros normales no son mayores de 0.06.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <u>T. solium</u> VIA INTERAPERITONEAL NO DESAFIADOS							
Tiempo de acción de la vacuna:		30 días			60 días		
Dosis Ag	(mcg) ratón	100	200	500	100	200	500
Sexo		Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
H E M B R A S	1	0.768	0.571	0.905	0.726	0.670	0.944
	2	0.644	1.023	1.242	0.530	0.645	0.905
	3	0.388	0.946	0.901	0.653	0.703	1.417
	4	0.884	0.859	1.211	0.577	0.936	1.114
	Prom.	0.671	0.8497	1.0647	0.621	0.738	1.095
M A C H O S	1	0.523	1.057	1.023	0.538	0.559	0.700
	2	0.621	0.909	1.125	0.632	0.899	1.031
	3	0.622	0.788	0.875	0.564	0.770	0.942
	4	0.630	0.938	1.011	0.505	0.797	0.705
	Prom.	0.599	0.923	1.0085	0.5598	0.756	0.844

TABLA 7. La lectura de absorbancia (A a 492 nm) por ELISA, muestra que los niveles de anticuerpos para machos son más bajos que para las hembras. Puede considerarse que los valores son significativos, dado que las lecturas de Absorbancia para los sueros normales no son mayores de 0.060.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <u>T. solium</u> VIA SUBCUTANEA, NO DESAFIADOS							
Tiempo de acción de la vacuna:		30 días			60 días		
Dosis Ag	(mcg) ratón	100	200	500	100	200	500
Sexo		Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
H E M B R A S	1	0.962	0.766	1.010	0.492	1.010	0.857
	2	1.005	0.034	0.927	0.352	0.598	0.727
	3	1.036	0.933	1.049	0.509	0.738	0.974
	4	1.035	1.123	0.932	0.631	0.895	0.810
	Prom.	1.009	0.714	0.979	0.496	0.810	0.842
M A C H O S	1	1.786	0.928	0.952	0.712	0.711	1.087
	2	0.653	0.702	0.944	0.923	0.760	0.942
	3	1.624	0.676	1.090	0.869	0.799	0.717
	4	0.817	0.927	0.945	0.895	0.893	0.819
	Prom.	1.220	0.809	0.982	0.849	0.790	0.891

TAULA U. La lectura de absorbancia (A a 492 nm) por ELISA, muestra que los niveles de anticuerpos (Ac) tienden a ser muy similares en ambos sexos por la vía subcutánea. Puede considerarse que los valores son significativos. Ver tabla 10.

RATONES BALB/c NO VACUNADOS, DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE *T. crassiceps* ORF
Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO

Sexo		N	v	Ac
H E M B R A S	1	200	1.0	1.533
	2	180	1.0	1.750
	3	180	1.0	1.820
	4	128	0.9	1.437
	5	114	0.4	
	6	100	0.5	
	7	119	0.6	
	8	100	0.4	
	9	119	0.5	
Prom.		138.3	0.7	1.64
H A C H O S	1	49	0.15	1.747
	2	43	0.4	1.537
	3	10	0.1	1.725
	4	3	0.05	1.426
	5	20	0.2	
	6	18	0.2	
	7	31	0.3	
	8	17	0.3	
	9	25	0.2	
Prom.		24	0.19	1.608

TABEA 9. Se muestran los resultados de número (n), volumen de parásitos (v) y lecturas de Absorbancia a 492 nm (Ac) para dosis de 0 mcg/ratón. Puede observarse que para número de parásitos los valores son mayores en dosis de 0 que con dosis diferente de cero, mientras que los valores de absorbancia son mayores en muchos casos para las dosis diferentes de cero respecto a la dosis de cero.

RATONES BALB/c NO VACUNADOS Y NO DESAFIADOS

SEXO	Ac	
H E M B R A S	1	0.073
	2	0.077
	3	0.075
	4	0.023
	5	0.065
	6	0.069
	7	0.071
	8	0.026
	9	0.059
	10	0.065
	P r o m	0.060
M A C H O S	1	0.069
	2	0.072
	3	0.025
	4	0.028
	5	0.031
	6	0.077
	7	0.078
	8	0.066
	9	0.049
	10	0.076
	P r o m	0.057

TABLA 10. Las lecturas de A (492 nm) para sueros de animales normales muestran que los niveles de anticuerpos (Ac) anti-cisticercos son insignificantes.

La información de los datos de Eficiencia y Riesgo individual para cada grupo de animales sometidos a las distintas variables de tratamiento, se presentan en las tablas 11 y 12.

Con el objeto de comparar los diferentes tratamientos, los resultados se sometieron a un análisis estadístico multifactorial, mediante el programa SAS (Statistical Analysis System). La significancia de los efectos sencillos (sexo, antígeno, vía, tiempo de acción de la vacuna y dosis), así como sus interrelaciones se ilustran en las tablas 13, 14 y 15. Para el análisis más detallado de estos resultados, solamente se consideraron aquellos cuya probabilidad de error (p) fuera menor de 0.05.

Para éste análisis se consideraron como variables independientes aquellas que constituían los parámetros de tratamiento, y como variables dependientes los parámetros de respuesta (número y volumen de parásitos, así como cantidad de Ac's).

Dado que el volumen no necesariamente debe aumentar conforme aumenta el número de parásitos, se analizó la relación entre estas dos variables de medida. En la Fig. 7 se muestra que en general parece existir un comportamiento lineal, aunque en las interacciones dobles analizadas en la sección 2 de este capítulo, se podrá observar que hay ocasiones en que las diferencias para el número de parásitos en los diferentes tratamientos son significativas mientras que para el volumen no.

RELACION VOLUMEN-NUMERO DE PARASITOS HEMBRAS Y MACHOS

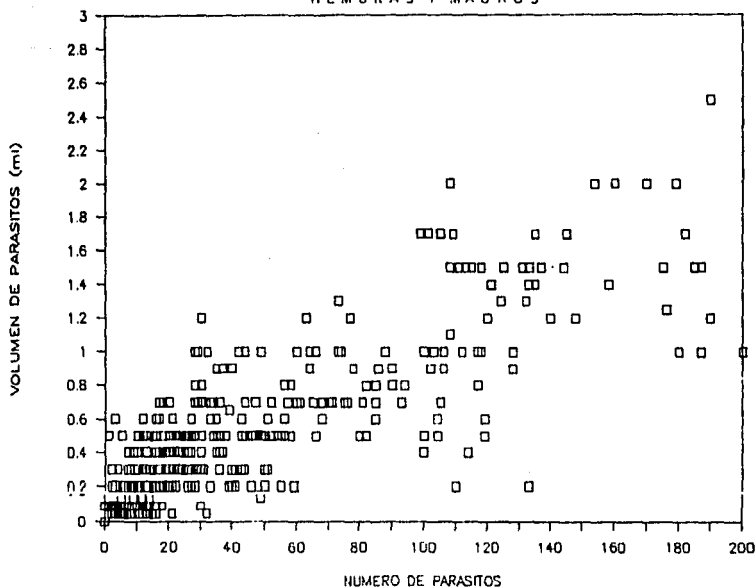


Fig. 7. Relación entre el volumen y el número de parásitos tanto para hembras como para machos. Se muestra que en general conforme aumenta el número de parásitos, se incrementa el volumen.

RATONES FALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF, DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO								
Tiempo de acción de la vacuna:			30 días			60 días		
Dosis $\left(\frac{mcp}{ratón}\right)$			100	200	500	100	200	500
vfa	sexo	Z						
I D U R C I O N E S	H e m b r a s	E	90.7	51.0	35.8	92.8	41.6	3.2
		Ri	80	100	100	70	100	100
	M a c h o s	E	100	89.1	49.5	8.3	20.0	0
		Ri	0	100	90	70	100	100
S h o c h e r e s	H e m b r a s	E	78.1	69.7	43.6	63.3	30.9	1.9
		Ri	100	100	100	100	100	100
	M a c h o s	E	87.1	51.2	3.3	58.7	21.2	0
		Ri	70	100	100	100	100	100

TABLA 11. Los resultados de la tabla muestran que las mejores eficiencias (E) se presentan en machos con 30 días entre la vacuna y el desafío. Nótese que el riesgo individual es menor conforme aumenta la eficiencia.

RATONES BALB/c VACUNADOS CON EXTRACTO TOTAL DE CISTICERCOS DE <i>T. solium</i> , DESAFIADOS CON 10 CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i> ORF Y SACRIFICADOS 30 DIAS POSTERIORES AL DESAFIO								
Tiempo de acción de la vacuna:			30 días			60 días		
Dosis (mg/ratón)			100	200	500	100	200	500
vía	sexo	%						
Intraperitoneal	Hembras	E	66.4	65.4	46.8	13.1	51.2	84.2
		Ri	70	100	100	100	70	70
	Machos	E	99.9	96.6	15.0	95.0	69.6	93.7
		Ri	20	40	100	30	70	30
Subcutánea	Hembras	E	91.6	89.5	88.5	18.9	68.8	91.3
		Ri	60	90	100	100	90	90
	Machos	E	100	92.0	81.0	1.6	16.6	83.7
		Ri	0	70	90	100	100	70

TABLE 12. En los resultados se vuelve a presentar que las mejores eficiencias (E) de vacunación con cisticercos de *T. solium* se presentan en machos con 30 días entre la vacuna y el desafío. De la misma manera el riesgo individual (Ri) es menor conforme aumenta la eficiencia.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

(SAS)

Clase	Niveles	Valores
Sexo	2	Hembras, Machos
Tiempo	2	30 y 60 días entre vacuna y desaffo
Antígeno	2	Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i> .
Dosis	3	100, 200 y 500 mcg/ratón
Vía	2	Intraperitoneal y Subcutánea

Variable dependiente: Número de parásitos

Tabla de ANDEVA:

Fuente de Variación	g.l.(+)	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	Pr>F
Sexo	1	273235.25269	273235.25269	256.57	0.0001 *
Tiempo	1	41075.59631	41075.59631	38.57	0.0001 *
Antígeno	1	17298.44517	17298.44517	16.24	0.0001 *
Dosis	2	28276.05264	14138.02632	13.28	0.0001 *
Vía	1	2618.11036	2618.11036	2.46	0.1176
Sexo-Tiempo	1	16767.00064	16767.00064	15.74	0.0001 *
Sexo-Antígeno	1	4315.95742	4315.95742	4.05	0.0447 *
Sexo-Dosis	2	1554.29810	777.14905	0.73	0.4826
Sexo-Vía	1	8628.32450	8628.32450	8.10	0.0046 *
Tiempo-Antígeno	1	893.61228	893.61228	0.84	0.3601
Tiempo-Dosis	2	8789.52255	4394.76128	4.13	0.0167 *
Tiempo-Vía	1	9950.38987	9950.38987	9.34	0.0024 *
Antígeno-Dosis	2	94030.42503	47015.21251	44.15	0.0001 *
Antígeno-Vía	1	7355.02301	7355.02301	6.91	0.0089 *
Dosis-Vía	2	7635.74494	3819.87247	3.58	0.0285 *

(+) Grados de Libertad; * Valores significativos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

(SAS)		
Clase	Hiveles	Valores
Sexo	2	Hembras, Machos
Tiempo	2	30 y 60 días entre vacuna y desaffo
Antígeno	2	Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>
Dosis	3	100, 200 y 500 mcg/ratón
Vía	2	Intraperitoneal y Subcutánea

Variable dependiente: Volumen de parásitos

Tabla de ANDEVA:

Fuente de Variación	g.l. (+)	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	Pr > F
Sexo	1	27.77084623	27.77084623	168.09	0.0001*
Tiempo	1	4.92527422	4.92527422	29.81	0.0001*
Antígeno	1	0.88173774	0.88173774	5.34	0.0213*
Dosis	2	1.61277816	0.80638908	4.88	0.0080*
Vía	1	0.06225518	0.06225518	0.38	0.5396
Sexo-Tiempo	1	1.12153394	1.12153394	6.79	0.0095*
Sexo-Antígeno	1	0.00845316	0.00845316	0.05	0.8217
Sexo-Dosis	2	0.41683053	0.20841526	1.25	0.2863
Sexo-Vía	1	0.07924035	0.07924085	0.48	0.4902
Tiempo-Antígeno	1	0.01039779	0.01039779	0.06	0.8026
Tiempo-Dosis	2	2.76496746	1.38248373	8.32	0.0003*
Tiempo-Vía	1	0.88240347	0.88240347	5.31	0.0217*
Antígeno-Dosis	2	7.16733952	3.58366962	21.57	0.0001*
Antígeno-Vía	1	0.20117219	0.20117219	1.21	0.2718
Dosis-Vía	2	1.23316408	0.61658204	3.71	0.0252*

(+) g.l. Grados de Libertad; * Valores significativos

ANALISIS ESTADISTICO

(SAS)

Clase	Niveles	Valores
Sexo	2	Hembras y Machos
Tiempo	2	30 y 60 días entre vacuna y desaffo
Antígeno	2	Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>
Dosis	3	100, 200 y 500 mcg/ratón
Vía	2	Intraperitoneal y Subcutánea

Variable dependiente: Título de Anticuerpos

Tabla de ANDEVA:

Fuente de Variación	g.l.(+)	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	Pr > F
Sexo	1	3.44208525	3.44208525	20.76	0.0001 *
Tiempo	1	0.48265949	0.48265949	2.91	0.0899
Antígeno	1	1.94906915	1.94906915	11.76	0.0008 *
Dosis	2	1.36298068	0.68149034	4.11	0.0582
Vía	1	1.05066248	1.05066248	6.34	0.0623
Sexo-Tiempo	1	0.09932525	0.09932525	0.60	0.4400
Sexo-Antígeno	1	0.18825116	0.18825116	1.14	0.2882
Sexo-Dosis	2	0.13745675	0.06872830	0.41	0.6613
Sexo-Vía	1	0.73561658	0.73561658	4.44	0.0567
Tiempo-Antígeno	1	0.06777767	0.06777767	0.41	0.5235
Tiempo-Dosis	2	0.70199389	0.35099694	2.12	0.1237
Tiempo-Vía	1	0.22225236	0.22225236	1.34	0.2486
Antígeno-Dosis	2	1.92758711	0.96379355	5.81	0.0037 *
Antígeno-Vía	1	0.96609484	0.96609484	5.83	0.0169 *
Dosis-Vía	2	1.01560475	0.50780237	3.06	0.0495

(+) Grados de Libertad; * Valores significativos.

1. EFECTOS SENCILLOS.

1.1. Efecto del sexo.

En las hembras se presentó mayor carga y masa parasitaria que en los machos. Esta diferencia entre los sexos sugiere que las hembras son altamente susceptibles a la infección aún en presencia de la vacuna. En un principio se esperaba que mientras mayor fuera el número de parásitos; menor sería la cantidad de Ac's, sin embargo, como puede observarse en la tabla 16c, los resultados de la MMC muestran que las hembras fueron las que tuvieron mayor respuesta inmune humoral y mayor número de parásitos.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR
DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO AL SEXO

Sexo	Número	Volumen (ml)	Ac's (A=492nm)
H	58.305+2.116 a	0.666+0.026 a	1.684+0.043 a
M	10.531+2.111 b	0.183+0.026 b	1.410+0.044 b

TABLA 16. (a,b: literales diferentes en columnas denotan diferencias singnificativas. $P < 0.0001$)

1.2. Efecto del tiempo de acción de la vacuna.

De acuerdo con la tabla 15, puede observarse que la interacción de Ac's-tiempo no es significativa es decir, que los animales responden con niveles de Ac's similares a los 30 y a los 60 días.

En cambio, respecto a la carga y masa parasitaria, ambos parámetros son mayores a los 60 días que a los 30 días. Estas observaciones coinciden con las medidas de eficiencia (Figs. 9a, 9b, 9c y 9d) en las que se muestra que conforme aumenta el tiempo entre la aplicación de la vacuna y el desafío disminuye la eficiencia de la vacunación.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO AL TIEMPO

Tiempo (días)	Número	Volumen (ml)
30	25.087+2.121 a	0.323+0.026 a
60	43.650+2.106 b	0.526+0.026 b

TABLA 17. (a,b: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$)

1.3. Efecto del antígeno.

De acuerdo con el análisis estadístico presentado en la tabla 18 puede observarse que existen diferencias significativas tanto para número y volumen de los parásitos, como para Ac's entre los dos extractos antigénicos empleados en la vacunación.

Al parecer, el mejor antígeno de vacunación lo representa el extracto total de larvas de *T. solium*, en las Figs. 10a, 10b, 10c y 10d de Riesgo Individual, se hace manifiesta esta observación.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR
DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO AL ANTIGENO

Antígeno	Número	Volumen (ml)	Ac's (A=492nm)
<i>T. crassiceps</i>	40.391±2.116 a	0.468±0.026 a	1.657±0.042 a
<i>T. solium</i>	28.345±2.111 b	0.382±0.026 b	1.437±0.045 b

TABLA 18. (a,b: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.0013$)

1.4. Efecto de la dosis.

En la tabla 19 los valores de MMC para las tres diferentes dosis administradas muestran que las dosis más bajas son las que disminuyen más la carga y la masa parasitaria ($p < 0.0001$). Puede observarse que entre las dosis de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ no existen diferencias significativas, mientras que al administrar dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, se observan diferencias estadísticas y biológicas, ya que se aumenta la carga parasitaria. Más adelante mostraremos que existe un diferente comportamiento respecto al origen del antígeno cuando se analiza la interacción antígeno-dosis.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR
DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA DOSIS

Dosis ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	Número	Volumen (ml)
100	27.331+2.580 a	0.349+0.032 a
200	33.975+2.580 a	0.436+0.032 ab
500	91.799+2.606 b	0.490+0.032 b

TABLA 19. (a,b,c: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.033$)

1.5. Efecto de vía.

El efecto de la vía de administración de la vacuna de acuerdo con el análisis estadístico, no es significativo. Esto es, la vacunación es igualmente efectiva por la vía subcutánea que por la vía intraperitoneal.

2. INTERACCIONES DOBLES.

2.1. Efecto de la interacción sexo-tiempo.

En la tabla 20 se puede apreciar la diferencia de carga y masa parasitaria entre sexos y tiempo. Los machos son igualmente resistentes a la infección tanto a los 30 como a los 60 días de acción de la vacuna. Las hembras, en cambio, tienen el mayor número y volumen de parásitos a los 60 días. Vuelve a ser notoria la diferencia de comportamiento entre distintos sexos.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR
DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA
INTERACCION SEXO-TIEMPO

Sexo	Tiempo (días)	Número	Volumen (ml)
H	30	43.094+3.005 a	0.516+0.037 a
H	60	73.517+2.980 b	0.816+0.037 b
M	30	7.079+2.992 c	0.130+0.037 c
M	60	13.783+2.979 c	0.273+0.037 d

TABLA 20. (a,b,c,d: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.043$)

2.2. Efecto de la interacción sexo-antígeno.

Las diferencias entre sexos con los dos diferentes antígenos sigue siendo relevante, el extracto antigénico de cisticercos de *T. solium* protege más a las hembras que el extracto antigénico de cisticercos de *T. crassiceps* y también lo hace en los machos.

De acuerdo al análisis estadístico ilustrado en la tabla 21 puede observarse que en las hembras si existe diferencia para las dos fuentes de antígeno mientras que para los machos no.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA INTERACCION SEXO-ANTIGENO

Sexo	Antígeno	Número
H	<i>T. crassiceps</i>	67.336+2.992 a
H	<i>T. solium</i>	49.274+2.992 b
M	<i>T. crassiceps</i>	13.446+2.992 c
M	<i>T. solium</i>	7.417+2.979 c

TABLA 21. (a,b,c: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$)

2.3. Efecto de la interacción sexo-vía.

Desde esta perspectiva se mantiene la diferencia de sexos, siendo la vía subcutánea más efectiva que la intraperitoneal en las hembras, mientras que los machos responden igual a la vacuna administrada por cualquier vía.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR
DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA
INTERACCION SEXO-VIA

Sexo	Vía	Número
H	IP	64.902+3.005 a
H	SC	51.708+2.979 b
M	IP	8.521+2.992 c
M	SC	12.342+2.979 c

TABLA 22. (a,b,c: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.0019$)

2.4. Efecto de la interacción tiempo-dosis.

Para los 30 y 60 días, se observan diferencias en la masa y carga parasitaria a dosis de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Consecuentemente en altas dosis, el tiempo no parece tener un efecto relevante, observándose valores no significativos de carga parasitaria con dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ a los 30 y 60 días. La máxima reducción de la carga parasitaria se obtuvo con dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ y 30 días entre la vacunación y el desafío.

Por otro lado, el efecto de la dosis a un solo tiempo presenta diferencias significativas para los 30 días pero no a los 60 días, manteniéndose consistentemente el efecto del tiempo.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA INTERACCION TIEMPO-DOSIS

Tiempo (días)	Dosis ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	Número	Volumen (ml)
30	100	13.175+3.658 a	0.151+0.045 a
30	200	23.975+3.648 b	0.339+0.045 b
30	500	38.110+3.721 c	0.479+0.046 c
60	100	41.487+3.648 c	0.546+0.045 c
60	200	43.975+3.648 c	0.532+0.045 c
60	500	45.487+3.648 c	0.501+0.045 c

TABLA 23. (a,b,c: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.0369$)

2.5. Efecto de la interacción tiempo-vía.

Se vuelve a hacer notorio que la menor carga parasitaria se observa cuando median 30 días entre vacuna y desafío. Existen además diferencias significativas entre las vías de administración de la vacuna, ya que funciona mejor la subcutánea; mientras que a los 60 días, los animales responden por igual a la administración de un antígeno por cualquiera de las dos vías.

En volumen de parásitos se ven diferencias en el tiempo, observándose menor masa parasitaria a los 30 días; sin embargo ya sea por la vía subcutánea o intraperitoneal, el volumen de parásitos no varía.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR
DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA
INTERACCION TIEMPO-VIA.

Tiempo (días)	Vía	Número	Volumen (ml)
30	IP	31.998+3.019 a	0.355+0.037 a
30	SC	18.175+2.979 b	0.292+0.037 a
60	IP	41.425+2.979 c	0.472+0.037 b
60	SC	45.875+2.979 c	0.581+0.037 c

TABLA 24. (a,b,c: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.0388$)

2.6. Efecto de la interacción antígeno-dosis.

En esta matriz (Tabla 25) puede observarse un efecto contrario para los 2 diferentes antígenos: para *T. solium*, las dosis óptimas son las altas, mientras que para *T. crassiceps* lo son las dosis bajas. Además vuelve a ser claro que entre mayor es el número de parásitos, mayor es el título de Ac's.

