

18
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RECIBIDA EN LA FACULTAD DE QUIMICA
EL 27 DE ABRIL DE 1988

**INSTALACION PARASITARIA SIN
INMUNOSUPRESION: INFECCION SIMULTANEA
CON VARIETADES ORF E HYG DEL CISTICERCO
DE Taenia Crassiceps EN RATON**



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

ENRIQUE DELGADO CESAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1988



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

	Página
DEDICATORIAS.....	i
RESUMEN.....	5
INDICE DE TABLAS, FOTOGRAFÍAS Y DIAGRAMAS.....	6
PROLOGO.....	7
INTRODUCCION.....	9

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL.

I. INFECCION SIMULTANEA

A) Parásitos.....	13
B) Animales de experimentación.....	13
C) Inmunización.....	14
D) Infección.....	14
E) Recolección de muestras.....	15

II. EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE

A) Introducción.....	16
B) Método.....	17

III. ESTUDIO DE LA INMUNOSUPRESION

A) Introducción.....	18
B) Animales de experimentación.....	19
C) Antígeno.....	19
D) Desafío-Infección.....	19
E) Recolección de sueros.....	20
F) Estudio de la concentración del antígeno.....	21
G) Descripción del método.....	21

RESULTADOS

I. INFECCION SIMULTANEA.....	23
II. TECNICA DE ELISA.....	27
III. HEMAGLUTINACION DIRECTA.....	28

DISCUSION

A. INFECCION SIMULTANEA.....	32
B. RESPUESTA INMUNE.....	35
C. INMUNOSUPRESION.....	38
CONCLUSIONES.....	39

APENDICES

APENDICE 1. Mecanismos parasitarios de evasión de la respuesta inmune.....	45
APENDICE 2. <u>Jugosa crassigera</u>	59
APENDICE 3. Reactivos.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	67

RESUMEN

RESUMEN.

INSTALACION PARASITARIA SIN INMUNOSUPRESION: INFECCION SIMULTANEA CON VARIEDADES DRF E HYG DEL CISTICERCO DE Taenia crassiceps EN RATON.

Hay dos variedades del cisticerco de Taenia crassiceps (HYG y DRF) con diferentes velocidades de crecimiento en el raton. Si el establecimiento y reproducción del parásito es resultado de una inmunosupresión, entonces, en una infección simultánea en ratón Balb/c, la especie más virulenta (de ritmo de crecimiento mayor) aumentará el crecimiento de la variedad lenta.

Los resultados indican que las velocidades de crecimiento de los parásitos son independientes entre si. Concluimos que no existe tal inmunosupresión o que ésta es sumamente específica. Ratificamos esta conclusión midiendo la respuesta contra glóbulos rojos de carnero en animales infectados.

INDICE DE TABLAS, FOTOGRAFÍAS Y DIAGRAMAS

DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1 Diseño Experimental.....	12
-------------------------------------	----

TABLAS

TABLA 1 Grupos de Experimentación.....	14
TABLA 2 Secuencia de Desafío.....	20
TABLA 3 Resultados del Experimento de Infección Simultánea.....	23
TABLA 4 Resultados del Exp. de Infección Sim.....	24
TABLA 5 Resultados del Exp. de Infección Sim.....	25
TABLA 6 Resultados del Exp. de Infección Sim.....	26
TABLA 7 Resultados del Exp. de Infección Simultánea.....	32
TABLA 8 Experimento de Infección Simultánea.....	33
TABLA 9 Experimento de Infección Simultánea.....	34
TABLA 10 Experimento de Infección Simultánea.....	35
TABLA 11 Experimento de Infección Simultánea.....	35
TABLA 12 Evaluación de la Respuesta Inmune.....	36
TABLA 13 Evaluación de la Respuesta Inmune.....	37
TABLA 14 Experimento de Inmunosupresión.....	39

GRAFICAS

GRAFICA 1 Resultados ELISA con Ag DRF en Hembras.....entre 27 y 28.	
GRAFICA 2 Resultados ELISA con Ag DRF en Machosentre 27 y 28.	
GRAFICA 3 Resultados ELISA con Ag HYG en Hembrasentre 27 y 28.	
GRAFICA 4 Resultados ELISA con Ag HYG en Machosentre 27 y 28.	
GRAFICA 5 Títulos de Hemaglutinación para Hembras.....	30
GRAFICA 6 Títulos de Hemaglutinación para Machos.....	30

FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍAS 1 y 2 Ratones infectados.....	15
FOTOGRAFIA 3 Medición del volumen.....	16
FOTOGRAFIA 4 Estudio de la Concentración de G.R.....	29
FOTOGRAFIA 5.1. Diferencias entre DRF e HYG.....	62

PROLOGO

PROLOGO.