Consistentemente se aprecia que la mayor cantidad de Ac's se mantiene para la carga parasitaria elevada en los dos diferentes orígenes de antígeno.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA INTERACCION ANTIGENO-DOSIS.

Antígeno	Dosis ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	Número	Volumen (ml)	Ac's (A=492nm)
<i>T. crassiceps</i>	100	15.125+3.648 a	0.226+0.045 a	1.622+0.075 a
<i>T. crassiceps</i>	200	42.250+3.648 b	0.516+0.045 b	1.511+0.073 a
<i>T. crassiceps</i>	500	63.798+3.697 c	0.661+0.046 c	1.838+0.073 b
<i>T. solium</i>	100	39.537+3.648 b	0.471+0.045 bd	1.639+0.090 a
<i>T. solium</i>	200	25.700+3.648 e	0.356+0.045 ed	1.333+0.073 c
<i>T. solium</i>	500	19.799+3.672 ae	0.319+0.046 ae	1.340+0.073 d

TABLA 25. (a,b,c,d,e: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.04$)

2.7. Efecto de la interacción antígeno-vía.

Existen diferencias significativas en los niveles de Ac's cuando se administra como vacuna el extracto total de cisticercos de *T. crassiceps* ORF, ya sea por vía intraperitoneal o subcutánea, presentándose una mayor cantidad de Ac's por vía intraperitoneal, no así con *Taenia solium* donde el título de Ac's es muy similar.

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS + ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA CON RESPECTO A LA INTERACCION ANTIGENO-VIA

Antígeno	Vía	Ac's (A=492nm)
<i>T. crassiceps</i>	IP	1.813+0.061 a
<i>T. crassiceps</i>	SC	1.501+0.059 b
<i>T. solium</i>	IP	1.437+0.067 b
<i>T. solium</i>	SC	1.438+0.061 b

TABLA 26. (a,b: literales diferentes en columnas denotan diferencias significativas. $P < 0.0001$ a $P < 0.0003$)

Comparando los niveles de Ac's entre los animales vacunados-desafiados y solamente vacunados, podemos observar que existe una diferencia significativa entre ambos, consistente en que los animales vacunados y desafiados tienen una mayor cantidad de Ac's que los animales vacunados. (Tablas 1-6 y Fig. 8).

RELACION DEL NIVEL DE ANTICUERPOS VACUNADOS-DESAFIADOS Y VACUNADOS

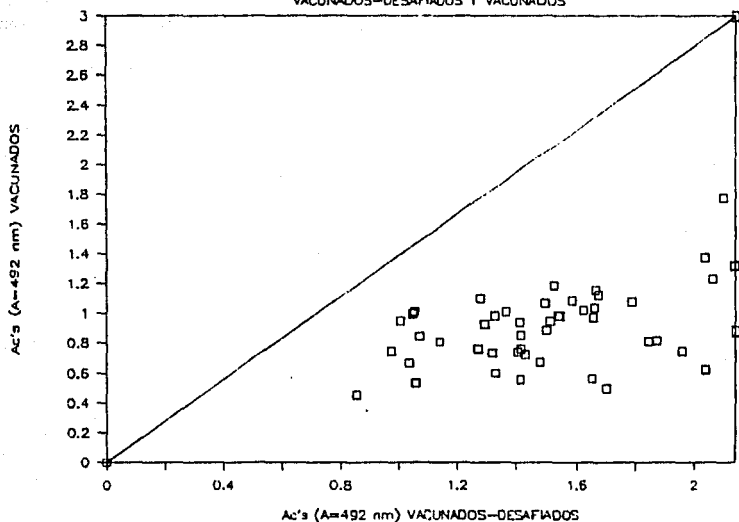


Fig. 8. Relación de los niveles de Ac's entre animales vacunados y animales vacunados-desafiados. Obsérvese que los animales vacunados-desafiados presentan mayores valores de Absorbancia a 492 nm que los animales vacunados-no desafiados. Nótese que todos los puntos caen por abajo de la recta de 45 grados.

En las tablas 5,6,7,8 y 9 puede observarse que en general, se presenta una mayor cantidad de Ac's cuando los animales se someten a un desafío antigénico, que cuando se vacunan.

Como puede apreciarse en la Tabla 10, los animales sin desafío y sin vacuna presentan niveles de Ac's menores a 0.06; comparando estos valores con los de los animales vacunados, desafiados y vacunados-desafiados podemos declarar que las cantidades de Ac's se generan a resultas del estímulo antigénico.

3. EFICIENCIA Y RIESGO INDIVIDUAL.

La Eficiencia es una medida de reducción de la carga parasitaria de hembras con respecto a hembras y de machos con respecto a machos (Larralde, C. 1976). Como puede observarse en las tablas 1-4 y 9 el número de parásitos es mayor en los animales desafiados-no vacunados que en los animales vacunados-desafiados.

Los efectos que se observan en las tablas 11 y 12, muestran que la vacuna es tan eficiente en hembras como en machos para disminuir el número de parásitos esperado.

El efecto del sexo y sus interacciones con las otras variables, había mostrado que los machos tenían menor carga y masa parasitaria que las hembras, en base a los resultados de Eficiencia (Tablas 11 y 12) y su análisis estadístico (Tabla 27) podemos afirmar que la vacuna es igualmente eficiente en ambos sexos, y que las diferencias observadas están dadas esencialmente por las diferencias de susceptibilidad propias de los animales.

EFICIENCIA

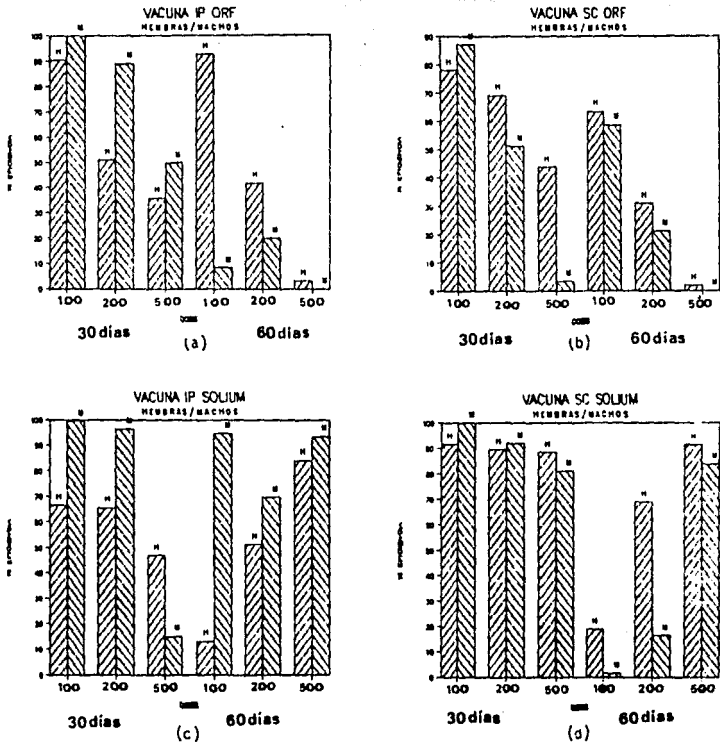


Fig. 9. En el eje de las X se muestran las tres diferentes dosis a los 30 y a los 60 días, y en el eje de las Y los porcentajes de Eficiencia obtenidos a las condiciones dadas tanto en hembras como en machos. Las fins. 9a y 9b muestran que vacunando con cisticercos de *T. crassiceps* ORF las mayores Eficiencias se obtienen con dosis de 100 mcg/ratón. En las figuras 9c y 9d se observa que en general los cisticercos de *T. solium* confieren más protección que los cisticercos de *T. crassiceps*.

PRUEBA DE STUDENT PARA EFICIENCIAS

Sexo	Media+DS	P> T
H	0.863+0.346	0.9493
M	0.872+0.535	0.9493

TABLA 27. Para una Hipótesis nula (H_0) = varianzas iguales la probabilidad ($P>F=0.0415$)

El Riesgo individual, con base en su definición es una medida más drástica para evaluar la eficacia de la vacuna, ya que con un parásito que presente un animal, éste se considera enfermo. En las Figs. 10a, 10b, 10c y 10d puede observarse el grupo que presenta menor Riesgo individual es el de los machos vacunados con dosis de 100 μg /ratón.

La μ de los efectos totales (91.25% para hembras y 72.91% para machos), sugiere que los machos son los que presentan menor riesgo de enfermarse. Este efecto de diferencias de riesgo entre los sexos, está estrechamente relacionado con la susceptibilidad a la infección entre ambos grupos.

En las Figs. 11a y 11b, se muestra que en la relación Riesgo individual-Eficiencia, a valores de Riesgo individual menores al 60%, las eficiencias encontradas oscilan entre 90-100%. Hay que hacer notar que este efecto sólo se presenta en machos ya que sólo ellos presentan valores de Riesgo individual menores del 60%. El rango tan amplio de valores de porcentajes de Eficiencia que se observan a Riesgos mayores al 60% se debe a la propia definición de Riesgo individual, en la que se con-

RIESGO INDIVIDUAL

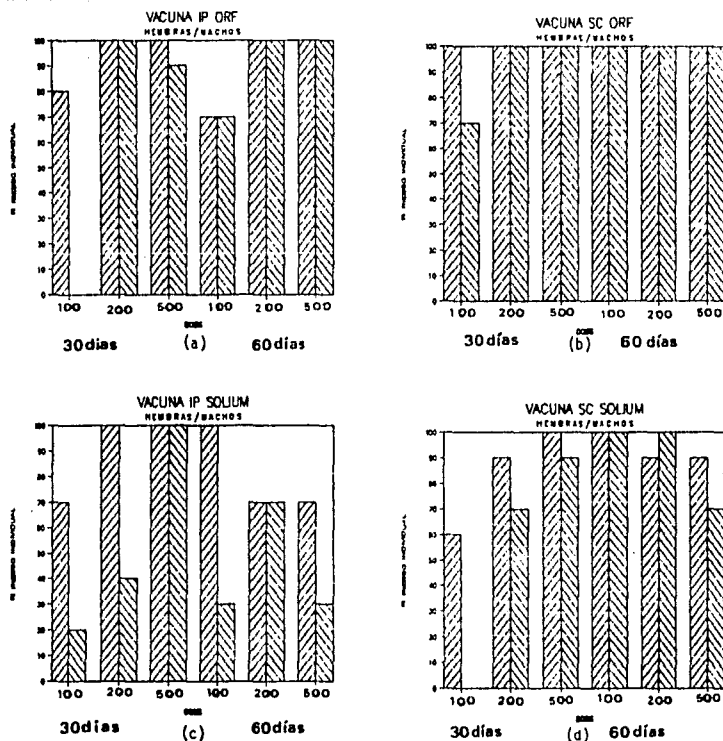
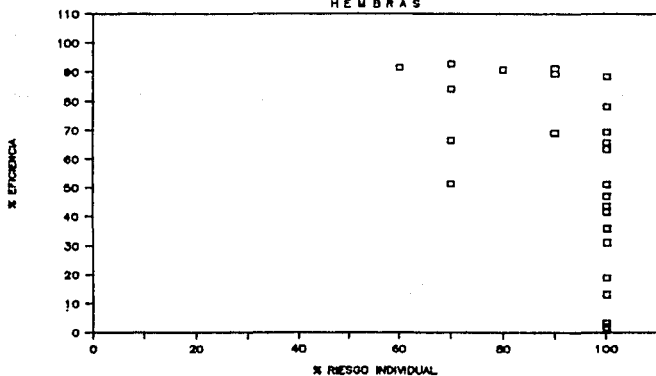


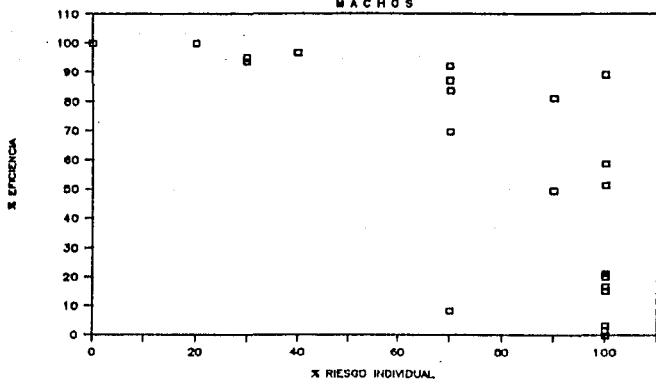
Fig. 10. Comparando las figuras 10c y 10d que muestran los porcentajes de Ri para animales vacunados con cisticercos de *T. solium* contra las figs 10a y 10b que muestran porcentaje de Ri para animales vacunados con cisticercos de *T. crassiceps* ORF, se observa que en general la vacunación con cisticercos de *T. solium* origina una mayor reducción de la posibilidad de adquirir la enfermedad.

% RIESGO INDIVIDUAL VS. % EFICIENCIA
HEMBRAS



(a)

% RIESGO INDIVIDUAL VS. % EFICIENCIA
MACHOS



(b)

Fig. 11 Relación del % de Ri contra el % de Eficiencia comparando las respuestas de hembras contra machos. Se observa que en machos el Ri puede tomar valores menores al 60% correspondiéndoles valores de % de Eficiencia que van del 90 al 100%. Tanto en hembras como en machos a valores de Ri mayores a 60%, las Eficiencias oscilan entre 0 y 90%.

sidera a un animal enfermo como aquel que presenta 1 parásito y aunque se tengan eficiencias altas, si no se puede destruir totalmente la carga parasitaria en ninguno de los animales del grupo, se considerará como con un Riesgo individual del 100%.

Puesto que los animales sometidos a la vacunación presentan en general una reducción de la carga parasitaria, respecto a los animales no vacunados, consideramos que la vacuna sí protege, y aunque la medida de protección es variable, en las condiciones óptimas se obtienen valores de eficiencia que van del 85-100% tanto para hembras como para machos.

4. Inmunoelctrotransferencia.

Por medio de la IET se pretendía identificar algún antígeno que estuviera asociado con altas eficiencias de vacunación, o bien, algunos antígenos que pudiesen explicar la diferencia de susceptibilidad entre los sexos.

En las Fig. 32 a la 40 (Apéndice VI) se presentan las frecuencias de reconocimiento de bandas antigénicas en cada uno de los intervalos de eficiencia para los dos sexos. Las relaciones estimadas están dadas en frecuencias de reconocimiento en animales vacunados vs. vacunados-desafiados, y vacunados-desafiados vs. desafiados. Dado que no se detectó ningún antígeno que estuviera asociado solamente a eficiencias altas, no pudimos identificar un inductor de anticuerpos que se relacione con la protección.

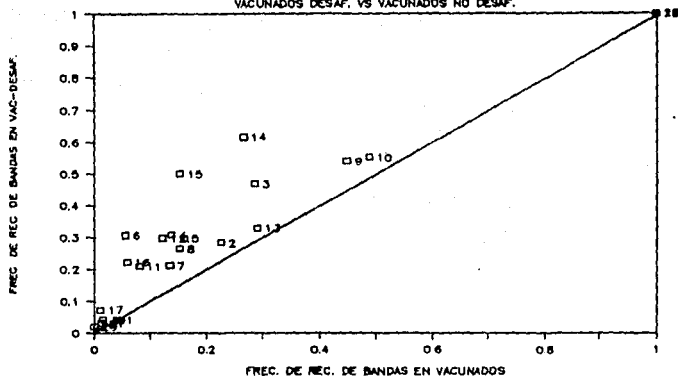
Sin embargo, pudimos observar en las Figs. 12a y 12b que los animales vacunados-desafiados tienden a reconocer con mayor frecuencia a los antígenos que los animales solamente vacunados. Esto puede explicarse considerando que el desafío constituye un segundo estímulo antigénico que incrementa la frecuencia del reconocimiento.

Por otra parte, en las Figs 13a y 13b se aprecia que hay ciertas bandas antigenicas que solamente reconocen los animales vacunados-desafiados; dado el diseño de las Figs. estas bandas son propias de la vacuna, por lo que podemos concluir que con la vacuna se induce un diferente patrón de reconocimiento que con el puro desafío.

Al observar la relación de frecuencia de reconocimiento de las bandas a diferentes rangos de eficiencia, tanto para hembras como para machos (Figs. 14a y 14b) se pudo constatar que no hay una cierta banda que tenga alta frecuencia de reconocimiento a eficiencias altas.

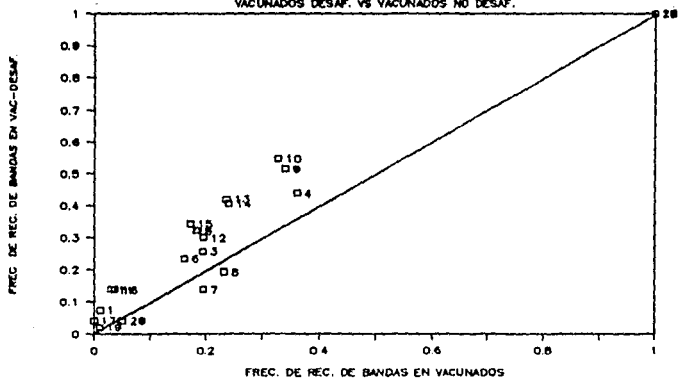
La Fig. 15 muestra una relación de reconocimiento de bandas para los dos diferentes sexos; los resultados muestran que ambos grupos reconocen las mismas bandas, aunque no todas con la misma frecuencia, esto descarta la idea de que la diferencia de susceptibilidad se deba a diferentes patrones de reconocimiento antigénico.

RECONOCIMIENTO DE BANDAS EN HEMBRAS
 VACUNADOS DESAF. VS VACUNADOS NO DESAF.



(a)

RECONOCIMIENTO DE BANDAS EN MACHOS
 VACUNADOS DESAF. VS VACUNADOS NO DESAF.



(b)

Fig. 12 Inmunoplot de la frecuencia de reconocimiento de bandas antiqénicas de animales vacunados-desafiados contra animales vacunados-no desafiados. Obsérvese que existe una mayor frecuencia de reconocimiento en animales vacunados-desafiados que en animales vacunados-no desafiados: lo que indica a dos estímulos antiqénicos es mayor la frecuencia de reconocimiento.

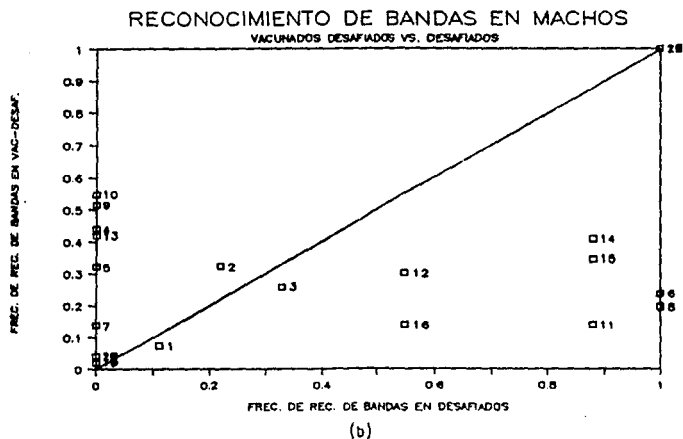
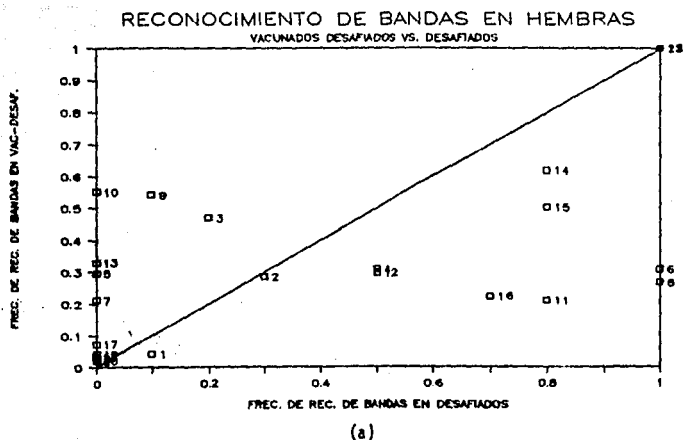
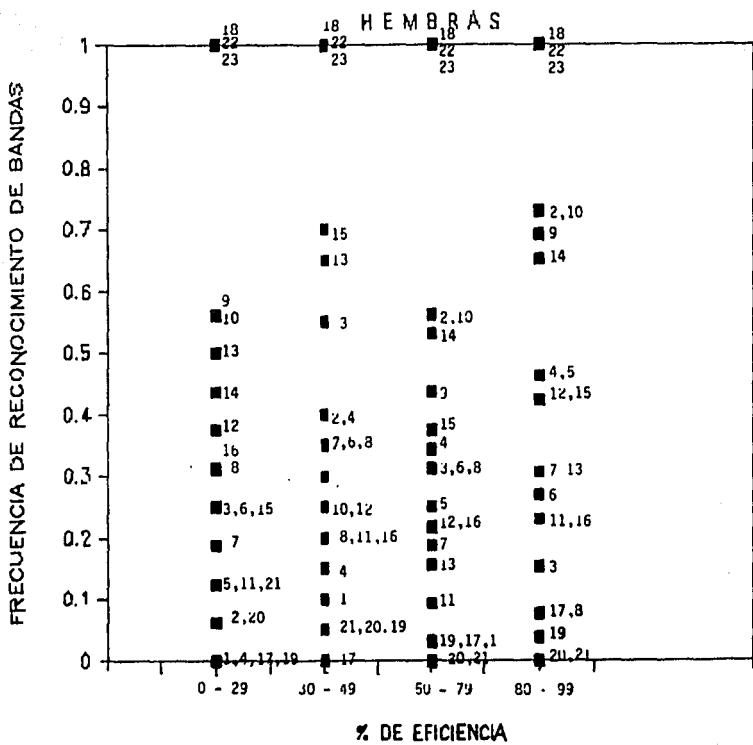


Fig. 13 Inmunoplot de la frecuencia de reconocimiento de bandas antigénicas de animales vacunados-desafiados contra animales desafiados. Existen bandas antigénicas que sólo son reconocidas por los animales vacunados-desafiados, por lo cual la vacuna induce un diferente patrón de reconocimiento.



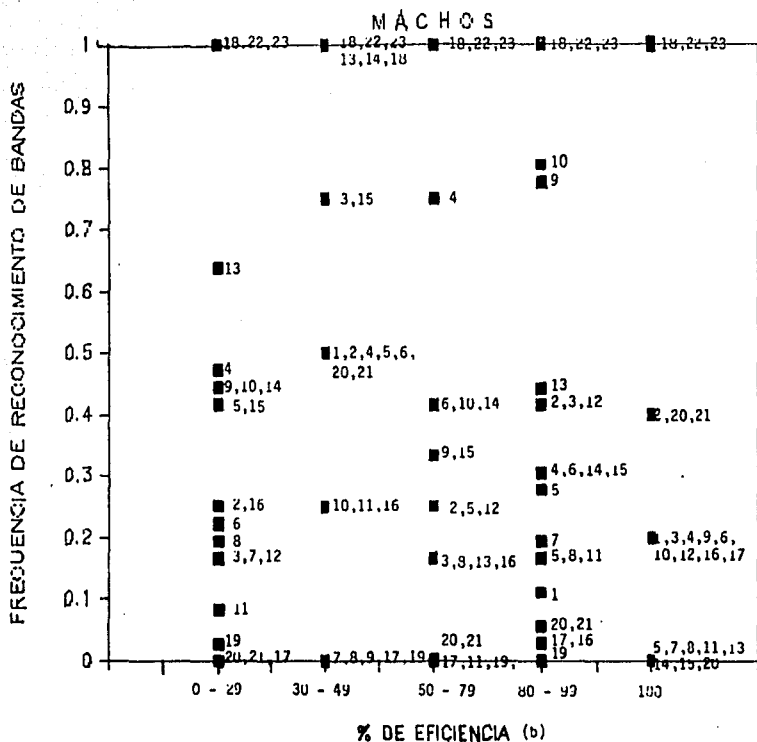


Fig. 14. Frecuencia de reconocimiento de bandas a los distintos porcentajes de Eficiencia; no existe ninguna banda que presente alta frecuencia de reconocimiento a eficiencias elevadas. Nótese que las bandas marcadas como 18, 22 y 23 son reconocidas también por sueros normales, de ahí la alta frecuencia de reconocimiento.

RECONOCIMIENTO DE BANDAS ANTIGENICAS

HEMBRAS Y MACHOS

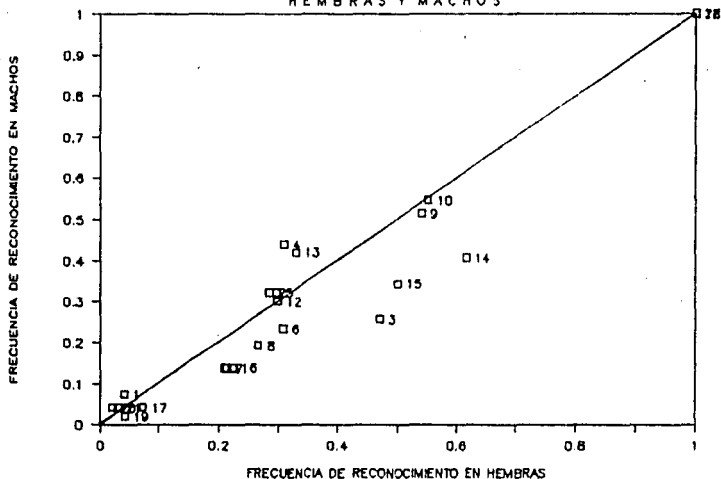


Fig. 15 Inmunoplot de la frecuencia de reconocimiento de bandas antigénicas de hembras contra machos; las hembras y los machos reconocen las mismas bandas antigénicas, aunque no siempre con la misma frecuencia.

DISCUSSION

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo indican que la vacuna sí protege a los ratones contra la infección experimental por *T. crassiceps*, ya que se observa una disminución de la carga parasitaria en los animales vacunados tanto con extracto total de cisticercos de *T. crassiceps* como de *T. solium*, relativo a la esperada en los animales que no fueron vacunados. Ambas vacunas lograron disminuir el número de parásitos, en algunos casos hasta cero, sobre todo en los machos, si bien en las hembras rara vez resultó en esterilidad completa. En consecuencia, consideramos escalar este proyecto e iniciar estudios de vacunación en lechones contra el cisticerco de *Taenia solium* con la esperanza de, al menos, disminuir el número de larvas infectantes. Así, un menor número de canales serían decomisados en los rastros, con un consecuente beneficio para la porcicultura rústica o de traspatio (Aluja, A. *et al*, 1987). Además, desde el punto de vista médico, también es importante disminuir el número de larvas en los cerdos, para así reducir el número de solitarias, con la consecuente disminución de huevecillos potencialmente capaces de infectar a los humanos.

Podemos afirmar que existe una inmunoprotección cruzada entre los metacéstodos de *T. solium* y *T. crassiceps* puesto que los mejores resultados de vacunación se obtuvieron con el extracto antigénico de cisticercos de *T. solium*. La protección cruzada permitirá utilizar al cisticerco de *T. crassiceps* como una fuente alternativa de antígeno para vacunar cerdos en gran escala.

Desde las primeras observaciones se notó una gran diferencia en susceptibilidad a la infección entre ambos sexos, tanto en los animales vacunados como en los no vacunados, siendo las hembras mucho más susceptibles que los machos. Las siguientes consideraciones de nuestros resultados indican que tal diferencia de susceptibilidad no está mediada inmunológicamente, al menos por anticuerpos: a) Si bien los resultados de carga parasitaria expresada en número de parásitos, indican que el efecto protector de la vacunación no es tan aparente en las hembras como en los machos, la carga parasitaria expresada en Eficiencia de vacunación por el análisis estadístico (Tablas 11, 12 y 27) muestra que la protección alcanzada en las hembras es de magnitud similar a la alcanzada en los machos. b) Se pudo constatar que no existen diferencias cuantitativas de respuesta inmune humoral entre ambos sexos en los animales vacunados y desafiados. Si bien la cantidad de Ac's tiende a ser mayor en las hembras, debemos tener presente que esta diferencia se explica porque al soportar ellas mayor carga parasitaria reciben un estímulo antigénico mayor. c) También cualitativamente no puede documentarse que las hembras reconozcan un repertorio antigénico diferente al de los machos: en la Fig. 15 puede observarse que ambos sexos reconocen los mismos antígenos aunque con diferente frecuencia. Así pues, consideramos difícilmente sostenible que la mayor susceptibilidad de las hembras sea mediada inmunológicamente. Un solo dato estaría en contra: en los animales solamente vacunados pero no desafiados, sí pudo demostrarse que las hembras montan una mayor respues-

ta inmune que los machos (Tablas 5,6,7 y 8), por lo que no puede descartarse totalmente la posibilidad de que la respuesta inmune de las hembras sea diferente a la de los machos.

Es posible que un factor hormonal desempeñe un papel importante en las diferencias de susceptibilidad a la infección, por lo que a raíz de estas observaciones se han comenzado a realizar experimentos relacionados con la intersección de la inmunología con la endocrinología de la relación huésped-parásito. No es insólito este comportamiento, ya que en infecciones causadas por *Trichinella spiralis* en ratones y *Taenia taeniaeformis* en ratas se muestra que la diferencia de susceptibilidad entre hembras y machos, se encuentra asociada a hormonas sexuales (Williams, J.F. *et al.*, 1981; Reddington, J.J. *et al.*, 1981).

En los resultados de inmunoelectrotransferencia se puede apreciar que con la vacuna se aumenta el número de antígenos reconocidos y se disminuye el reconocimiento de otros que son propios del parásito vivo. Esto puede deberse a cambios estructurales que ocurran durante la homogeneización del parásito, lo que originaría una diferente presentación de los antígenos.

La máxima reducción de carga parasitaria se obtuvo con vacuna de cisticercos de *T. solium* a dosis de 500 µg/ratón, administrada por vía subcutánea, y con vacuna de cisticercos de *T. crassiceps* a dosis de 100 µg/ratón, por vía subcutánea. Estos resultados podríamos explicarlos proponiendo distintas concentraciones de los mismos antígenos en los distintos parásitos; es decir, que las dosis más bajas de cisti-

cercos de *T. crassiceps* incluyen a todos los antígenos en cantidad suficiente para rendir máxima protección, en tanto que con *T. solium*, puesto que tiene un diferente patrón antigénico (Apéndice II) requiere dosis más altas para semejar las condiciones de *T. crassiceps*. Es factible pensar, que cuando se trabaja el extracto total de cisticercos de *Taenia crassiceps* a dosis mayores a 100µg/ratón, se induce un efecto de tolerancia inmunológica, que se refleja en una disminución en la Eficiencia de la vacuna. Por otra parte, cuando se diseñó el experimento, se pensó que la inmunidad por vía intraperitoneal (inmunidad compartimentalizada) sería más efectiva que por la vía subcutánea (inmunidad general), puesto que la infección experimental se instala en el peritoneo. Sin embargo, el análisis estadístico de los datos no muestra diferencias para las vías salvo en las dosis óptimas para cada antígeno, en que la vía subcutánea es mejor que la intraperitoneal. Respecto a este punto no contamos con una explicación, pero podríamos recurrir a las existentes para explicar la inducción de distinta respuesta inmune según la vía de estimulación: éstas recurren al argumento sobre diferencias en el procesamiento de antígenos según las diferentes vías.

Observamos un decaimiento de la protección conforme transcurre el tiempo entre la vacuna y el desafío: habiendo mayor protección a los 30 que a los 60 días. Este efecto es bien conocido con otros estímulos antigénicos y está en función, principalmente, de la velocidad de desaparición del antígeno. Sería posible inducir estados de resistencia más prolongados si se emplearan otros adyuvantes. A priori

suponemos que el adyuvante de Freund sería óptimo, dada su gran capacidad de prolongar la acción del antígeno. O bien se podría pensar en un refuerzo de la vacunación para aumentar el efecto protector. No obstante, habría que evitar la presentación de parálisis inmunológica que ha aparecido en estudios preliminares de este laboratorio (Sciutto, E. *et al*) como resultado de un segundo estímulo antigénico, el que no mejora y hasta empeora la protección.

Sobre el papel de la respuesta inmune humoral en esta parasitosis, podría concluirse que no desempeña un papel importante en la protección, ya que: no se reduce la carga parasitaria al aumentar la cantidad de Ac's y no se detectó ningún antígeno fuertemente asociado a la protección. Sin embargo, como no puede negarse el efecto protector de la vacunación, convendría estudiar la participación de la respuesta inmune celular, ya que este es otro mecanismo que se dispara ante un estímulo antigénico y ha demostrado ser de gran importancia en otras parasitosis (Williams, J.F. *et al*, 1982a).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes a las que se llegaron en el presente trabajo son:

- 1.- La vacuna sí protege.
- 2.- Los valores de Eficiencia de la vacunación oscilan entre 85-100%, alcanzándose a disminuir el Riesgo individual de contraer la enfermedad hasta 0% en un número pequeño de animales.
- 3.- Existe inmunoprotección cruzada entre el cisticerco de *T. crassiceps* y el cisticerco de *T. solium*.
- 4.- Tanto las hembras como los machos se ven igualmente protegidos por la vacuna.
- 5.- La diferencia de susceptibilidad entre ambos sexos no parece estar mediada inmunológicamente, al menos por anticuerpos.
- 6.- La protección conferida no parece atribuirse a la respuesta inmune humoral de los ratones.

APENDICES

ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LA RELACION HUESPED - PARASITO

Nada más fácil que admitir
de palabra la lucha universal
por la vida, ni más difícil
que tener siempre presente
esta conclusión.

Charles Darwin.

APENDICE I

ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LA RELACION HUESPED-PARASITO

Cuando se contempla el parasitismo desde un enfoque evolutivo, las analogías encontradas entre distintos grupos de parásitos, así como las homologías dentro de una misma línea, permiten detectar ciertos patrones y respuestas adaptativas tanto de huéspedes como de parásitos. Estos elementos son indispensables para conocer la dinámica de esta interacción, y en un momento dado, para intentar controlarla.

De acuerdo con la teoría evolucionista, las primeras formas de vida animales y vegetales se desarrollaron como organismos de vida libre, sin embargo, los cambios que ocurrieron alrededor de su nicho ecológico las obligaron a adaptarse a nuevas situaciones que les permitieran perpetuar su descendencia. De este modo, se estableció una lucha por la existencia, definida por Darwin como "La dependencia de un ser respecto a otro..., incluyendo no sólo la vida del individuo, sino también el éxito al dejar descendencia" (Darwin, C., 1982).

Como resultado de esta lucha, ocurrió el proceso de selección natural; es decir, la sobrevivencia y reproducción diferencial de ciertos organismos que al paso del tiempo lograron ajustarse a nuevas situaciones. Así, un grupo de organismos, se adaptaron a una existencia en condiciones de asociación con otros organismos vivientes, obteniendo de ellos parte o casi todos los medios para sobre-

vivir. De esta asociación surgió el parasitismo.

De acuerdo con Price (1976) una definición adecuada de parásito es la que contiene el Diccionario Internacional Webster:

"Los parásitos son organismos que viven en o sobre otro organismo viviente, del cual obtienen una parte o todos sus nutrientes orgánicos; que poseen cierto grado de modificación estructural adaptativa y que causan un daño real a su huésped".

Un estudio de los mecanismos evolutivos que llevaron a la relación huésped-parásito, puede proveer de información importante para entender la complejidad de esta relación.

Probablemente, la característica más importante de la ecología de los parásitos es la cercana asociación que un individuo mantiene con otro organismo viviente, generalmente muy diferentes filogenéticamente, dando como resultado una relación que se mantiene en un estado de "equilibrio inestable". Esta asociación está basada en una coevolución recíproca entre ambos sistemas (Price, 1976), es decir, que los cambios que han ocurrido en los huéspedes se han dado como una respuesta a las presiones selectivas de los parásitos, los cuales a su vez se han modificado para responder a los cambios surgidos en los huéspedes. De acuerdo con Brooks (1979), este proceso sería el de un co-acomodamiento entre el huésped y el parásito, con una co-especiación, proceso en el cual la cladogénesis del huésped (origen de nuevas líneas genéticas a través de la diversificación de una línea ya existente), se ve seguida por la cladogénesis en los parásitos.

Este sistema huésped-parásito se facilita en

parte por la capacidad de reproducción asexual que exhiben algunos parásitos, y en especial los helmintos. Esto les ha permitido evolucionar más lentamente que sus huéspedes, asegurando así, el poder "convivir" por más tiempo con ellos (Price, 1976; Holmes, 1983).

La especificidad que un parásito tiene por su huésped, puede definirse en términos del grado de adaptación que presentan. Muchos parásitos se han logrado adaptar a varios huéspedes, algunos de los cuales pueden ser los definitivos (aquellos en donde el parásito alcanza su madurez sexual y se reproduce), o bien ser los intermediarios (en los cuales el parásito sólo se desarrolla pero no alcanza su madurez sexual). Entre los helmintos, las adaptaciones involucran mecanismos que incrementan su eficiencia para infectar a sus huéspedes.

Holmes (1983) ha sugerido que esta especificidad a un huésped dado, se determina al menos por 3 estrategias:

- 1) La semejanza morfológica que exhibe el parásito respecto a estructuras propias del huésped; un ejemplo característico podría ser la morfología del escólex de los gusanos intestinales que tiene similitud con la superficie de la mucosa en una región muy particular del huésped.
- 2) La capacidad de responder a niveles hormonales del huésped, para regular su tiempo de ciclo de vida. Es posible que las observaciones de susceptibilidad a la infección por tenidos en ratones de diferentes sexos corresponda a este fenómeno.
- 3) La capacidad de mantenerse en un ambiente poco

propicio para su establecimiento y desarrollo (evasión inmune).

A su vez, el huésped ha desarrollado una serie de contra-adaptaciones (adaptación genética y respuesta inmune) que le permiten escapar de la invasión parasitaria. Según Wakelin (1978), la susceptibilidad o resistencia de los huéspedes a la infección, puede tener bases fisiológicas, como diferencias de edad, sexo o hábitos alimenticios; así como bases genéticas.

Respecto al último punto, se podría considerar, por un lado, el factor de resistencia polimórfica del huésped, en donde el ejemplo más común sería el caso de la anemia falciforme (los individuos que presentan esta enfermedad, son refractarios a la infección por *Plasmodium o.n.*), por otro lado, la existencia de fenotipos compatibles entre el huésped y el parásito que determinan la infección (Holmes, 1983). Lawrence y Pester (1967) han sugerido que la invasión de un parásito en un nuevo huésped, disminuye su infectividad, debido a que se requiere una previa adaptación.

Los organismos que han desarrollado mejores estrategias de protección contra los endoparásitos, son aquellos que han producido una respuesta inmune que les provea de mayor resistencia a infecciones subsecuentes. Bloom (1979) y Mitchel (1979) han enfatizado que la mayor parte de los parásitos pueden evadir o escapar a esta acción defensiva del organismo (al menos parcialmente), por diversos mecanismos, cada uno de los cuales pueden considerarse que representa una coevolución recíproca entre el huésped y el parásito. Por un lado el huésped ha

evolucionado desarrollando mecanismos que lo protejan contra la invasión parasitaria, por otro lado el parásito ha reaccionado ante estas estrategias, evadiendo la respuesta inmune. Ambos autores indican que hay 3 mecanismos por los cuales el parásito puede evadir la respuesta inmune: a) Reducción de la antigenicidad; b) Modificación de las funciones del macrófago; y c) Modulación de la respuesta inmune (Tabla 28).

El resultado neto de cualquiera de estos mecanismos específicos, puede traducirse como protección para el huésped, protección para el parásito o producción de un proceso inmunopatológico.

El parásito, pues, es capaz de responder ante los cambios que se producen en sus condiciones de vida. En esta respuesta, la variación se incrementa a través de aquellos parásitos que sobreviven, perpetuando así este *modus vivendi*.

TABLA 28. MECANISMOS DE EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE DEL HUESPED.

28a. ANTIGENICIDAD REDUCIDA

<u>Mecanismo</u>	<u>Parásito</u>	<u>Huésped</u>	
-Inaccesibilidad anatómica.	<i>T. spiralis</i> *	mamíferos	(48)
-Variación antigénica.	<i>F. hepatica</i>	carnero	(55)
-Modulación de antígeno.	<i>M. brasiliensis</i>	rata	(53)

-Anticuerpos bloqueantes.	<i>J. laevisformis</i> *	ratón	(62)
-Mimetismo molecular.	<i>J. mansoni</i>	ratón	(14)
-Inmunoglobulinas no enmascarantes de antígeno.	<i>J. mansoni</i>	ratón	(72)
-Pérdida de antígenos del MHC en células parasitadas.	<i>J. laevisformis</i>	rata	(51)

28b. MODIFICACION DEL AMBIENTE INTRAMACROFAGICO.

-Inhibición de enzimas digestivas.	<i>Leishmania sp.</i>	ratón	(57)
-Escape de fagolisosomas	<i>Leishmania sp.</i>	ratón	(57)
-Inhibición de funciones vacuolares.	<i>J. cruzi</i>	ratón	(57)

28c. MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE DEL HUESPED.

-Inmunosupresión			
.Destrucción del tejido linfoide.	<i>M. corti</i> *	ratón	(50)
.Delección clonal.	<i>S. granuloso</i> *	ratón	(1)
.Competencia antígenica, mitogénica y reorganización de Acs.	<i>N. brasiliensis</i>	rata	(37)

.Células supresoras no específicas.	<i>T. spiralis</i>	ratón	(10)
.Supresión específica activa.	<i>S. mansoni</i>	humano	(50)
.Moléculas parasitarias citotóxicas.	<i>S. granuloso</i> *	vaca	(3)
.Células efectoras bloqueantes.	<i>S. mansoni</i>	rata	(40)
-Degradación de anticuerpos.	<i>S. mansoni</i>	rata	(4)
-Efectos anti-complementarios.	<i>T. taeniaeformis</i> *	rata	(34)
-Efectos anti-inflamatorios.	<i>T. spiralis</i>	rata	(12)

*estadio larvario.

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped por los parásitos con ejemplos conocidos o postulados para los helmintos. Tomada de: Holmes, C. J. 1983. Evolutionary relationships between parasitic helminths and their hosts (Modificada).

Taenia
crassiceps

APENDICE II

Taenia crassiceps
(Zeder 1800, Rudolphi 1810)

2.1 CLASIFICACION.

PHYLUM: Plathelminthes
CLASE : Cestoda
ORDEN : Cyclophyllidea
GENERO: *Taenia*
ESPECIE: *crassiceps*

2.2 CARACTERISTICAS GENERALES.

Taenia crassiceps es un cestodo que parasita en forma natural a zorros y otros cánidos en la etapa adulta y a roedores en la etapa larvaria. Los gusanos adultos han sido aislados del intestino delgado de zorros rojos de Europa (*Vulpes vulpes* L.) y de Ontario, Canadá (*Vulpes fulva*). La forma larvaria del gusano, denominada en 1819 por Rudolphi como *Cysticercus longicollis* y por Halldobler en 1939 como *Cysticercus multiformis* se ha aislado principalmente de infecciones naturales subcutáneas en roedores y topos (Freeman, R., 1962) y con menor frecuencia en insectos carnívoros y primates. (Freeman, R., 1962).

De infecciones naturales en el hombre sólo se tiene un registro:

"Un cisticerco de *Taenia crassiceps* con escólex evaginado en uno de los polos y numerosas gemaciones en el otro, se eliminó de la retina de una mujer blanca de 17 años en Canadá el 6 de Marzo de 1972" (Freeman, R., 1973).

En forma experimental, se han logrado infectar perros con el gusano adulto y roedores con el cisticerco (Freeman, R., 1961). Studer y Blair (1949) reportaron que el cisticerco podía mantenerse intraperitonealmente en ratones blancos y hamsters, pero no en ratas, conejos y cueros. Respecto a las ratas, se ha dicho mucho que son refractarias a la infección; sin embargo, se tienen informes de susceptibilidad a la infección cuando se les desafia con una carga parasitaria elevada.

"Las infecciones prósperas son dependientes de la dosis y posiblemente los metacéstodos activamente gemantes son más prósperos en el establecimiento en ratas que los metacéstodos no gemantes unidos" (Sally, C. J. y Freeman, R., 1976).