Esta tesis no es fruto de un esfuerzo personal e independiente, sino es el resultado de la colaboración desinteresada de muchas personas e instituciones.

Por ello deseo expresar mi admiración y agradecimiento al Dr. Carlos Larralde por aceptar ser mi asesor. Constituyó un ejemplo de seriedad científica, dedicación y responsabilidad por el quehacer académico.

A Ciro Lomeli, pues su apoyo fué decisivo en la elaboración de este trabajo, proporcionándome los animales de experimentación y su apoyo durante la huelga.

A Tzipe Govezensky, Rosa María Montoya y al resto del departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su colaboración.

A Alejandro Padilla, por el tiempo que utilizó para ayudarme a lo largo de mis experimentos.

Quiero hacer mención además del apoyo financiero aportado por Química Hoechst de México, CONACYT y la Secretaría de Salud en apoyo de este y otros proyectos de investigación.

Sería injustificable no mencionar al Movimiento Estudiantil que obedeció al deseo de realizar un cambio sustancial en una sociedad anquilosada, aletargada. Haya estado o no de acuerdo con los mecanismos utilizados por el CEU, el Movimiento

miento Estudiantil significó el despertar de un largo y tedioso conformismo al que la juventud mexicana se había mal acostumbrado.

Por último agradezco de manera especial a la Facultad de Química las vivencias, la preparación profesional y el apoyo recibido durante estos semestres, en reconocimiento por ser la mejor escuela de Química del país.

Los resultados preliminares de ésta tesis fueron presentados en el VII Congreso Nacional de Inmunología verificado en la ciudad de Zacatecas en 1987.

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

"Una verdad científica no triunfa porque se logra convencer a sus opositores y hacer que vean las cosas con claridad, sino más bien porque los opositores acaban por morir y surge una nueva generación que se familiarizará con la nueva verdad."

Max Planck.

La cisticercosis constituye un grave problema de salud y económico. Es una zoonosis que afecta a los cerdos y al humano. En el humano se manifiesta en su forma mas grave como neurocisticercosis, aunque también existen las infecciones en tejido muscular y en el ojo. En los cerdos, la cisticercosis muscular afecta la porcicultura y propicia la transmisión del ciclo de vida del parásito.

Cuando la forma larvaria del cestodo *Taenia solium*, conocido como cisticerco, se instala en el hospedero, pareciera - que el sistema inmune no reaccionara ante la invasión, pues no existe una inmunidad efectiva.

Muchos parásitos se instalan en los hospedadores sin que aparentemente sean obstaculizados por el sistema inmune. Los mecanismos de este fenómeno no son bien conocidos en todos los casos.

Sin embargo, se han descrito más de veinte mecanismos distintos que contribuyen a la instalación del parásito en el hospedero (apéndice 1), los que funcionalmente pueden resumirse en tres tipos: La pérdida aparente de inmunogenicidad, la evasión de la respuesta inmune y la resistencia contra

la respuesta inmune del hospedero.

Entre los mecanismos de pérdida aparente de inmunogenicidad están la inmunosupresión, el mimetismo (en que el parásito se recubre con proteínas del hospedador), similitud antigénica con proteínas del organismo infectado, etc.

Serían de evasión los factores anticomplementarios y las sustancias antiinflamatorias, los antígenos solubles, etc.

Por último, entre los mecanismos de resistencia están las características del parásito que le confieren una resistencia a los ataques inmunes del hospedador.

En la enfermedad humana se han detectado anticuerpos específicos anti-cisticerco (Larralde, C. et al. 1986), lo que indica que el parásito sí es reconocido como inmunógeno. Por ello es plausible suponer que al menos en forma general, la respuesta inmune del hospedero es contrarrestada por el parásito.

Para investigar mejor los factores involucrados en el establecimiento del parásito, es conveniente tener un modelo de más fácil manipulación que el que representa el cerdo o el humano. Este modelo existe.