La infección de ratones en la cavidad peritoneal, ha tenido mejor éxito que en la pleural o en regiones subcutáneas, tanto desafiando por la vía oral con huevecillos, como por una infección con los metacéstodos.

"Los metacéstodos vivos se recuperaron de 142 (75%) de 189 inoculaciones intraperitoneales; 38 (55%) de 69 inoculaciones subcutáneas y 3 (15%) de 20 inoculaciones intrapleurales". (Freeman, R., 1962).

Se tienen evidencias de que las infecciones subcutáneas no prosperan debido a que la larva se rodea de una pared delgada del tejido del huésped, disminuyendo considerablemente su potencial de reproducción asexual (Freeman, 1962; Good *et al*, 1982).

Se han reportado cuatro variedades de *Taenia crassiceps* :

1.- La cepa ORF aislada por Freeman en 1952. Al parecer esta variedad es la más anormal, ya que durante su desarrollo en ratones blancos de laboratorio, produjo un escólex anormal (Dorais y Esch, 1969). Observaciones recientes en la estructura del cisticerco, muestran la ausencia del escólex y la consecuente pérdida de reproducción sexual, lo cual sugiere que la adaptación intraperitoneal de la larva en los ratones del laboratorio, ha provocado cambios paulatinos en su estructura.

"Aparentemente la cepa ORF, la cual ha sido subinoculada por mas de 17 años, ha perdido su habilidad para infectar al huésped definitivo". (Freeman, 1962).

2.- La cepa KBS aislada de un ratón campestre (*Microtus pennsylvanicus*) en Michigan, EUA en 1965 (Dorais y Esch, 1969).

3.- La cepa DEB, aislada en 1972 de un ojo humano (Freeman *et al*, 1973).

4.- La cepa HYG, aislada en 1974 al alimentar a ratones blancos con huevecillos del cestodo proveniente de una infección natural en un zorro rojo (Sally y Freeman, 1976). La variedad HYG constituye la forma mas normal de las cepas, pues ha conservado los patrones morfológicos y reproductores más característicos de la familia de las tenias.

La variedad ORF ha sido la más estudiada gracias a su elevada velocidad de crecimiento y mayor potencial reproductor (Dorais y Esch, 1969).

2.3 MORFOLOGIA Y CICLO BIOLÓGICO DE *Taenia crassiceps* ORF.

Las primeras observaciones de la larva de *Taenia crassiceps* ORF (Freeman, 1962), denotaron la presencia de un escólex invaginado de 0.72mm en uno de los polos del cisticerco. La evaginación del escólex en solución salina isotónica, manifestó la presencia de 4 ventosas grandes y un rostelo notable, armado con 32 a 36 ganchos rostelares de aproximadamente 6-8 μ de largo. Las gemaciones, en su mayor parte exógenas, se encontraban adheridas a la zona inmediata del polo que carece de escólex. (Fig. 16).

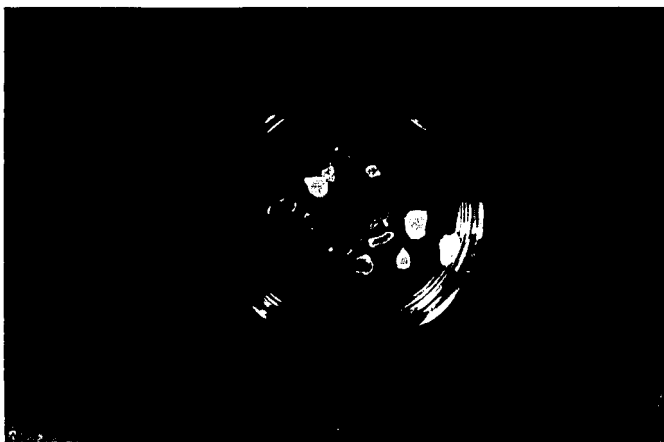


Fig. 16. Acercamiento de los metacístodos de *Taenia crassiceps* variedad ORF.

La reproducción asexual no es común entre los céstodos y ha sido confinada a familias como *Dibotriocephalidae*, *Xymenolepididae* y *Taeniidae*. El ciclo biológico del parásito comienza con la ingestión de huevecillos, liberados en las heces de los cánidos infectados, por roedores y pequeños mamíferos (huéspedes intermediarios). Los huevecillos, al llegar al intestino delgado, se transforman en oncósferas, las cuales ayudadas por sus ganchos y posiblemente por la acción de algunas enzimas, penetran a través de la pared intestinal y se alojan en sitios subcutáneos, o en cavidad pleural y abdominal, transformándose en cisticercos (vesículas ovoidales, de color blanco lechoso). Las infecciones subcutáneas se alojan cerca de la axila, región ventral del tórax o cuello y con menor frecuencia en la región escapular e inguinal (Kroeze, K.W. y Freeman, R.S., 1982). Estos cisticercos son los únicos que desarrollan gemaciones exógenas en el polo que carece de escolex; iniciándose así la reproducción asexual, gracias a la cual, los cisticercos han podido mantenerse por inoculaciones intraperitoneales en ratones de laboratorio (Figs. 17a y 17b).

El ciclo biológico se completa por la ingestión de roedores infectados, por zorros u otros cánidos, y el desarrollo del gusano adulto en el intestino del huésped definitivo, comenzando la liberación de proglótidos y huevecillos al medio externo (Freeman, 1962) (Fig. 18).

2.4 SUSCEPTIBILIDAD Y RESPUESTA INMUNOLOGICA CONTRA LA LARVA DE *J. crassiceps*.

Se ha definido la susceptibilidad, como la capacidad que presenta el huésped de proveer un ambiente en el cual se hace posible el establecimiento, desarrollo y maduración del parásito. (Wakelin, D., 1978). Se han reportado diferencias de susceptibilidad entre especies de animales, sexos y edades. Los ratones parecen ser los huéspedes intermedios más susceptibles a la infección y en especial las hembras (Freeman, 1962; Sciutto *et al*, VII Congreso Nacional de Inmunología), pues permiten una mayor reproducción de los parásitos.

"Las ratas hembras, son considerablemente más resistentes que las hembras de ratones, se necesitan por lo menos 10 veces más metacístodos por inóculo de animal para establecer consistentemente una población gemante en las ratas" (Sally, *et al*, 1976).

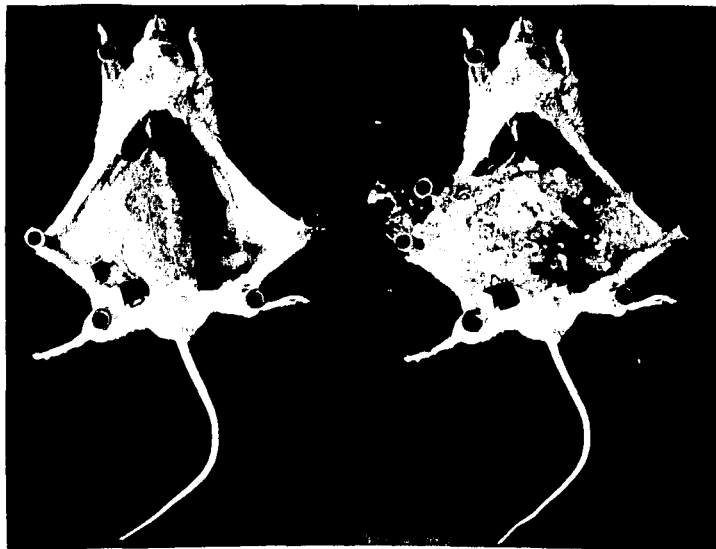
"En las ratas, los machos son más resistentes que las hembras" (Blair *et al*, 1976).

Respecto a la susceptibilidad en ratones de ambos sexos, se han reportado que en la infección por ingestión de huevecillos, los machos resultan ser más refractarios, pero cuando la infección es por un desafío intraperitoneal no se distinguen diferencias de susceptibilidad entre ambos sexos.

"Los ratones machos pueden ser ligeramente más refractarios a la infección después de la ingestión de huevecillos que las hembras. Ratones machos y hembras inoculados intraperitonealmente, reporta-

ron que el 72% de 93 machos y 78% de 96 hembras mantuvieron metacéstodos después de 60 días. Aparentemente los sexos son igualmente susceptibles a la infección por esta ruta". (Freeman, 1962).

Estudios preliminares conducidos en éste laboratorio (Sciutto *et al*, en observaciones aún no publicadas), indican que las hembras son más susceptibles que los machos desde la instalación del parásito y durante la evolución de la enfermedad (Fig.19).



Figs. 17a y 17b. Ratones de la cepa BALB/c infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* variedad ORF.

CICLO DE VIDA TAENIA CRASSICEPS

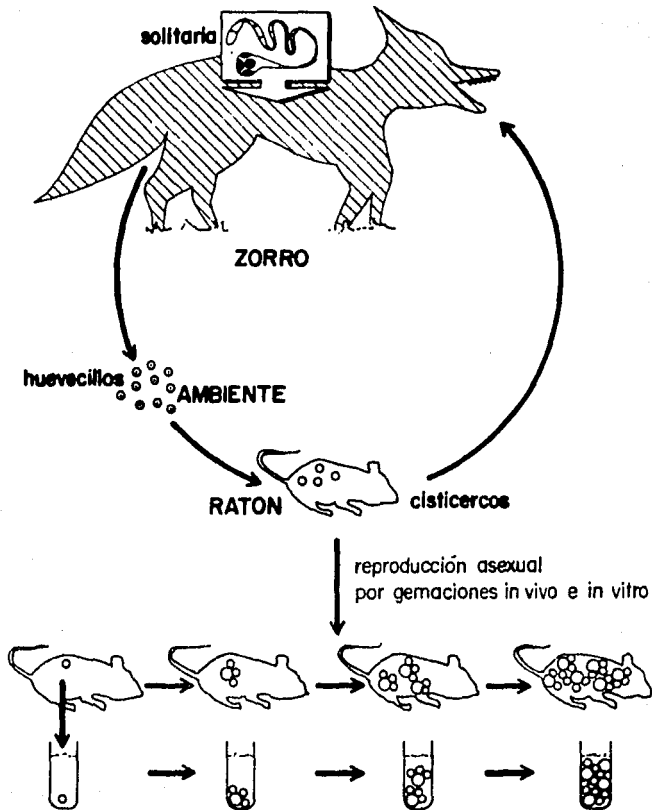


Fig. 18. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

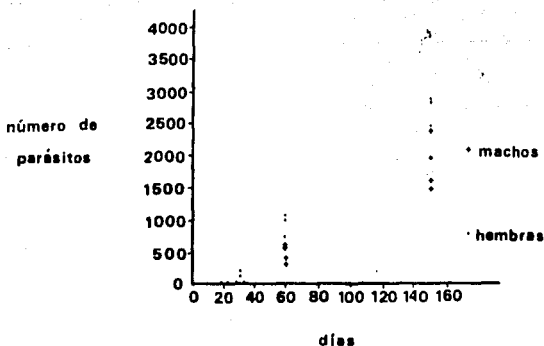


Fig. 19 Clínica de crecimiento de *T. crassiceps*, que muestra la susceptibilidad a la infección en hembras y machos, evaluada hasta los 150 días de infección.

Nováč, M. (1976), encontró un comportamiento similar de susceptibilidad, al estudiar la relación entre la gonadectomía y el crecimiento de larvas de *Taenia crassiceps*. Por otro lado, Mitchel et al (1974) estudiando la susceptibilidad de ratones de ambos sexos hacia *Taenia taeniaeformis* (*Eyslercus fasciolaris*) encontró que los machos son más susceptibles que las hembras. Todas estas observaciones sugieren que la susceptibilidad entre los sexos, puede ser dependiente del parásito involucrado.

La susceptibilidad de los ratones hembras hacia el establecimiento y reproducción de *T. crassiceps* puede estar asociada con una cuestión hormonal. Estudios realizados por Novac, M. (1976) con ratones de ambos sexos cepa BWR gonadectomizados, demostraron una disminución de la reproducción asexual del metacéstodo de *T. crassiceps* y por lo tanto una baja en el número de larvas gemantes con un concomitante incremento de tamaño de las larvas no gemantes.

Las observaciones respecto a la relación susceptibilidad-edad del huésped, sugieren que la instalación del parásito depende del grado de maduración del sistema inmunológico del huésped (en los ratones, la madurez inmunológica se alcanza aproximadamente a las 5 semanas de edad).

"Ratones de 7 meses o más alimentados con huevecillos, parecen ser igualmente susceptibles que los de 2 meses, pero menos susceptibles que los ratones de 1 mes de edad" (Freeman, 1962).

Estudios realizados en este laboratorio, sugieren que la susceptibilidad a la infección, puede estar asociada con un incremento en la respuesta humoral del huésped (Fig. 20).

Las infecciones intraperitoneales en ratones con larvas de *T. crassiceps* van acompañadas por la producción de anticuerpos, los cuales no parecen ser efectivos contra los metacéstodos (Chernin, 1977), ya que las infecciones pueden perdurar durante el tiempo de vida del huésped, sin embargo, Siebert y Good (1982) encontraron que el suero de ratones inmunizados contra el cisticerco, provoca

alteraciones en el tegumento tanto *in vivo* como *in vitro*.

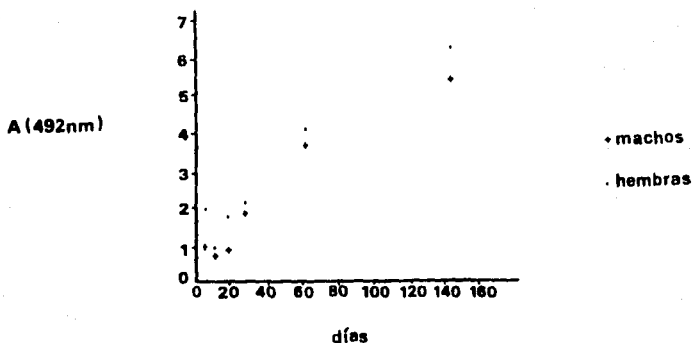


Fig. 20. Relacion del nivel de anticuerpos observado desde la instalacion del parassito hasta los 150 dias de enfermedad. Al incrementarse los dias de infeccion, y por lo tanto el No. de parassitos, aumenta el titulo de anticuerpos.

La inmunidad celular aún no ha sido explorada a fondo y el único evento estudiado es la eosinofilia que en muchas ocasiones se acompaña de una resistencia a la infección (Freeman, 1962) y una depresión de la respuesta inmunológica hacia antígenos no relacionados (Good y Siebert, 1976).

Se lograron establecer mecanismos de protección contra el establecimiento intraperitoneal de larvas

de *Taenia crassiceps* en ratones, cuando se les desafió previamente con metacéstodos por vía subcutánea.

"Puede obtenerse un alto grado de resistencia a la infección, por inoculación - subcutánea de larvas, 3 semanas antes del desafío intraperitoneal" (Good, et al, 1982).

Estas observaciones sugieren que la vacunación contra el metacéstodo podría ser eficaz, tanto por vía subcutánea o intraperitoneal, haciendo un adecuado uso del antígeno y del adyuvante empleado.

2.5 ANTIGENOS COMUNES DE *Taenia crassiceps*.

Se han encontrado considerables evidencias de que diversos antígenos de la forma larvaria de las tenias pueden estimular una respuesta inmunológica protectora entre ellas. Gemmell (1965) encontró que embriones viables de *Taenia hydatigena* y *Taenia ovis* inoculados intramuscularmente, produjeron reacciones inmunitarias contra *Taenia pisiformis*. Musoke y Williams (1976), detectaron protección de *T. crassiceps* implantadas intraperitonealmente contra un desafío oral de huevecillos de *Taenia taeniaeformis* pero no entre *T. granulosus* y *Taenia taeniaeformis*.

Estudios preliminares conducidos en este laboratorio han detectado antigenicidad cruzada entre antígenos de *T. crassiceps* y *T. solium*, que pueden ser importantes en el diagnóstico y la vacunación (Montoya, R.M. et al, VII Congreso Nal. de Inmunología). Este hallazgo constituye un fuerte apoyo para estudiar la respuesta inmune del huésped contra el establecimiento y persistencia de

la infección por otras tenias de importancia médica como *Taenia solium* (Fig.21).

Antígeno: Fluido vesicular de larvas de *Taenia crassiceps*.

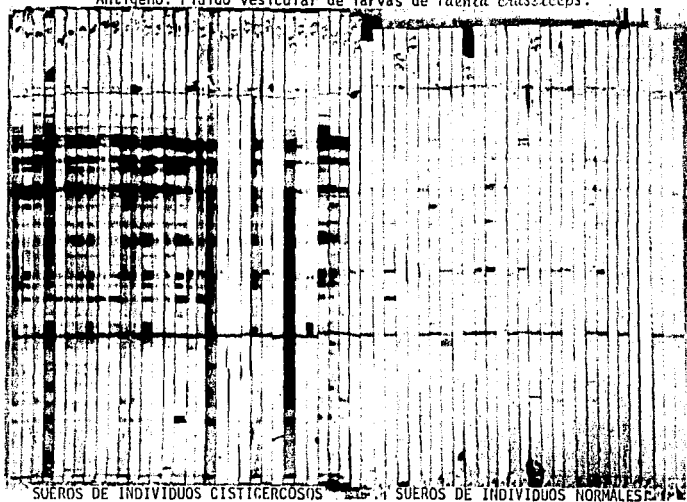


Fig. 21. Antigenicidad cruzada entre cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*.
Tomada de: Montoya, R. M., et al., VII Congreso Nacional de Inmunología, 1987.

Taenia solium

APENDICE III

Taenia solium

3.1 CLASIFICACION.

	Gusano Adulto	Forma larvaria
PHYLUM:	Plathelminthes	Plathelminthes
CLASE:	Cestoda	Cestoda
ORDEN:	Taenoidea	Taenoidea
FAMILIA:	Taenidae	Taenidae
GENERO:	Taenia	Cysticercus
ESPECIE:	solium	cellulosae

3.2. ANTECEDENTES.

La cisticercosis es un padecimiento infeccioso que ha afectado al hombre y a los cerdos desde la antigüedad; sus consecuencias se conocen desde el siglo IV A.C., al informar Aristófanes (380-375 A.C.) sobre la presencia de vesículas en la lengua de los cerdos infectados, y posteriormente Aristóteles (384-322 A.C.) los reconoció como los transmisores de la parasitosis, asentándose así la importancia que representa el cerdo como portador de la enfermedad (Nieto, D., 1982).

Gessner y Rumler en 1558 (Nieto, D., 1982), manifestaron por primera vez el impacto social que ha representado la cisticercosis en el hombre, al detectar la presencia de vesículas en el cerebro de un individuo con trastornos epilépticos.

El agente etiológico de la cisticercosis denominado *Cysticercus* (*Xysus*= vesícula, *Xercus*= cola) por Laennec y *cellulosae* (debido a la gran afinidad que el parásito tiene por el tejido

conectivo) por Rudolphi, constituye la forma larvaria del céstodo *T. solium*.

La relación de estas 2 entidades parasitarias fue propuesta por Kuchenmeister (1885) y por Leuckart (1856) al estudiar el ciclo biológico y demostrar que las vesículas de los tejidos del cerdo eran el estadio larvario infectante para el hombre.

3.3. MORFOLOGIA.

3.3.1. *Taenia solium*.

T. solium se caracteriza por ser un gusano plano, acintado, segmentado, que mide entre 1.5-5 m de largo (excepcionalmente hasta 8 m) y 7-10 mm de ancho; presenta un escólex o cabeza cuboide de aproximadamente 1.5-2 mm, constituida por 1 rostelo armado con 2 hileras de ganchos cuyo número varía de 22-32 y 4 ventosas semiesféricas musculares (Fig.22). Tanto el rostelo como las ventosas le sirven como órganos de fijación para anclarse a la pared del intestino delgado. Presenta un cuello a través del cual se une la cadena estrobilar, constituida por numerosos proglótidos, y cuya producción tiene lugar en la región distal del cuello.

Los proglótidos se han clasificado, de acuerdo a su cercanía al cuello y presencia de órganos sexuales desarrollados y de óvulos y espermatozoides, en proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, siendo éstos últimos, los más alejados.

Los proglótidos inmaduros son indiferenciados, mientras que los maduros pueden ser considerados como unidades reproductoras independientes, ya que presentan órganos genitales masculino y femenino.



Fig.22. Escólex de la *T. colubrum* observado en el microscopio electrónico de barrido.

Tomado de: Aluja, A., et al (1987). *Cysticercosis*. Fondo de Cultura Económica. México: 1a. Ed.

Los proglótidos grávidos están totalmente diferenciados, contienen un gran número de huevecillos (aproximadamente 50 000 c/u) y se desprenden espontáneamente (promedio de 4-5 por día) para ser evacuados en las heces fecales (Tay, J., 1985; Rivera, L., 1980).

Los huevecillos de *T. colubrum* son morfológicamente similares a los de otras especies de ténidos e idénticos a los de *T. oaginata*. Poseen varias envolturas, siendo la más externa la cápsula o vitelo, siguiendo el embrióforo que es la más

importante para la protección de la oncosfera y rodeando directamente a la oncosfera o embrión hexacanto, se encuentra la membrana oncosferral (Laclette, J.P., 1982; Aluja, A. *et al.*, 1987).

3.3.2. *Eyspicerco cellulosa*.

El cisticercos de *T. solium* se caracteriza por ser una vesícula ovoide o casi esférica, de color blanco lechoso, con un cuello y un escólex invaginado, el cual posee 4 ventosas y 1 rosetelo armado.

Se ha reportado la presencia de otra forma de metacéstodo en pacientes con cisticercosis cerebral denominada *Eyspicerco racemosus* que posee una vesícula multilobulada, sin escólex, aunque también se han encontrado *Eyspicerco cellulosa* en los que se observan principios de lobulización (Tay, J., *et al.*, 1985; Rivera, L., 1980; Aluja, A., *et al.*, 1987).

Mediante examinación microscópica profunda se sugiere que ambos cisticercos sean formas alternativas del mismo parásito (Aluja, A., *et al.*, 1987).

3.4. CICLO BIOLÓGICO.

Durante el ciclo biológico de *T. solium*, el gusano adulto se localiza en el intestino delgado, fijándose a la pared intestinal mediante el escólex, y los proglótidos grávidos son expulsados al medio ambiente, donde la putrefacción de los mismos permite la liberación de los huevecillos, los cuales llegan a sus huéspedes intermedios generalmente por medio de 3 mecanismos:

a) Heteroinfección.

Ingestión de agua y/o alimentos contaminados

por los huéspedes intermediarios, por diseminación a través de transmisores biológicos (moscas), mediante fomites, o por el aire.

b) Autoinfección externa.

Siguiendo el mecanismo ano-mano-boca, es decir, después de la defecación en que hubo eliminación de proglótidos o huevecillos, la persona con higiene deficiente, se contamina las manos, que posteriormente se llevará a la boca o a los alimentos de otras personas.

c) Autoinfección interna.

Cuando en personas que alojan al parásito adulto hay retroperistaltismo, los huevecillos y proglótidos grávidos llegan al tubo digestivo y eclosionan por acción enzimática (Tay, J., 1985; Rivera, L., 1980; Sarti, E. J., 1985).

Una vez que el huevecillo fue ingerido por el huésped intermediario, el embrión hexacanto se activa mediante enzimas proteolíticas y sales biliares presentes en el tubo digestivo del huésped y de esta forma, la oncósfera es capaz de atravesar la pared intestinal y llegar a la circulación linfática y sanguínea para ser distribuida a distintos órganos y tejidos.

Una vez localizadas las oncósferas en un sitio determinado se requieren aproximadamente de 10 semanas para que éstas se conviertan en cisticercos (Tay, J., *et al.*, 1985).

Cuando el hombre ingiere carne de cerdo infectada con cisticercos, insuficientemente cocida o cruda, el ciclo se cierra, y el cisticerco se activa por acción de las enzimas gástricas y sales biliares, fijándose a la pared intestinal, después

crece y llega a convertirse en tenia adulta, liberando nuevamente proglótidos gravidos (Tay,J., 1985; Rivera,L., 1980; Aluja,A., *et al*, 1987) (Fig.23).

CICLO DE VIDA TAENIA SOLIUM

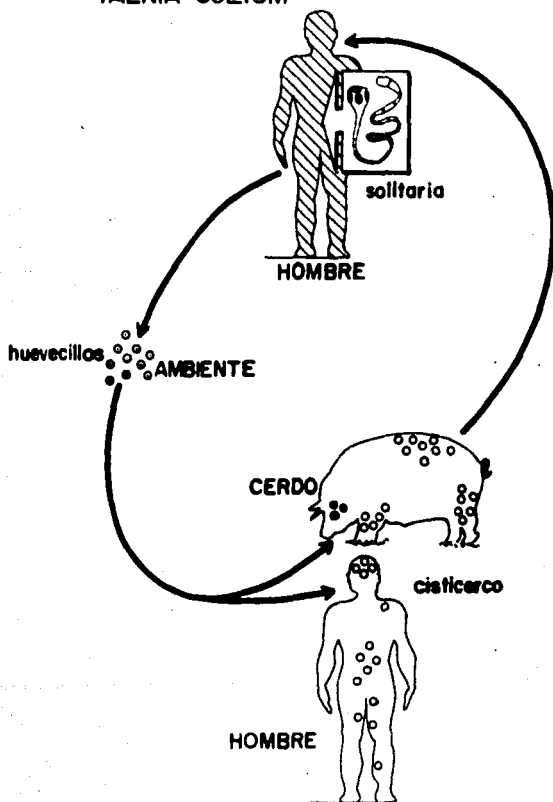


Fig. 23. Ciclo biológico de *T. solium*

3.5. TRANSMISION DE TENIASIS / CISTICERCOSIS.

Los principales factores que propician la transmisión de la cisticercosis son:

a) Contaminación fecal, que asegura la presencia de un gran número de huevecillos de *T. solium* en aire, polvo, insectos, agua, suelo (Fig.24).



Fig. 24. Eslabón de la cadena de transmisión de la teniasis/cisticercosis.

- b) La negligencia por parte de los portadores de *T. solium* para llevar a cabo un tratamiento contra la teniasis, que dá oportunidad al parásito para producir huevecillos fértiles.
- c) La irrigación de tierras de cultivo con aguas negras, lo que propicia la contaminación de hortalizas que son ingeridas por el hombre.
- d) La alimentación de cerdos con heces fecales humanas, sobre todo en áreas rurales, debido a las condiciones culturales de los habitantes (Fig.25).



Fig.25. Utilización de desperdicios en la alimentación de los cerdos.

Tomado de: Alujá, A. *et al.* (1982). *Cysticercosis*. Academic Press, New York.

- e) La resistencia de los huevecillos a agentes físicos y químicos (Flisser, A., *et al.*, 1986).

f) La eficiencia con que se transforma el huevecillo a cisticerco.

Los principales factores que influyen en la transmisión de la teniasis son:

a) El índice de cisticercosis en cerdos, que serán consumidos por humanos.

b) Una inspección inadecuada de la carne en los rastros, que incrementa el riesgo de contraer la enfermedad.

c) La comercialización clandestina de carne de cerdo infectada, que favorece la diseminación de la parasitosis. (Tay, J. *et al*, 1985; Larralde, C., 1986; Aluja, A., *et al*, 1987).

3.6. PATOGENIA.

Dependiendo de la fase del ciclo biológico en que se encuentre la *T. solium*, es capaz de generar 2 tipos de enfermedad: teniasis, causada por el gusano adulto y cisticercosis, originada por la forma larvaria.

3.6.1. Teniasis.

La teniasis es considerada como una infección intestinal, generalmente asintomática y de poca gravedad.

El cuadro clínico, cuando se presenta, puede manifestarse como náuseas, malestar general, cefalea, mareos, disnea, insomnio, excitación psicológica, pérdida de peso (Tay, J., *et al*, 1985; Sartí, E.J., y Gutiérrez, I., 1986; Aluja, A., *et al*, 1987).

3.6.2. Cisticercosis Humana.

La cisticercosis puede afectar distintos órganos y tejidos extraentéricos del organismo, encontrando más frecuentemente al metacéstodo en el SNC, ojos, lengua, tejido subcutáneo, corazón, diafragma y músculo esquelético, y en menor proporción en hígado, pulmones y riñones (Figs.26 y 27).



Fig. 26. Localización de *Echinocercus cellulosae* a nivel subcutáneo.

La sintomatología depende del órgano afectado, la carga parasitaria, el tamaño del cisticerco y la relación huésped-parásito (Larralde, C., 1986; Rivera, L., 1980; Aluja, A., et al, 1985) (Tabla II).



Fig. 27. *Cysticercus cellulosae* con un escólex evaginado en el humor acuoso de la cámara anterior del ojo

Tomado de: Aluja, A. et al (1982). Cysticercosis. Academic Press, New York.

TABLA 29. LOCALIZACION DE LOS PARASITOS EN 2188 CASOS DE CISTICERCOSIS EN AMERICA LATINA.

Localización*	Número	%
Encéfalo	1719	78.6
Médula Espinal	72	3.3
Ojo y Anexos	368	16.8
Tejido Subcutáneo	159	7.3

Músculo	79	3.6
Corazón	31	1.4
Otros	124	5.7
Generalizado	23	1.1

* Algunos pacientes presentan larvas en más de una localización.

3.6.2.1. Neurocisticercosis humana.

El SNC es el sitio donde el cisticerco se localiza con mayor frecuencia y donde el padecimiento causa más estragos (Fig.28).

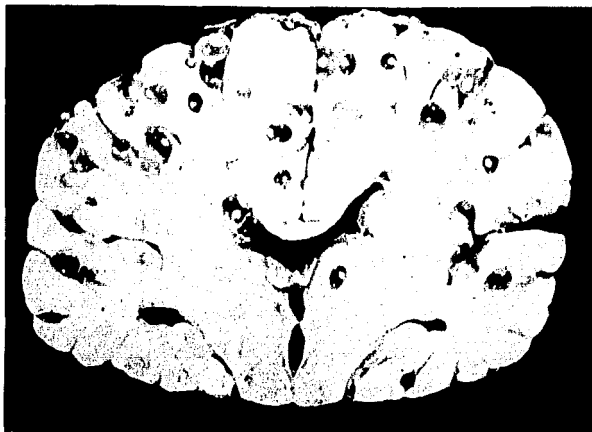


Fig. 28. Autopsia de cerebro humano con cisticercos localizados en diferentes regiones.

Es más frecuente encontrar parásitos en el cerebro que en la médula espinal, pero en ambos ca-

sos, la enfermedad se conoce como neurocisticercosis.

Las localizaciones más comunes de los metacéstodos, se considera, son parénquima cerebral, espacio subaracnoideo y el interior de los ventrículos.

La probabilidad de que se presenten casos asintomáticos es igual a la de encontrar casos sintomáticos. En el caso de que se presenten síntomas, éstos se deben a irritación, compresión, destrucción del tejido, número y localización del parásito; siendo los que se presentan con mayor frecuencia: disturbios mentales, epilepsia, hipertensión intracraneal, encefalitis, crisis convulsivas, vómitos y síndromes localizados (Síndrome de Bruns, Meningitis Basal, etc..) (Rivera, L., 1980; Aluja, A., *et al*, 1987).

3.7. DIAGNOSTICO.

3.7.1. Diagnóstico de cisticercosis.

3.7.1.1. Diagnóstico clínico.

Como se mencionó anteriormente, la patogenia de la neurocisticercosis es muy compleja, tanto por el número de pacientes asintomático, como por la combinación de síntomas que se presentan en los cisticercosos sintomáticos, por lo cual se recomienda tomar en cuenta los siguientes datos clínicos:

- I. Vivir o haber vivido en zona endémica.
- II. El antecedente de teniasis, personal o familiar.
- III. La presencia de cefalea atípica, crónica, persistente, rebelde a tratamien-

Ejemplos de Sensibilidad y Especificidad de algunas pruebas Inmunológicas
comunemente usadas en el Diagnóstico de Cisticercosis humana de acuerdo con
los resultados de 22 poblaciones.

Prueba	Muestra	Antígeno	Normal	Rango de los porcentajes de casos positivos.		
				Cisticercosis confirmada	Cisticer. probable	Pacientes neurrológicos
Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)	Suero, Líquido cefalorraquídeo	Antígeno B	5 -	79 81	- -	- 9
Inmunoelectroforesis (IEF)	Suero	Extracto crudo salino	0-13	54-87	47-83	4-24
Hemaglutinación indirecta (HA)	Suero	Extracto crudo deslipidizado	4-25	10-92	8-43	10-50
Inmunofluorescencia indirecta (IF)	Suero	Cortes de larvas	0-5	80 95	-	-
Fijación de complemento (FC)	Líquido cefalo- raquídeo	Extracto crudo	0-3		38-45	0-36

TABLA 30. Tomado de: Aluja, A., et al. 1987. Cisticercosis. Fondo de cultura económica. pp 53

tos comunes.

- IV. La aparición de crisis convulsivas tardías (después de los 21 años).
- V. La aparición de síntomas neurológicos, sobre todo si se asocian con hipertensión intracraneal.
- VI. La aparición de deterioro mental en individuos no seniles, asociada a hipertensión intracraneal." (Aluja, A., *et al*, 1987).

3.7.1.2. Diagnóstico radiológico.

3.7.1.2.1. Radiografía simple.

La radiografía simple del cráneo permite observar imágenes hiperdensas que cuando son redondeadas y miden 3-6 mm de diámetro sugieren parásitos calcificados.

3.7.1.2.2. Ventriculografía, Angiografía, Pneumoencefalografía, Mielografía, Gamagrafía.

Son procedimientos invasivos y complicados que "detectan la presencia de parásitos en forma indirecta al mostrar desplazamientos ventriculares o vasculares." (Aluja, A., *et al*, 1987).

3.7.1.2.3. Tomografía Computerizada.

Se considera el procedimiento de elección para el diagnóstico de la neurocisticercosis, es un método preciso, seguro, no invasivo y tiene un

grado de certeza del 97%; mediante la TAC se establece claramente a localización topográfica del parásito (Rivera, L., 1980; Larralde, C., 1986, Aluja, A., *et al*, 1987).

3.7.1.3. Diagnóstico Inmunológico.

Como la Tomografía Axial Computarizada no es una técnica fácilmente accesible en algunas áreas endémicas, es necesario tratar de obtener buenos resultados utilizando las técnicas para Inmunodiagnóstico.

En 1911 Moses, empleó a la Fijación de Complemento como la primera prueba inmunológica para el diagnóstico de la cisticercosis humana, utilizando como antígeno, extracto acuoso de cisticercos, realizando la determinación en suero; como los resultados obtenidos no eran satisfactorios, Nieto (1948) propuso realizar la determinación en LCR.

Actualmente, entre las pruebas que se utilizan para Inmunodiagnóstico se encuentran la Inmunolectroforesis, Hemaglutinación indirecta, Inmunofluorescencia, Doble inmunodifusión y ELISA (Rivera, L., 1980; Flisser, A., 1986; Aluja, A., *et al*, 1985; Larralde, C., *et al*, 1986) (Tabla 30).

3.7.2. Diagnóstico de Teniasis.

Para el diagnóstico de teniasis, es necesario recuperar los proglótidos grávidos expulsados por el paciente y posteriormente a una clarificación con NaOH o KOH 10%, se realiza la observación de las ramas intrauterinas, para diferenciar de *T. saginata*. Si el número de ramas es menor a 10, se diagnosticará como *T. solium*.

La observación del escólex es también de gran ayuda, ya que *T. solium* tiene un rostelo armado, lo cual permite diferenciarlo del de *T. saginata* (Tay, J., *et al*, 1985).

El realizar exámenes CPS (sedimentación, flotación y frotis grueso), no tiene gran valor, ya que los huevecillos de *T. solium* y *T. saginata* son idénticos.

3.8. TRATAMIENTO.

3.8.1. Cisticercosis.

3.8.1.1. Tratamiento sintomático.

El tratamiento sintomático es variable dependiendo de las manifestaciones de la enfermedad, y principalmente utiliza antiepilépticos para el control de las crisis convulsivas, analgésicos para cefaleas, esteroides y diuréticos para aliviar hipertensión intracraneana y psicofármacos en el caso de que se presenten alteraciones de la conducta (Larralde, C., 1986; Aluja, A., *et al*, 1987).

3.8.1.2. Tratamiento quirúrgico.

La cirugía no siempre es la solución al problema de la cisticercosis; depende de la localización del parásito y de las características anatomopatológicas de la enfermedad.

El procedimiento quirúrgico más empleado es la derivación de LCR a cavidad intraperitoneal, a través de un catéter, para aliviar el bloqueo del sistema ventricular; eventualmente se presentan obstrucciones haciéndose necesaria una nueva intervención (Larralde, C., 1986; Groll, E., 1982).

En ocasiones es posible extirpar el cisticerco, pero esto no es frecuente.

3.8.1.3. Tratamiento farmacológico.

El tratamiento a base de fármacos se limita a pacientes en los que se supone la existencia de parásitos vivos.

Dentro de los fármacos que actualmente se manejan con mayor frecuencia se encuentran:

a) Praziquantel.

Mediante el uso del praziquantel se ha logrado la desaparición o reducción de la imagen de un gran número de quistes parenquimatosos y subaracnoideos corticales al ser observados por TAC.

El praziquantel origina efectos colaterales en el huésped, presumiblemente a causa del aumento en la reacción inflamatoria que se provoca cuando el medicamento actúa sobre el parásito. Dentro de estos efectos se encuentra la exacerbación de los síntomas neurológicos, por lo cual se hace necesario un tratamiento ayudado con esteroides y antihipertensivos intracraneales (Larralde, C., 1986; Groll, E., 1982; Aluja, A., *et al*, 1987).

b) Metrifonato.

La acción principal del metrifonato consiste en que es capaz de inhibir las colinesterasas presentes en las diferentes estructuras del cisticerco (Aluja, A., *et al*, 1987).

Aunque se han obtenido resultados alentadores (Trujillo, V., *et al*, 1982) con el uso del medicamento, es importante considerar que se presentan también efectos tóxicos considerables

(Aluja, A., *et al*, 1987).

c) Albendazol.

El albendazol ejerce su efecto antihelmíntico mediante bloqueo en la captación de glucosa, es decir, abate los niveles energéticos hasta que se hace imposible la sobrevivencia del parásito (Aluja, A., *et al*, 1987).

Se han presentado en animales de experimentación efectos embriotóxicos y teratogénicos, por lo cual no debe ser empleado en niños menores de 2 años, ni durante el embarazo (Aluja, A., *et al*, 1987).

3.8.2. Teniasis.

La teniasis se combate con una terapia a base de medicamentos, utilizándose en forma más común la Niclosamida, que actúa sobre los proglótidos y escólex, haciéndolos susceptibles a la acción de enzimas proteolíticas.

Los cisticercos y huevecillos no se ven afectados por el fármaco; debido a esto, el paciente toma laxantes 2 h después de la administración de la niclosamida, para evitar el riesgo de que a causa del tratamiento, el paciente adquiera cisticercosis.

Fármacos utilizados en menor proporción son Mebendazol y Fluobendazol, que bloquean la absorción de glucosa y disminuyen la síntesis de ATP en el parásito; también se utilizan en el tratamiento anti-cisticercos, pero sin tener todavía cifras confiables (Aluja, A., *et al*, 1987).

3.9. IMPORTANCIA SOCIOECONOMICA.

En 1974, el Instituto Mexicano del Seguro Social, realizó un estudio de frecuencia de cisticercosis en la República Mexicana, sometiendo a Inmuno-electroforesis a 20 000 sueros de personas de todo el país. Los resultados manifestaron una elevada incidencia en la región del Bajío (Fig. 29).

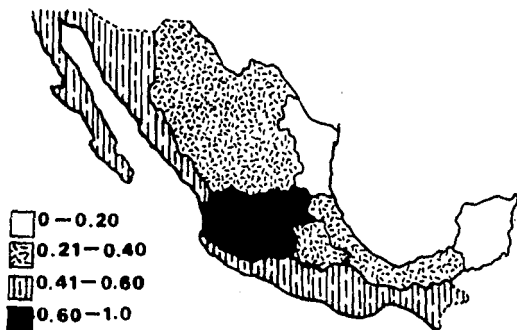


Fig. 29. Mapa Geoeconómico de la Rep. Mex. que indica la frecuencia regional de anticuerpos anticisticercosis. El área 5 presenta el más alto porcentaje, seguido por las áreas que colindan con el Océano Pacífico.

Tomado de: Woodhouse, E. Seroepidemiology of Human Cysticercosis in Mexico. In Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. (A. Flisser, et al eds.), Academic Press, New York.

"En la mayoría de los servicios de neurocirugía del país, la neurocisticercosis representa el 3er. o 4o. caso de admisión." (Velasco, M., *et al*, 1982).

En los servicios psiquiátricos se ha reportado que la neurocisticercosis se encuentra entre las 15 primeras causas de admisión (Velasco, M., *et al*, 1982).

Si consideramos que aproximadamente el 65% de pacientes con neurocisticercosis son incapaces de trabajar los primeros meses después de la enfermedad sintomática y que la mayor parte de la población afectada está constituida por personas en edad productiva (Velasco, M., *et al*, 1982), podemos imaginar las repercusiones que tendrá en el hogar. Se verán afectados la educación de los hijos y el estatus social, además de que se presentan problemas emocionales y económicos que ocasionan desestabilidad en la vida familiar. Esto afecta directamente al país, ya que hay que considerar gastos de hospitalización, medicamentos y atención por parte de personal especializado.

La frecuencia de cisticercosis porcina en los diferentes estados del país, varía del 0.005% al 10% (Tabla 31), encontrándose mayor prevalencia en Guanajuato, Michoacán y Chihuahua; aunque es importante considerar que estos valores representan a los cerdos criados en forma tecnificada y que la crianza rústica de cerdos y sacrificados clandestinamente representa aproximadamente el 30% de la producción porcina (Sarti, G. J., y Gutiérrez, I., 1986).

Estado	Localidad	Frecuencia	Año
Aguascalientes	Aguascalientes	0.52	1980
Chihuahua	Chihuahua	0.49	1980
	Chihuahua	3.32	1980
	Chihuahua	1.65	1981
Colima	Varios	2.4	1980
Coahuila	Torreón	2.37	1981
D.F.	México, Cd.	0.13-0.16	1980-81
Durango	Durango	2.21	1980
Guanajuato	Ocampo	10.0	1981
	San Felipe	3.0	1981
Jalisco	Guadalajara	0.005	1981
Michoacán	La Piedad	10.0	1980
Morelos	Varios	1.9	1980
	Cuernavaca	0.37	1980
Nuevo León	Monterrey	0.004-0.16	1980-81
Querétaro	Querétaro	0.560-0.74	1980-81
Sonora	Hermosillo	0.07	1980
Tamaulipas	Cd. Victoria	0.37	1980
Tlaxcala	Huamantla	0.63	1980
	Apizaco	3.3	1980
Veracruz	Jalapa	0.11	1980
	Veracruz	0.75	1980
	Tuxpan	1.08	1980
Yucatán	Mérida	0.04	1980
Zacatecas	Jerez	0.75	1980
	Fresnillo	2.10	1980
	Zacatecas	1.26	1980
Tabasco	No se encontró información		
Campeche	No se encontró información		

Para poder imaginar el impacto económico causado por la cisticercosis porcina, podemos reflexionar sobre el siguiente dato: En 1980 las pérdidas por carne de cerdo decomisada e incinerada, representaron más de 906 millones de dólares.

INMUNOPARASITOLOGIA

APENDICE IV

INMUNOPARASITOLOGÍA

La inmunoparasitología es una disciplina que se basa en 5 principios según Mitchell (1979):

1. La creencia de que las infecciones parasitarias y enfermedades de importancia médica y veterinaria podrían ser tratadas o controladas por medio de vacunas.
2. La esperanza de que los estudios sobre los mecanismos de protección de los parásitos contra las defensas del huésped potencialmente agresivas, provean de gran cantidad de información con alta significancia biológica.
3. La fascinación innata sobre los parásitos y el parasitismo.
4. La oportunidad de definir y explotar las funciones de ciertos eventos que acompañan a las infecciones parasitarias crónicas, tales como eosinofilia y aumento de anticuerpos IgE.
5. La elevada disponibilidad de recursos para investigación básica y aplicada en inmunoparasitología." (Mitchell, 1979).