El ratón es infectado por un cístodo conocido como *Iaegia crassiceps* en su forma larvaria, o cisticerco. El parásito se aloja en la cavidad peritoneal principalmente, lo que hace posible su fácil detección e inclusive su conteo.

Y, también se ha visto que el cisticerco de *I. crassiceps* tiene cross antigénico con el correspondiente de *Iaegia* son

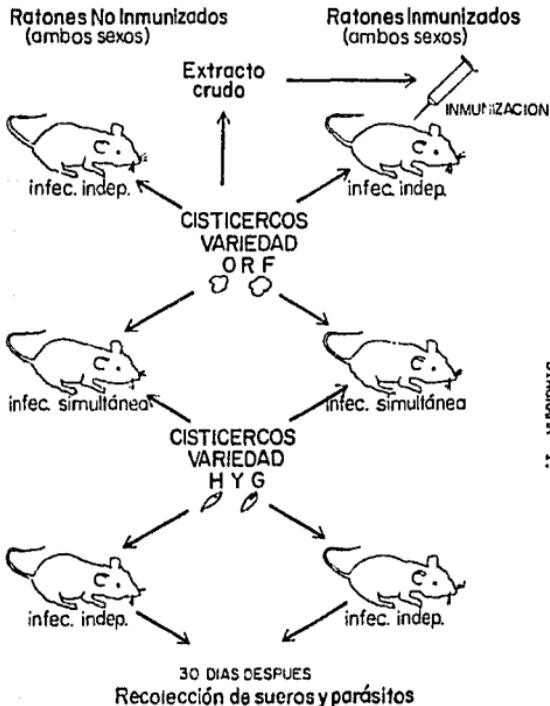
lium (Apéndice 2).

Además, existen dos variedades en el cisticerco murino, denominadas DRF e HYG, cuyas velocidades de crecimiento son diferentes, DRF se reproduce más rápido que HYG (Apéndice 2). Esta diferencia sugirió que la variedad más rápida debía tener una propiedad biológica diferente, que le permitiera crecer con mayor facilidad. Si esta propiedad se tratara de la capacidad de producir un factor supresor de la inmunidad, entonces en una infección simultánea, la variedad DRF le "abriría las puertas" al parásito más lento, observándose entonces que la multiplicación de HYG aumentaría.

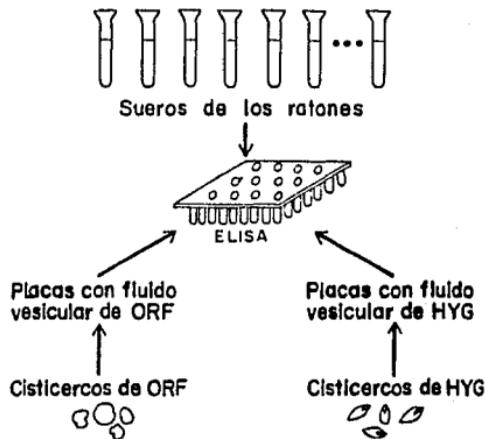
Es materia de esta tesis mostrar observaciones al respecto de: a) la velocidad de crecimiento de cada uno de los parásitos (DRF e HYG) en el ratón en forma independiente; b) el efecto de una de las cepas sobre la otra en una infección simultánea y; c) establecer si el mecanismo de instalación parasitaria se acompaña de inmunosupresión.

MATERIAL Y MÉTODOS.

INFECCION SIMULTANEA



RESPUESTA INMUNE



INMUNOSUPRESION

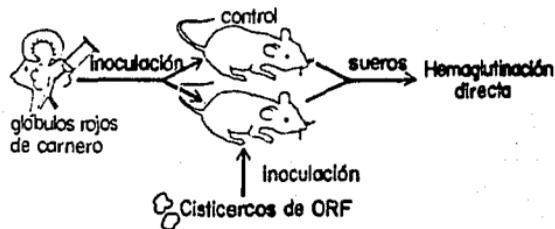


DIAGRAMA 1.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se elaboró un proyecto experimental dividido en dos partes. En la primera se estudió el efecto que tenía una infección simultánea sobre la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas por separado, utilizándose como parámetro el número de parásitos totales a un tiempo dado, y la respuesta inmune por anticuerpos contra las dos variedades. En la segunda parte, se hizo un seguimiento de la respuesta por anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero, a lo largo de una infección con la variedad ORF, como medida de una inmunosupresión. (Ver diagrama 1.).