Debido a que la neurocisticercosis es una parasitosis que cuando se presenta de manera sintomática es de consecuencias fatales a corto o largo plazo, a su alta incidencia en México y a que las medidas terapéuticas existentes no revierten los daños causados por el cisticerco en el Sistema Nervioso Central, se hace oportuna una medida de control tal como la vacunación.

Las vacunas son suspensiones de microorganismos atenuados, inactivados, o sus productos, capaces de despertar en el individuo una respuesta inmune. De esta manera se intenta aumentar la resistencia a un desafío patogénico posterior y reducir el riesgo individual de contraer una enfermedad infecciosa.

4.1. RESPUESTA INMUNE / CISTICERCOSIS HUMANA.

Se ha encontrado que en la cisticercosis, la respuesta inmune humoral está principalmente asociada a anticuerpos de la clase IgG, seguidos por la clase IgM (Flisser *et al.*, 1980, 1982a); los cuales pueden detectarse en suero o LCR en proporciones dependientes de la sensibilidad del método que se emplee (Flisser *et al.*, 1979). Sin embargo, no todos los individuos son capaces de montar una respuesta inmune detectable, lo cual puede atribuirse a inmunosupresión, tratamiento con esteroides, inmunosupresión y factores asociados al parásito, entre otros (Reyes-Armijo and Beltrán Góñi, 1961; Scully *et al.*, 1977; Mitchell, G., 1979).

El hecho de encontrar en el suero de pacientes con neurocisticercosis al menos 8 antígenos con diferente movilidad electroforética implica una respuesta inmune humoral heterogénea, siendo el antígeno B el más frecuentemente reconocido (Flisser *et al.*, 1980, 1982a).

A nivel tisular se han identificado algunas clases de Inmunoglobulinas y Complemento (C3b) en la interfase huésped-parásito, pudiendo considerar esta respuesta como heterogénea, debido a que aún dentro de los parásitos de un mismo huésped existen variaciones (Correa *et al.*, 1985).

En pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría, D.I.F., se ha encontrado una asociación entre cisticercosis e inmunodeficiencias, siendo las más frecuentes: Lupus Eritematoso Sistémico, Ataxia-Telangiectasia, Leucemia, Linfoma (Flisser, *et al*, 1982).

Aún cuando la respuesta inmune celular ha sido menos estudiada, se ha encontrado que no existen diferencias significativas en el número de los linfocitos T y B en personas infectadas y no infectadas; sin embargo, en los pacientes cisticercosos se observa una disminución en la reactividad al PPD (Sealey, M., and Ortiz, L., 1982; Flisser *et al*, 1982a y b). También se ha observado que los antígenos del parásito promueven la acumulación de células plasmáticas y eosinófilos, además de que aparecen fibroblastos en la interfase huésped-parásito.

4.2. VACUNACION EXPERIMENTAL CONTRA LARVAS DE CESTODOS.

Considerando la multicausalidad de las enfermedades infecciosas, es necesario contar con un modelo experimental que simule el padecimiento para analizar la influencia de las distintas variables que intervienen y sus interacciones.

La inmunidad en el huésped intermediario juega un papel regulatorio vital en la transmisión de los parásitos, de tal manera que el desarrollo de proyectos de vacuna podría ser un gran logro para el control de la cisticercosis (Rickard, M.D., 1986).

Debido a que no puede utilizarse al ser humano como sujeto de experimentación y a que el empleo del cerdo para este fin implica un elevado costo, se han realizado varios estudios que involucran

otras relaciones vertebrado-céstodo que sirvan como modelo para estudiar el efecto de las distintas variables.

4.2.1. Inmunización con oncósferas activas.

Se ha observado que existe una fuerte inmunidad hacia larvas de céstodos tales como *T. ovis*, *T. hydatigena* y *S. granulosus* en carnero, y hacia *T. pisiformis* en conejos cuando se inyecta una sola dosis de oncósferas activas por la vía intramuscular (Rickard, M., 1982). Sin embargo, el manipular este tipo de material biológico es altamente peligroso y como efectos post-vacunales pueden encontrarse el desarrollo de una colonia de larvas en el sitio de inyección o el establecimiento de las mismas en otros sitios del cuerpo (Rickard, M., 1982).

Considerando que la forma adulta de *T. solium* sólo se desarrolla en el hombre, implica un problema casi insuperable la recolección de grandes cantidades de huevecillos para su utilización como antígeno.

4.2.2. Inmunización con oncósferas inactivadas.

Se han utilizado procedimientos de inactivación de oncósferas como: irradiación con Rayos X, congelamiento-sonicación, y tratamiento con anti-helmínticos, con *T. pisiformis* en conejos y aunque de esta forma es posible evitar la presencia de lesiones post-vacunales, en la práctica los procedimientos son inaceptables debido a que se reduce la antigenicidad cuando las oncósferas se someten a centrifugación para obtener los antígenos correspondientes (Rickard, M., 1982).

4.2.3. Inmunización con antígenos de secreción.

Rickard y Bell (1971) implantaron oncósferas de *T. ovis* y *T. taeniaeformis* que estaban contenidas dentro de filtros Millipore, en la cavidad peritoneal de borregos o ratas, y observaron inmunidad protectora cuando se desafiaba con huevecillos de *T. ovis* y las membranas de difusión habían estado *in situ* por sólo 1 semana; en cambio, no se encontró con *T. taeniaeformis* aún después de tres semanas de implantación de la membrana.

Por otra parte los investigadores antes mencionados, utilizando un sistema de cultivo simple desarrollado por Heath y Smith (1970), colectaron antígenos de secreción provenientes de 20 000 oncósferas activadas de *T. ovis* cultivadas *in vitro* por un lapso de 8 días. Emulsificando los antígenos de secreción con adyuvante completo de Freund y aplicándolos como vacuna por vía intramuscular a ovejas, obteniéndose una completa resistencia a un desafío con huevecillos viables que se dió 5 semanas después.

La vacunación con antígenos de *T. hydatigena* derivados de un medio de cultivo, dió un alto nivel de protección contra un desafío con *T. ovis*, observándose de este modo inmunoprotección cruzada.

Se ha sugerido que existen problemas con la estandarización de antígenos y diferencias en el sexo de los animales utilizados, lo cual puede influir en la variabilidad de los resultados (Rickard, D., 1982).

4.2.4. Vacunación con extracto de estadios larvarios.

Miller (1932) utilizó un extracto antigénico de cisticercos secos de *T. taeniaeformis* para aplicarlo en repetidas inyecciones a ratas, obteniendo elevados niveles de protección contra la infección de huevecillos activos del parásito.

Campbell (1936) obtuvo buenos resultados de protección contra la infección con *T. taeniaeformis* al administrar a ratas seis inyecciones vía intraperitoneal de extracto crudo de cisticercos fresco o seco.

4.2.5. Inmunización pasiva.

La respuesta inmune a metacéstodos parece deberse en gran parte a la inmunidad humoral, y se ha demostrado la transferencia pasiva de la inmunidad en varias infecciones causadas por metacéstodos.

En la infección por *T. taeniaeformis* en ratas y ratones, se encontró que los ratones recién nacidos estaban protegidos contra la infección, por una transferencia pasiva de la inmunidad prenatal. Esta se ha asociado a una fracción cromatográfica del calostro de la rata inmune que contiene IgG y que es capaz de conferir protección pasiva cuando se inoculan parenteralmente a las ratas.

También se ha estudiado el papel de la IgA en infecciones contra *T. taeniaeformis*, encontrándose que la IgA purificada, aislada de las secreciones intestinales de ratones infectados oralmente con huevecillos de *T. taeniaeformis*, fue capaz de inducir pasivamente la inmunidad después de ser inyectada intraduodenalmente a un ratón receptor.

La transferencia pasiva de la inmunidad con

suero, se demostró en 1930 en ratas infectadas con *T. taeniaeformis* y en conejos infectados con *T. pisiformis*. Más tarde, se estableció el papel protector de la IgG del ratón inmune, demostrando que la IgG purificada del suero era protectora contra la infección con *T. taeniaeformis* (Lawson, E., 1982).

El modo de acción de los anticuerpos contra los metacéstodos no es completamente conocido, pero se considera que el efecto protector de la transferencia pasiva se encuentra asociado a la participación del Complemento.

Heath ha mostrado que cuando se incuban oncosferas de *T. pisiformis* con suero inmune y Complemento, se paralizan y no liberan antígenos de secreción, degenerando rápidamente.

Se han realizado estudios *in vivo* en ratas y ratones que muestran la importancia del Complemento, ya que la depleción de éste en las ratas inmunizadas pasivamente permitió una mayor sobrevivencia de *T. taeniaeformis*.

4.3. PERSPECTIVAS DE LA INMUNOPARASITOLOGIA.

Por muchos años, la única vacuna disponible contra parásitos, ha sido la vacuna atenuada de *Babesia bovis* producida por el Centro de Investigación de la Fiebre transmitida por ácaros de Queensland, Australia (Timms, P., de Vas, A. J., Dalgliesh, R. J., 1986).

No hay duda de que para los próximos 10-15 años, se desarrollarán nuevas herramientas para el control y detección de infecciones parasitarias y otras enfermedades.

La recompensa de la investigación en inmunoparasitología puede esperarse que sea: el logro del control de la infección basado en la vacunación, la obtención de reactivos de inmunodiagnóstico de alta sensibilidad y especificidad, la identificación de respuestas inmunopatológicas del huésped, el esclarecimiento de la relación variación genética-susceptibilidad en la infección y la comprensión de los mecanismos de supervivencia de los parásitos en un ambiente potencialmente hostil (Mitchell, G., 1979).

TECNICAS

APENDICE V

TECNICAS

5.1. ELISA.

5.1.1. Principio.

El antígeno acoplado a un soporte de fase sólida, se incuba con el suero que contiene los anticuerpos específicos, formándose complejos antígeno-anticuerpo que se pondrán de manifiesto al adicionar otro anticuerpo heterólogo biotinilado que se une al anticuerpo primario; y cuando se adiciona avidina marcada con peroxidasa, la avidina se une a la biotina, amplificando la señal producida al actuar la peroxidasa sobre un sustrato, dando un producto colorido, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente (Fig.30).

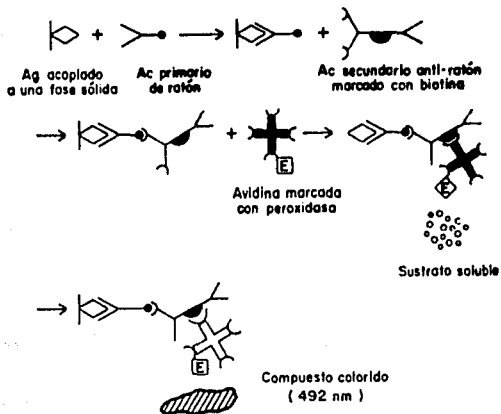


Fig. 30. Fundamento del ELISA.

5.1.2. Uso de la interacción avidina-biotina en técnicas inmunoenzimáticas.

La interacción avidina-biotina, ha sido aprovechada en la unión de enzima-proteína, ya que aunque las fuerzas que intervienen son no covalentes, son excepcionalmente fuertes ($K_{\text{disociación}} = 10^{-15}$ M).

El procedimiento empleado en este estudio se conoce como LAB (Labeled Avidin Biotin) y consiste en marcar el antígeno o el anticuerpo con biotina, y la avidina con enzima. Debido a que la avidina posee 4 sitios activos, éstos reaccionan con los residuos de biotina asociados con los anticuerpos, y aún con la sustitución extensiva de los grupos amino en moléculas de anticuerpo por biotina, la capacidad de unión al antígeno no se modifica, y puede amplificarse la señal aumentando la sensibilidad del método.

Existe otro procedimiento que consiste en marcar el antígeno o el anticuerpo con biotina, añadir la avidina y por último la enzima marcada con biotina. Este proceso se denomina BRAB (Bridged-Avidin Biotin) (Luc, G.J., Ternynck, T., Avrameas, S., 1979).

5.1.3. Materiales.

5.1.3.1. El antígeno.

Debe tomarse en cuenta que una muestra estable influirá en la reproducibilidad de los resultados. En la estandarización del antígeno deben considerarse: especie, cepa y estado de desarrollo del parásito; especie y cepa del animal huésped, periodo de post-infección antes de obtener los metacístodos. Si se considera una mezcla de antígenos crudos, para determinar la cantidad

correcta para sensibilizar una placa, se efectúan pruebas con sueros de referencia positivos y negativos. La dilución de antígeno que da la mayor discriminación entre ellos es la que se utiliza subsecuentemente (Bidwell, D.E., et al., 1976).

5.1.3.2. Adsorción a una fase sólida.

La sensibilización de una fase sólida puede depender de la calidad de la superficie de poliestireno, así como del tiempo, temperatura y pH.

Parece que las adsorciones prolongadas (toda la noche) a 4°C, dan una sensibilización uniforme.

5.1.3.3. Solución de lavado.

La más utilizada es PBS-Tween 0.3% pH 7.5. Los lavados se realizan después de la sensibilización con el antígeno, después de la incubación con el suero y posteriormente a la incubación con el conjugado. El PBS puede sustituirse por agua, siempre y cuando ésta tenga un pH neutro y un bajo contenido de cloro.

5.1.3.4. Dilución del suero.

La dilución adecuada se determina ejecutando pruebas con sueros de referencia positivos y negativos, y aquella que da la diferencia máxima de valores de absorbancia entre los sueros conocidos es la que se prefiere emplear.

5.1.3.5. Conjugado.

Avrameas & Uriel y Nakane & Pierce (1966) mostraron que la peroxidasa es una buena enzima

para conjugación, ya que posee una elevada actividad, es más barata que la fosfatasa alcalina y tiene un producto de reacción con la o-fenilendiamina de color naranja. La dilución óptima del conjugado, debe determinarse realizando pruebas para obtener diferencias máximas con sueros de referencia positivos y negativos. Los valores de absorbancia del conjugado control deben ser casi nulos.

5.1.3.6. Tiempo de reacción del sustrato.

La reacción puede pararse después de 30 min., o cuando la absorbancia de una muestra positiva alcance un valor predeterminado; esto se realiza por monitoreo de la reacción a intervalos de tiempo en series de pozos con sueros positivos.

5.1.4. Lectura y valoración de resultados.

Los resultados del ELISA pueden expresarse como:

- a) Valores de absorbancia, determinando valores de una población normal como controles, y clasificando como positivos los que estén arriba y como negativos los que se encuentren abajo de este valor.
- b) Porcentaje de sueros positivos de referencia.
- c) Punto final de la titulación cuando se utilizan varias diluciones del suero (Voller, A., Bidwell, D.E & Bartlett, A., 1976).

5.1.5. Ventajas y desventajas de la técnica.

A pesar de que el Radio Inmuno Análisis (RIA) no se usa ampliamente para diagnóstico de

enfermedades parasitarias, se puede comparar con ELISA por su cercana semejanza. La comparación con la Inmunofluorescencia (IF) es más relevante porque la técnica se ha utilizado más frecuentemente.

Una de las ventajas del ELISA es que se puede visualizar simultáneamente la presencia de anticuerpos hacia varios agentes infectivos. Esto tiene importancia para establecer perfiles epidemiológicos.

También puede discriminar entre las fases tempranas de una enfermedad y una experiencia pasada (Tabla 32).

TABLA 32. COMPARACION DEL ELISA CON OTRAS TECNICAS.

Criterios	ELISA	RIA	IF
Sensibilidad	Alta	Alta	Usualmente baja
Especificidad	Depende del Ag.	Depende del Ag.	Alta
Reproducibilidad	Aceptable	Aceptable	Aceptable
Lectura	Objetiva	Objetiva	Usualmente subjetiva
Preparación del Ag.	Puede ser complicada	Puede ser complicada	Fácil

Conjugado	Bajo evaluación	Calidad estandar	Calidad estandar
Mecanización	Posible	Posible	Dificil
Costo/prueba	Bajo	Alto	Alto
Vida media de los reactivos	Larga	Corta	Corta
Riesgos de salud para el personal	Ninguno	Presente	Ninguno
Factibilidad de ejecución bajo condiciones de campo	Facil	No posible	Intermedia

5.1.6. Aplicaciones.

La técnica de ELISA se ha utilizado en la detección de padecimientos parasitarios como paludismo, triquinosis, esquistosomiasis, tripanosomiasis, cisticercosis y filariasis.

En Endocrinología se emplea para detectar hormonas; en casos de enfermedades autoinmunes puede utilizarse para medir anticuerpos contra DNA, α -fetoproteína, etc.; también para evaluar factores de la coagulación en Hematología; así como para cuantificar anticuerpos contra bacterias como *Salmonella*, *Treponema*, etc., y anticuerpos en padecimientos virales.

5.1.7. Preparación de reactivos.

1.- PBS 10X

NaHPO ₄	10.22g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	3.86g
NaCl.....	74g
H ₂ O destilada hasta.....	100ml.
Ajustar a pH 7.5	

2.- Albúmina sérica bovina 1% en PBS.

3.- PBS/Tween 20 0.1%

4.- H₂SO₄ 4N

5.- Amortiguador de Citrato-Fosfato

Na ₂ HPO ₄ 0.2M.....	25.7ml
Ac. cítrico 0.1M.....	24.3ml
H ₂ O destilada.....	50ml
H ₂ O ₂	50μl

6.- Anti-Inmunoglobulina de ratón biotinilada (Dilución 1:2000 en PBS/Tween 0.1%)

7.- Streptoavidina-peroxidasa (Dilución 1:2000 en PBS/Tween 0.1%).

5.2. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

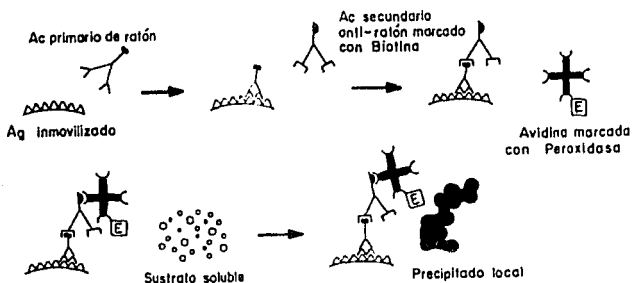
El término "blotting" se utiliza para hacer referencia al proceso por medio del cual se pueden transferir macromoléculas desde un gel hasta una matriz inmovilizadora (Gershoni, M.J., *et al*, 1983). Este concepto puede emplearse combinado con las

macromoléculas que se desean transferir. Ej: DNA-blotting (Southern Blotting), RNA-blotting (Northern Blotting), y blotting de proteínas (Western Blotting).

La técnica puede identificar una proteína antigénica en una mezcla compleja de proteínas, como el extracto crudo de cisticercos.

5.2.1. Principio.

Los componentes de la mezcla proteica se desnaturalizan y se separan electroforéticamente en un gel de poliacrilamida-SDS, posteriormente se transfieren a una matriz inmovilizadora, en este caso, papel de nitrocelulosa. Después, al reaccionar con el suero que contiene los anticuerpos, se forman complejos Ag-Ac que se pondrán de manifiesto al adicionar otro anticuerpo que se une al anticuerpo primario y acoplar una enzima (peroxidasa) que es capaz de reaccionar con el sustrato (4-cloro-1-naftol) para dar bandas de precipitación coloridas (violeta) en aquellas zonas donde estén presentes los complejos Ag-Ac (Fig.31).



5.2.2. Corrimiento electroforético.

5.2.2.1. Fundamento.

Las proteínas son macromoléculas anfotéricas, que contienen tanto residuos ácidos como básicos; y su carga neta depende del pH del medio en el que se encuentren, si están en un pH al cual no tienen carga neta, se dice que ese pH corresponde a su pI. En una solución en donde el pH está por arriba del pI de una proteína, ésta quedará cargada negativamente y migrará hacia el ánodo en un campo eléctrico; si por el contrario, el pH del medio está abajo del pI de una proteína, ésta se cargará positivamente y migrará hacia el cátodo (Towbin H. *et al.*, 1979).

Como las proteínas se encuentran en una solución donde está presente un potente detergente (Dodecil sulfato sódico) con carga negativa, este se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas provocando que se extiendan cadenas polipeptídicas, migrando hacia el electrodo positivo. Además se añade mercaptoetanol con la finalidad de romper cualquier puente disulfuro para que puedan analizarse los polipéptidos constitutivos de las macromoléculas (Bruce, A., Bray, D., Lewis, I. 1986).

El pH de una solución utilizada en electroforesis, debe mantenerse constante para asegurar la carga y movilidad de las proteínas, por lo cual dichas soluciones deben ser amortiguadoras.

Las proteínas pequeñas se mueven mucho más rápidamente a lo largo de los poros del gel, por lo que a partir de una mezcla compleja de proteínas, se forman bandas protéicas de acuerdo a su Peso Molecular.

5.2.2.2. Geles de poliacrilamida.

Los monómeros de acrilamida polimerizan en cadenas largas que están unidas covalentemente por una sustancia (bis) que actúa ligando la estructura. Debido a que el O_2 inhibe la polimerización, es necesario desgasificar la mezcla de los monómeros por medio de vacío.

La polimerización del gel se llevó a cabo por métodos químicos, utilizando al persulfato de amonio como iniciador y a la amina cuaternario N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina o TEMED como catalizador de la reacción. Este proceso es exotérmico y si el calor generado es demasiado, las convecciones darán lugar a un gel inconsistente; para evitar esto debe ajustarse la cantidad iniciador-catalizador de tal modo que la polimerización ocurra entre 10-60 min.

Durante el fenómeno de polimerización, se forma un menisco, que puede causar una curva de distorsión en el patrón de bandas; para eliminarlo, se colocó una capa delgada de isopropanol, misma que ayuda a la impenetración del oxígeno. El gel suele prepararse inmediatamente antes de utilizarse (Towbin, H. *et al.*, 1979).

5.2.2.3. Sistema discontinuo de Amortiguadores.

El sistema discontinuo fue desarrollado inicialmente por Ornstein (1964) y Davis (1964) y es un método en donde se empleó un gel de poro grande no restrictivo, llamado gel preparador o gel superior, que se coloca sobre un gel separador o gel inferior. Cada gel se hace con amortiguadores diferentes y el amortiguador de la cámara también es distinto al de los geles.

En este sistema, la movilidad de las proteínas, es intermedia entre la movilidad de los iones del amortiguador en el gel superior (ion principal) y la movilidad de los iones del amortiguador en la cámara superior (ion trasero).

Cuando la electroforesis comienza, los iones y proteínas migran en el gel preparador. Las proteínas se concentran en una banda muy delgada, entre el ion principal y el ion trasero; hasta que alcanzan el gel separador.

Como resultado del sistema discontinuo, se obtiene una resolución de bandas más grande.

El sistema de Laemmli (1970) es una modificación de Ornstein y Davis, ya que es un sistema discontinuo en SDS. Su resolución es excelente, y es un método ampliamente usado en un sistema electroforético (Towbin, H. *et al.*, 1979).

5.2.2.4. Regulación de la Temperatura.

Es esencial mantener la temperatura constante durante la electroforesis (10°C), para evitar que las muestras se muevan más rápido en el centro del gel que a los lados. Para tener una regulación precisa de la temperatura, se debe contar con un sistema de enfriamiento, así como de circulación continua del amortiguador en la cámara.

5.2.3. Transferencia.

Una vez que las proteínas se han separado electroforéticamente, se transfieren a una matriz inmovilizadora, en este caso se utilizó una membrana de nitrocelulosa. Este proceso es altamente controlable y reproducible, así como sensible y

especifico. "Para tener óptimos resultados deben considerarse los siguientes puntos: Las macromoléculas deben transferirse eficientemente a la matriz; las macromoléculas deben unirse cuantitativamente a la matriz; los procesos de detección deben ser específicos y sensibles." (Bers, G. and Garfin, D., 1985).

5.2.3.1. Parámetros óptimos de transferencia.

5.2.3.1.1. Composición del amortiguador de transferencia.

La composición del amortiguador de transferencia depende del tipo de gel, la matriz inmovilizadora y la molécula que se desea transferir. El metanol en el amortiguador, se utiliza para impedir la turgencia del gel, ya que reduce el tamaño del poro y así restringe la transferencia de algunas moléculas; también aumenta la capacidad y afinidad de la nitrocelulosa por la proteína; y elimina el SDS de los complejos con las proteínas para favorecer la renaturalización de las mismas. (Bers, G., *et al*, 1985).

La reducción de la fuerza iónica del amortiguador, permite un aumento de voltaje, sin un aumento de temperatura muy grande. Consecuentemente una proteína de alto peso molecular, se puede transferir eficientemente en periodos cortos de tiempo.

5.2.3.1.2. Matriz Inmovilizadora.

La matriz más utilizada es la nitrocelulosa. Esta es producida al solubilizar HNO_3 -celulosa esterificada, en mezclas de solventes orgánicos

(éter-alcohol o Ac. acético-acetona). El diámetro promedio efectivo del poro de la membrana es de $0.45\mu\text{m}$, tiene una elevada capacidad de unión a las proteínas ($80\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y posee buenas características que le permiten una tinción adecuada (Gershoni, M.J., and Palade, E.G., 1983).

A un pH aproximado de 8, al cual se llevan a cabo la mayoría de las transferencias, el papel de nitrocelulosa está cargado negativamente como las proteínas. "Las interacciones entre las proteínas y la nitrocelulosa, no se han entendido claramente. Probablemente, los efectos hidrofóbicos juegan un papel importante en esta interacción". (Gershoni, M.J., and Palade, E.G., 1983).

Las proteínas de bajo peso molecular pueden perder afinidad por el papel de nitrocelulosa, y esto se traduce en una pérdida de ellas durante la transferencia. Para prevenir esto, se puede reducir el tamaño del poro ($0.2\mu\text{m}$).

Otro tipo de matrices que pueden emplearse son: papel de Diazobenciloximetil-celulosa (DBM), papel diazofenil tioeter (DPT), Nylon 66.

El hecho de que el exceso de proteínas pasa a través de la nitrocelulosa durante la transferencia se aprovecha para adsorber las proteínas en membranas de nitrocelulosa secuencialmente, lo que permite obtener múltiples réplicas de un gel.

5.2.4. Inmunodetección.

En el presente trabajo, se realizó una detección de los complejos Ag-Ac, después de la incubación con los sueros de animales protegidos, no protegidos, vacunados no desafiados y normales, por

medio de Ensayo Inmuno Enzimático, cuyos límites de sensibilidad van de 50-100 pg (Bers,G., and Garfin, D., 1985).

La enzima utilizada fue la peroxidasa, ya que es económica, muy estable y simple de usar; y el sustrato elegido fue 4-cloro-1-naftol, dando un producto de reacción de color violeta en las zonas de reacción.

5.2.5. Ventajas de la Inmunolectrotransferencia.

Los polipeptidos inaccesibles, se hacen accesibles; simplicidad y alta sensibilidad; los papeles de nitrocelulosa son de fácil manejo; la inmovilización de proteínas es accesible para hacer que reaccionen con varios ligandos; se utilizan pequeñas cantidades de reactivo al hacer la transferencia; los tiempos de proceso (incubación y lavado), pueden reducirse significativamente; se pueden hacer múltiples réplicas de un gel; una vez transferidas las proteínas a papel de nitrocelulosa, pueden almacenarse por varios años antes de su uso; puede usarse la misma proteína transferida para múltiples análisis sucesivos (Bers,G., and Garfin,D., 1985).

5.2.6. Aplicaciones de la Inmunolectrotransferencia.

Detección de bajos niveles de actividad enzimática con antisueros específicos; análisis complejo del suero; detección de reactividad cruzada de un antígeno; detección y mapeo de RNA y DNA asociado a proteínas; manifestación de suero patológico por autoanticuerpos; detección de secuencias específicas de DNA; mapeo de secuencias de

RNA en un genoma; purificación de anticuerpos; detección de antígenos tumorales en baja concentración en la superficie de la célula y membrana (Bers, G., and Garfin, D., 1985).

5.2.7. Preparación de reactivos.

(Todas las soluciones deben filtrarse).

1.-Solución de monómeros de acrilamida (30%T 2.7%
Bis).

Acrilamida.....30g
Bis.....0.8g
H₂O destilada hasta.....100ml.

2.- Amortiguador para el gel inferior 4X (1.5M
Tris-Cl pH 8.8).

Tris.....36.3g
H₂O destilada hasta200ml
Ajustar a pH 8.8 con HCl

3.- Amortiguador para el gel superior 4X (0.5M
Tris-Cl pH 6.8).

Tris.....3g
H₂O destilada hasta.....50ml

4.-Dodecilsulfato sódico 10%

SDS.....50g
H₂O destilada hasta.....500ml

5.- Persulfato de amonio 15%

Persulfato de amonio.....15mg
H₂O destilada hasta.....1ml

Preparar en el momento de usarse.

6.- Amortiguador para cubrir el gel superior (0.375 Tris-Cl pH 8.8, 0.1% SDS).

Tris (Sol.2).....25ml
SDS (Sol.4).....1ml
H₂O destilada hasta.....100ml

7.- Amortiguador para tratamiento del antígeno 2X
0.125M Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol,
10% 2-mercaptoetanol).

Tris (Sol.3).....2.5ml
SDS (Sol.4).....4ml
Glicerol.....2ml
EDTA (Tetrasódico).....7.4mg
Pironina.....2mg
2-mercaptoetanol.....0.1ml
H₂O destilada hasta.....10ml

8.- Amortiguador de la cámara electroforética
0.025M Tris pH 8.3, 0.192M glicina, 0.1% SDS).

Tris.....15g
Glicina.....72g
SDS (Sol. 4).....40ml
H₂O destilada hasta.....5lts.

9.- Solución de teñido.

Azul de Coomassie R-250.....2g
H₂O destilada hasta.....200ml

10.- Solución para destefir

Ac. Acético.....10ml
H₂O destilada hasta.....100ml

GRAFICAS COMPLEMENTARIAS

GRAFICAS COMPLEMENTARIAS

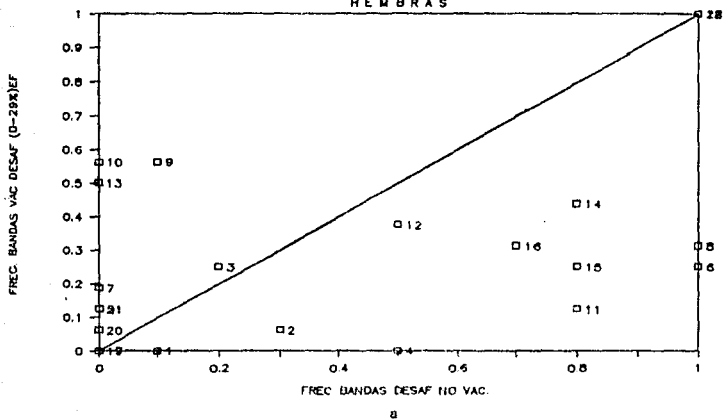
Las Figs. 32a,33a,34a y 35a muestran el inmuno-plot de la frecuencia de reconocimiento de bandas antigénicas de hembras vacunadas-desafiadas contra hembras desafiadas-no vacunadas, para los distintos rangos de eficiencia, observándose que con la vacuna se induce el reconocimiento de bandas antigénicas diferentes al que se induce con el desafío.

En las Figs. 36a,37a,38a,39a y 40a se presentan las gráficas correspondientes para los machos, obteniéndose un comportamiento similar al de las hembras. Como puede observarse en ambos sexos, no existe ninguna banda con alta frecuencia de reconocimiento asociada a altas eficiencias. Nótese que para las hembras no se obtuvieron eficiencias del 100% en comparación con los machos.

Las Figs. 32b,33b,34b y 35b, muestran los inmuno-plots de la frecuencia de reconocimiento de bandas antigénicas en hembras vacunadas-desafiadas contra vacunadas-no desafiadas para diferentes rangos de eficiencia, en las Figs. 36b,37b,38b,39b y 40b se muestran las mismas gráficas para machos. En ambos casos, es posible apreciar que existe una mayor frecuencia de reconocimiento de bandas en animales vacunados-desafiados que en vacunados-no desafiados, lo que implica que con dos estímulos antigénicos se obtiene una mayor frecuencia de reconocimiento.

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS

HEMBRAS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF

HEMBRAS

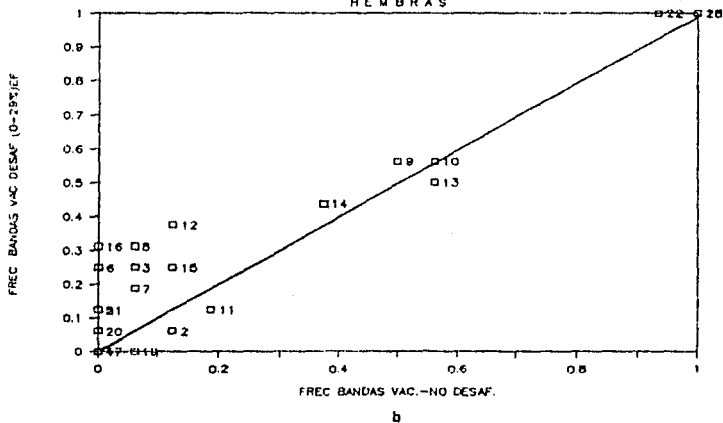
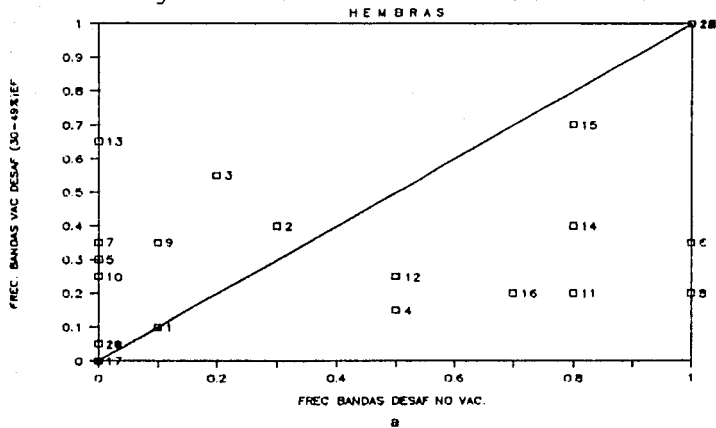


fig. 32

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF

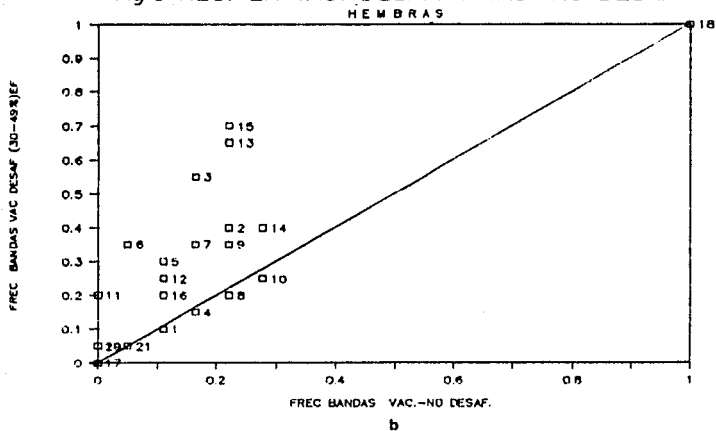
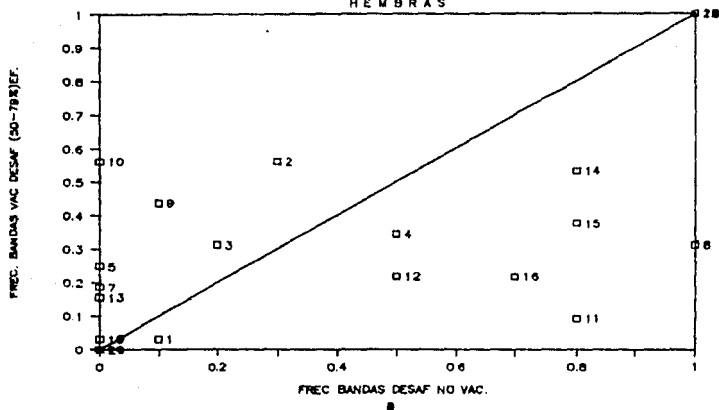


fig. 33

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS
HEMBRAS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF
HEMBRAS

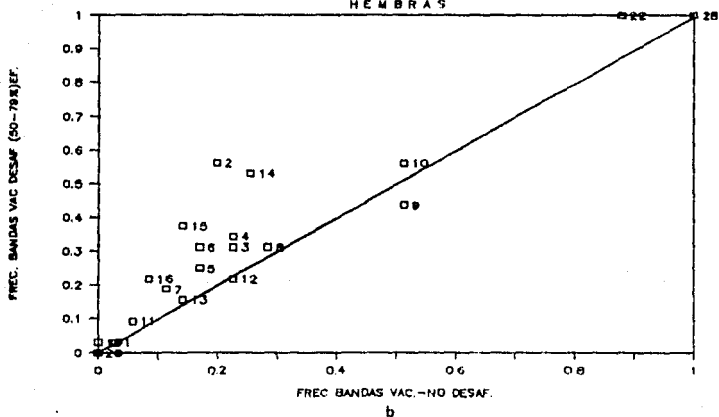
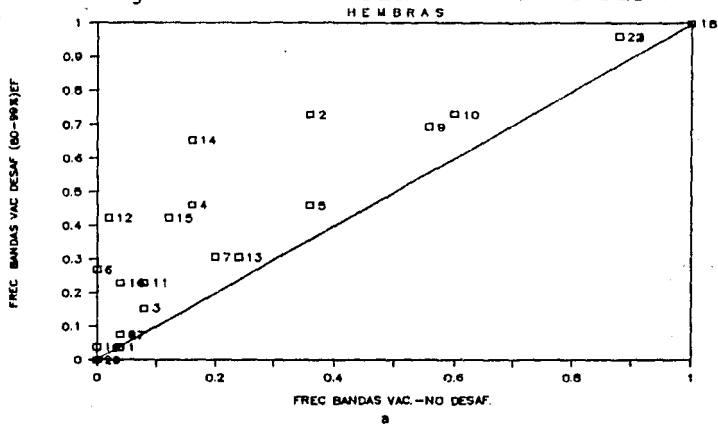


fig. 34

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS

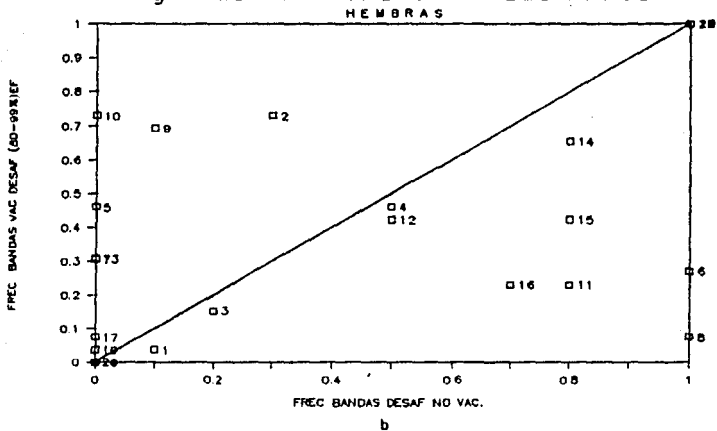
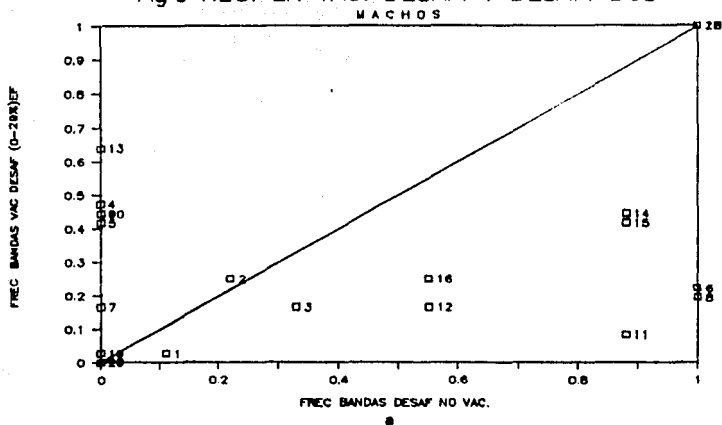


fig. 35

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF

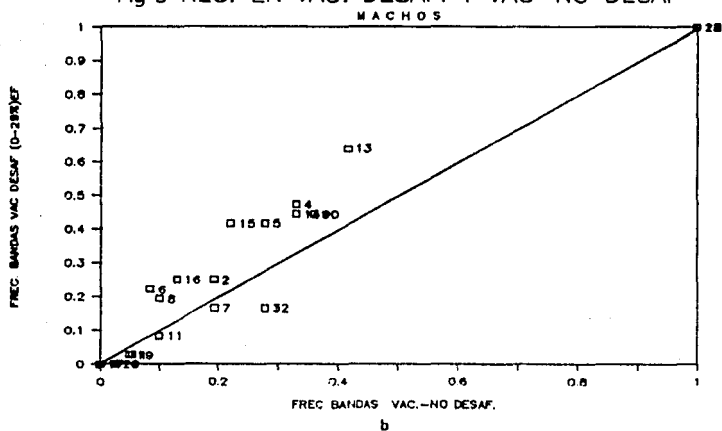
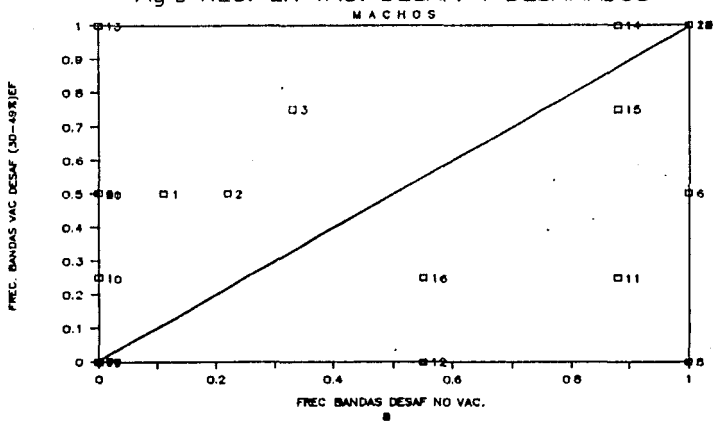
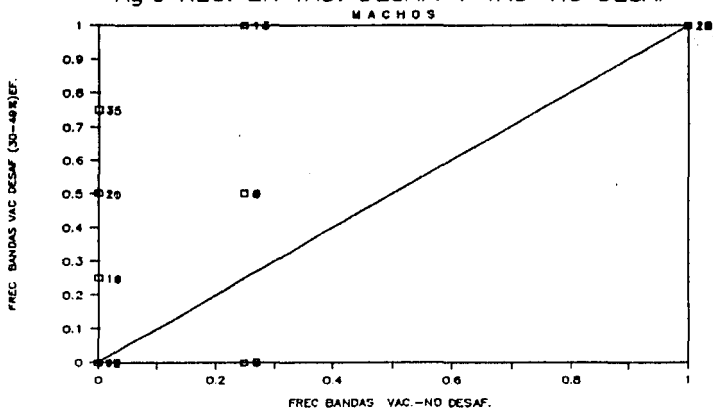


fig. 36

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS



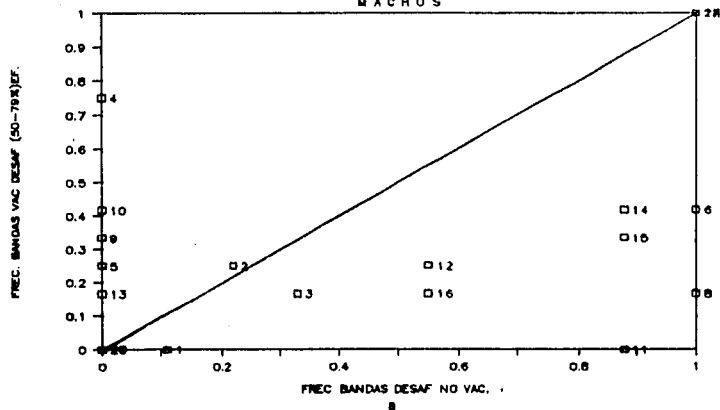
Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF



b
fig. 37

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS

MACHOS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF

MACHOS

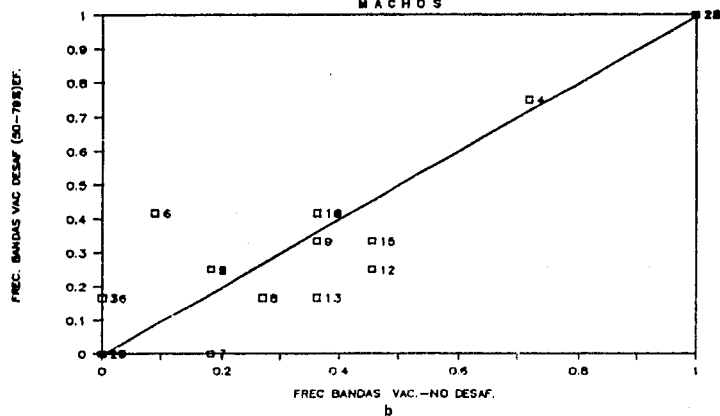
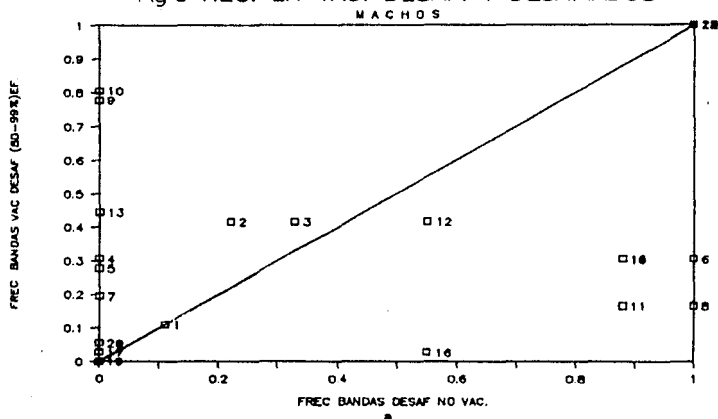


fig. 38

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF

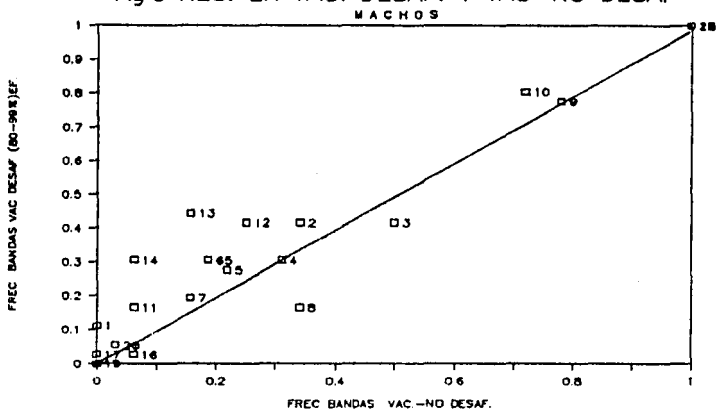
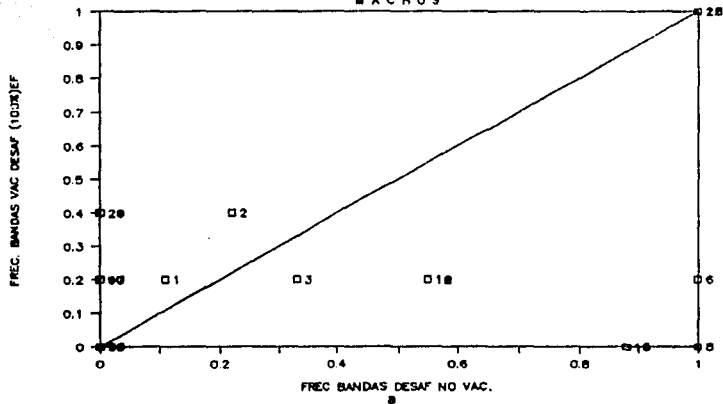


fig. 39

Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y DESAFIADOS

MACHOS



Ag's REC. EN VAC. DESAF. Y VAC-NO DESAF

MACHOS

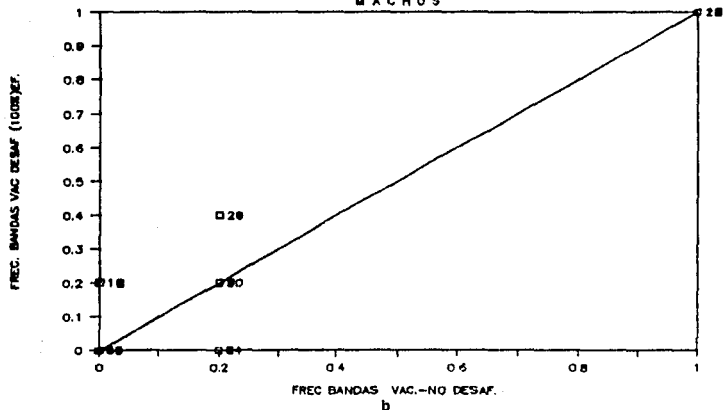


fig.40

ANEXO

Lista de reactivos utilizados en este trabajo:

Reactivo	Marca
Acrilamida	Bio-Rad
Anti-inmunoglobulina de ratón biotinilada	Amersham
Azul de Coomasie	Bio-Rad
Bis	Bio-Rad
BSA	Sigma
Estreptoavidina-peroxidasa	Amersham
Glicerina	Sigma
EDTA	Baker
Hidróxido de aluminio	Baker
Mercaptoetanol	Bio-Rad
O-fenilendiamina	Sigma
Persulfato de amonio	Bio-Rad
Reactivo de Fenol Folin-Diocalteu	Sigma
SDS	Bio-Rad
TEMED	Bio-Rad
Tween 80	Sigma

BIBLIOGRAFIA

1. Alt, Z. (1978). Pathological changes in the lymphoreticular tissues of Swiss mice infected with *Schinococcus granulosis* cyst. *Z. Parasitenkd.* 58: 47-54.
2. Aluja, A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Lacleite, J. P., Larralde, C., Madrazo & Velázquez V., Willms, K. (1987). *Cisticercosis. Fondo de cultura económica*, México, D.F. 1a. Ed.
3. Annon, J. M., Kohler, P. and Eckert, J. (1981). Cytotoxicity of *Schinococcus granulosis* cyst fluid in vitro. *Z. Parasitenkd.* 65: 79-88.
4. Auriault, C., Joseph, P., Dessaint, J. P. and Capron, A. (1980). Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by *Schistosoma* larvae proteases. *Immunology Letters*. 2: 135-139.
5. Barrett, J. T. (1983). *Inmunología*. Tr. por Nueva Editorial. Ed. Interamericana. México. 4a. Ed. pp 202-203.
6. Barriga, O. O. (1980). Responses of B-cells to mitogens and antigen in mice receiving isogenic splenocytes from animals treated with *Trichinella* extract. *J. Parasitol.* 66: 730-734.
7. Bers, O. and Garlin, O. (1983). Protein and Nuclear Acid Blotting and Immunobiochemical Detection. *BioTechniques*. 3(4): 276-2.

8. Bhattacharyya, G. K. and Johnson, R. A. (1977). Statistical Concepts and Methods. John Wiley & Sons, USA. pp 456.
9. Blair, L. S. and Campbell, W. C. (1976). The rat (*Rattus norvegicus*) as a Laboratory Host for the Metacestodes of *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology*. 62(1): 163-164.
10. Bloom, B. R. (1974). Games Parasites Play: How Parasites Evade Immune Surveillance. *Nature*. 279(3): 21-26.
11. Brooks, D. R. (1979). Testing The Context and Extent of Host-Parasite Coevolution. *Syst. Zool.* 28: 299-307.
12. Brown, A. R., Crandall, R. B. and Crandall, C. A. (1976). Increased IgG catabolism as a possible factor in the immunosuppression produced in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *J. Parasitol.* 62: 169-171.
13. Castro, G. A., Malone, C. and Smith, S. (1980). Systemic anti-inflammatory effect associated with enteric trichinellosis in the rat. *J. Parasitol.* 66: 407-412.
14. Chernin, J. (1977). Aspects of the Humoral Response of Laboratory White Mice Infected with the Metacestodes of *Taenia crassiceps*. *Journal of Helminthology*. 51: 137-142.
15. Damian, R. T. (1979). Molecular mimicry in biological adaptation. In Host-Parasite Interfaces. B.B. Nickol (ed.), pp 103-126. Academic Press, New York.

16. Darwin, C. (1982). El Origen de las Especies: Tr. por Ed. Grijalbo. Ed. Bruguera. Barcelona. 2a. Ed. pp.114.
17. Dorais, F. J. and Esch, G. W. (1969). Growth Rate of Two *Taenia crassiceps* Strains. *Experimental Parasitology*. 25: 395-398.
18. Dunn, S. D. (1980). Effects of the Modifications of Transfer Buffer Composition and the Renaturation of Proteins in Gels on the Recognition of Proteins on Western Blots by Monoclonal Antibodies. *Analytical Biochemistry*. 157: 144-153.
19. Escobedo, F., Gonzalez, G., Revuelta, F. and Ruben, M. (1982). Surgical Treatment of Cerebral Cysticercosis. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán, eds.). pp 201-206. Academic Press, New York.
20. Espinoza, B., Flisser, A., Plancarte, A. and Larralde, C. (1982). Immunodiagnosis of Human Cysticercosis: ELISA and Immunoelectrophoresis. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán, eds.). pp 163-170. Academic Press, New York.
21. Flisser, A. (1980). The Immunology of Human Cysticercosis. In *Molecules, cells and parasites in Immunology*. (C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz and M. Sela, eds.). pp. 125-147. Academic Press, New

York.

22. Flisser, A. (1982). Immune Response of the Host. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán, eds.). pp. 611-617. Academic Press, New York.
23. Flisser, A., Pérez, R. and Larralde, C. (1979). The Immunology of Human and Animal Cysticercosis: A Review. *Bull. WHO.* 57: 839-856.
24. Flisser, A., Rivera, L., Trueba, J., Espinoza, B., Yakoleff, V., Sierra, A. and Larralde, C. (1982a). Immunology of Human Neurocysticercosis. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán, eds.). pp. 549-565. Academic Press, New York.
25. Flisser, A., Avidan, Y., Laler, S., Mintz, D. and Ongay, H. (1980). Efecto de Agentes Físicos y Químicos sobre la Viabilidad del Cisticerco de la *Taenia solium*. *Salud Pública Mex.* 28: 551-555.
26. Flisser, A., Espinoza, B., Tovar, A., Plancarte, A. and Correa, D. (1980). Host-Parasite Relationship in Cysticercosis: Immunologic Study in different Compartments of the Host. *Vet. Parasitol.* 20: 95-102.
27. Flisser, A. and Larralde, C. (1980). Cysticercosis. *Inmunodiagnosis of Parasitic Diseases.* 1: 109-161.

28. Freeman, R. S. (1962). Studies on the Biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40: 969-990.
29. Freeman, R. S., Fallis, A. M., Shea, M., Maberley, A. L. and Walters, J. (1973). Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda): Part II. The Parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22(4): 493-495.
30. Gemmell, M. A. and Lawson, J. R. (1982). Ovine Cysticercosis: An Epidemiological Model for the Cysticercosis II. Host Immunity and Regulation of the Parasite Population. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp. 647-659 Academic Press, New York.
31. Gerson, J. M. and Falade, G. E. (1983). Protein Blotting. Principles and Applications. *Analytical Biochemistry*. 131: 1-15.
32. Good, A. M., Siebert, A. E. Jr., Robbins, P. and Zaun, S. (1982). Modulation of the Host Immune Response by Larvae of *Taenia crassiceps*. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 593-609. Academic Press, New York.
33. Groll, E. V. (1982). Chemotherapy of Human Cysticercosis with Fraziquantel. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A.

- Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltran, eds.). pp. 207-218. Academic Press, New York.
34. Quesdon, J. L., Ternynck, T. and Avrameas, S. (1979). The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27(8): 1131-1139.
35. Hammerberg, B., Dongler, C. and Williams, J. F. (1980). *Taenia taeniaeformis*: Chemical composition of parasite factor affecting coagulation and complement cascades. *J. Parasitol.* 66: 569-576.
36. Hanna, R. E. (1980). *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Exp. Parasitol.* 50: 155-170.
37. Holmes, J. C. (1983). Evolutionary relationships Between Parasitic Helminths and their Hosts. In *Coevolution*. (D.J. Futuyama and M. Slatkin, eds.). pp 161-185. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
38. Jarrett, E. and Bazin, H. (1974). Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature*. 251: 613-614.
39. Kroeze, W. K. and Freeman, R. S. (1982). *Taenia crassiceps*: Fate of Cysticerci Following Ingestion by the Mouse. *Experimental Parasitology*. 54: 425-431.

40. Larralde, C. (1970). Informe sobre la Efectividad de la Vacuna BCG en la Prevención de la Tuberculosis Humana. *Rev. Lat-Am. Microbiol.* 18: 3-6.
41. Larralde, C., Flisser, A. and Pérez, R. (1982). Vaccination against Cysticercosis: Perspectives on the Immunological Prevention of Human Disease. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 675-684. Academic Press, New York.
42. Larralde, C. (1980). Taeniasis-Cysticercosis and Public Health. *Bull. WHO.* pp 1-5.
43. Larralde, C., Lacleste, J. P., Owen, C. S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Scutito, E., Contreras, L., Arzate, J., Díaz, M. L., Govezensky, T., Montoya, R. M. and Goodsaid, F. (1980). Reliable Serology of *Taenia solium* Cysticercosis with Antigens from Cyst Vesicular fluid: ELISA and Hemagglutination Tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(5): 965-973.
44. Lawrence, B. R. and Pester, F. R. N. (1967). Adaptation of a Filarial Worm, *Brugia pateri* to a New Mosquito Host, *Aedes taeniorhynchus*. *J. Helminth.* 41: 365-392.
45. Lawson, E. J. and Lloyd, S. (1982). Passive Immunization in Cysticercosis: Characterization of Antibodies Concerned. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F.

Beltrán, eds.), pp 539-547. Academic Press, New York.

46. Lovry, D. H., Rosenberg, N. I., Farr, H. L. and Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
47. Mazingue, C. D., Camus, D., Dessaint, J. P., Capron, M. and Capron, A. (1980). *In vitro* and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 63: 178-189.
48. Méndez, I. (1981). Modelos mixtos y aleatorios en el diseño y análisis de experimentos. *Serie Azul: Monografías*. Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas. UNAM. 4 (31).
49. Miller, K. L., Good, A. H. and Mitchell, R. I. (1978). Immunodepression in *Taenia crassiceps* Infections: Restoration of the *in vitro* Response to Sheep Erythrocytes by Activated Peritoneal Cells. *Infection and Immunity*. 22(2): 365-370.
50. Mitchell, G. F. (1979). Responses to Infection with Metazoan and Protozoan Parasites in Mice. *Adv. Immunol.* 28: 451-511.
51. Mitchell, G. F. (1982). Genetic Variation in Resistance of Mice to *Taenia taeniasiformis*: Analysis of Host-Protective Immunity and Immune Evasion. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms,

- J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 575-584. Academic Press, New York.
52. Mitchell, G. F. and Handman, E. (1977). Studies on immune responses to larval cestodes in mice: a simple mechanism of non-specific immunosuppression in *Mesocostoides corli* infected mice. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 55: 615-622.
 53. Mitchell, G. F., Rajasckariah, O. R. and Rickard, M. D. (1980). A Mechanism to Account for Mouse Strain Variation in Resistance to the Larval Cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Immunology*. 39: 481-488.
 54. Musoke, A. J. and Williams, J. F. (1970). Immunological Response of the Rat to Infection with *Taenia taeniaeformis*: Protective Antibody Response to Implanted Parasites. *International Journal of Parasitology*. 6: 265-269.
 55. Nieto, D. (1948). Diagnóstico de la Cisticercosis del Sistema Nervioso. *Prensa Med. Mex.* 13: 226-230.
 56. Nieto, D. (1982). Historical Knowns on Cysticercosis. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 1-7. Academic Press, New York.
 57. Ogilvie, B. M. (1974). Antigenic variation in the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. In *Parasites in the immunized Host: Mechanisms of Survival*. pp

81-90. CIBA Foundation Symp. No. 25.

58. Ottesen, E. A. and Poindexter, R. V. (1980). Modulation of the host response in human schistosomiasis. II Humoral factors which inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 592-597.
59. Oviedo, A. M. (1980). Mecanismos de Evasión de la Respuesta Inmune en Enfermedades Parasitarias. México. TESIS. Fac. Química. Univ. Nal. Aut. Méx.
60. Novack, M. (1976). Gonadectomy and Growth of *Taenia crassiceps* (Cestoda) Cysticerci in mice. *Experientia*. 32: 1529-1530.
61. Price, P. W. (1970). General Concepts on the Evolutionary Biology of Parasites. *Evolution*. 31: 405-420.
62. Price, P. W. (1980). Evolutionary Biology of Parasites. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. (1,2,4,8).
63. Reddington, J. J., Stewart, G. L., Kramar, G. W., Kramar, M. A. (1968). The effects of host sex and hormones on *Trichinella spiralis* in the mouse. *J. Parasitol.* 67(4): 548-555.
64. Reyes, E. and Beltrán, P. (1967). Cysticercosis Intracraniana. *Rev. Med. Hosp. Gral.* 30: 317-348.

65. Rickard, M. D. (1974). Hypothesis for the longterm survival of *Taenia pusiformis* cystocerci in rabbits. *Z. Parasitenkd.* 44: 203-209.
66. Rickard, M. D. (1982). Immunization against Infection with Larval taeniid Cestodes using Oncospheral Antigens. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 633-645. Academic Press, New York.
67. Rickard, M. D. (1980). Molecular Vaccines against Parasites. *Parasitology today, Australian supplement.* pp 511-513.
68. Rivera, L. (1980). Correlación Clínico-Immunológica en Pacientes con Neurocisticercosis. TESIS. Facultad de Medicina. División de Estudios Superiores. Univ. Nal. Aut. Méx.
69. Rodríguez, J. y Moleaga, E. (1982). Neuroradiology of Human Cysticercosis. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán, eds.). pp 139-162. Academic Press, New York.
70. Sally, C. J., Chau, J. and Freeman, R. S. (1970). Intra-peritoneal Passage of *Taenia crassiceps* in Rats. *Journal of Parasitology.* 62(5): 837-839.

71. SAS Institute Inc. (1980). SAS Introductory Guide for Personal Computers, Version 6 Edition. North Carolina.
72. Sealey, M. and Ortiz, L. (1982). Cellular Immunity in Cysticercosis: A Review. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltran, eds.). pp 565-573. Academic Press, New York.
73. Searle, S. R. (1971). Linear Models. John Wiley & Sons USA.
74. Siebert, A. E. Jr., Good, A. H. and Simmons, J. E. (1978). Kinetics of Primary and Secondary Infection with *Taenia crassiceps* Metacestodes (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: Cyclophyllidae). *International Journal of Parasitology*. 8: 39-43.
75. Siebert, A. E. Jr. and Good, A. H. (1979). *Taenia crassiceps*: Effect of Normal and Immune Serum on Metacestodes *in vitro*. *Experimental Parasitology*. 48: 164-174.
76. Smith, M. V. and Kusel, J. R. (1979). The acquisition of antigens in the intercellular substance of mouse skin by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Clin. Exp. Immunol.* 36: 430-435.
77. Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. (1967). Statistical Methods. The Iowa State University Press Ames, Iowa, U.S.A. 6a. Ed. (4,10,11,12).

78. Soulsby, E. J. L. and Lloyd, S. (1982). Passive Immunization in Cysticercosis: Characterization of Antibodies Concerned. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán, eds.). pp 539-548. Academic Press, New York.
79. Tashva, B. and Dessev, G. (1983). Artifacts in Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis due to 2-mercaptoethanol. *Analytical Biochemistry*. 129: 98-102.
80. Toy, J., Lara, R., Velasco, O y Gutierrez, M. (1985). *Parasitología Médica*. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. 2a. Ed.
81. Threadgold, L. T. and Dunn, J. (1984). *Taenia crassiceps*: Basic Mechanisms of Endocytosis in the Cysticercus. *Experimental Parasitology*. 58: 263-269.
82. Timms, P., de Vos, A. J., Dalgleish, R. J. (1980). Bovine Babesiosis. *Parasitology Today, Australian Supplement*. pp 511.
83. Tovbin, H. T., Stachelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4350-4354.

84. Trujillo, V. M., González, D., Sandoval, M. E., Villanueva, G. and Orozco, R. (1982). Chemotherapy of Human Cysticercosis using Metrifonate. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 219-226. Academic Press, New York.
85. Urquhart, G. M. (1982). Modulation of the Host Response. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). pp 585-591. Academic Press, New York.
86. Velasco, M. (1982). Medical treatment of neurocysticercosis. In *Cysticercosis of the central nervous system* (E. Palacios, J. Rodríguez, J. Taveras, eds.). pp 149-154. Charles, C. Thomas, Springfield.
87. Wakelin, D. (1978). Genetic Control of Susceptibility and Resistance to Parasitic Infection. *Adv. Parasitol.* 16: 219-308.
88. Wayne, D. W. (1977). Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa. México. pp 155-237. 1a. Ed.
89. Wikerhauser, T. (1982). Immunization of Bovines against *Taenia saginata* Infection. In *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán,

- eds.). pp 661-663. Academic Press, New York.
90. Williams, J. F., Shearer, A. M., Ravitch, M. M. (1961).
Differences in susceptibility of rat strains to
experimental infection with *Taenia taeniaeformis*.
J. Parasitol. 67(4):540-547.
91. Williams, J. F., Engelkirk, P. O. and Lindsay, C. M.
(1962). Mechanisms of Immunity in Rodent
Cysticercosis. In *Cysticercosis. Present state of
knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms,
J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F.
Beltrán, eds.). pp 621-631. Academic Press, New
York.
92. Williams, J. F. and Sandeman, R. M. (1962). Antigens of
Taeniid Cestodes. In *Cysticercosis. Present state
of knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K.
Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and
F. Beltrán, eds.). pp 525-537. Academic Press, New
York.
93. Woodhouse, E. (1979). Seroepidemiología de la
Cisticercosis Humana en la República Mexicana.
TESIS. Facultad de Ciencias. Univ. Nat. Aut. Méx.
94. Zenleno, O. H. (1962). A Classification of Human
Cysticercosis. In *Cysticercosis. Present state of
knowledge and perspectives*. (A. Flisser, K. Willms,
J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F.
Beltrán, eds.). pp 107-126. Academic Press, New
York.