I. INFECCION SIMULTANEA

A) PARASITOS

Las formas larvarias de *Laelia crassiceps* que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de lotes de ORF e HYB mantenidos por inoculación seriada en ratones Balb/c, hembras. Las larvas se extrajeron de los ratones donadores y se lavaron tres veces con PBS, para posteriormente utilizarse en la inoculación.

B) ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c, proporcionados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se escogió esta cepa por resultar la más susceptible de acuerdo a estudios previos (ver apéndice 2.)

Se requirieron 120 ratones: 60 hembras y 60 machos, que se dividieron en dos grupos: El grupo inmunizado (INM.) al que se le aplicó un extracto crudo de la variedad ORF y que estaba constituido de 30 ratones de cada sexo; el resto fue el grupo no inmunizado. En la siguiente tabla se resume el diseño experimental.

PARASITOS	RATONES			
	HEMBRAS		MACHOS	
	INM.	NO INM.	INM.	NO INM.
ORF				
HYG				
ORF + HYG				

TABLA 1. Grupos de experimentación para el experimento de Infección Simultánea.

C) INMUNIZACION

La inmunización se realizó mediante la inyección de un extracto crudo de la variedad ORF, preparándolo en PBS y ajustando la concentración de proteínas a 500ug/ml.

Los ratones fueron inoculados con 0.2 ml del extracto (100ug por ratón) adicionado con adyuvante (0.033mg de Al(OH)₃ por mg. de proteína) y por vía intraperitoneal.

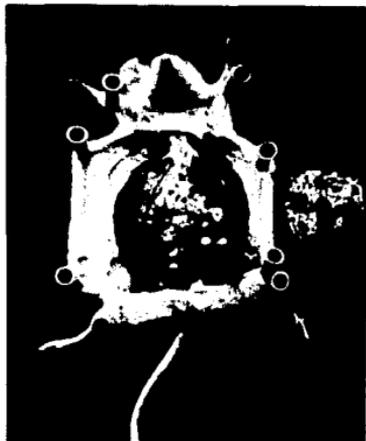
D) INFECCION.

Tanto a los ratones inmunizados como a los no inmunizados se les inocularon por vía intraperitoneal 10 ó 20 parásitos menores a 2mm de diámetro sin gemaciones, elegidos al azar. Se inyectaron 10 parásitos por animal cuando se trataba de la infección independiente en 0.2ml de PBS. En la infección

simultánea se inyectaron 10 cisticercos de cada cepa, en 0.2 ml de amortiguador de fosfatos (PBS). Los ratones se colocaron en jaulas en grupos de 10 y fueron alimentados con Purina Rat Chow y agua ad libitum.

E) RECOLECCION DE MUESTRAS.

Al término de 30 días de infección los ratones se anestesiaron con éter y se sangraron a través del plexo retroorbital. Se separaron y colectaron los sueros. Luego los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se abrió la cavidad abdominal para retirar a los parásitos, asegurándose que no hubiera cisticercos en el tejido subcutáneo. Se lavó con PBS la cavidad peritoneal y los órganos internos extraídos, con el fin de tener la totalidad de los parásitos. Se revisó el resto de las cavidades adyacentes (torácica y en su caso, escrotal). (Fotografías 1 y 2).



Fotografías 1 y 2. Ratón Balb/c infectado con *I. crassiceps*. Se muestra el aspecto del animal parasitado, y la forma en que se obtienen los parásitos de la cavidad peritoneal.

Se contó el número total de parásitos y el volumen ocupado por estos, para cada ratón (Fotografía 3). En la infección mixta se separaron y contaron por separado las dos variedades.



Fotografía 3. Se observan los parásitos dentro de un tubo graduado, utilizado para medir el volumen ocupado por los cisticercos dentro de cada animal infectado.

II. EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE.

A) INTRODUCCION

La cuantificación de anticuerpos se realizó por el método de ELISA. Esta es una técnica muy sensible cuyo fundamento es la interacción Ag-Ac específica, evidenciada por un segundo anticuerpo acoplado a una enzima que ulteriormente reacciona con un sustrato adecuado para la obtención de color (Mohammed, I.N. et al, 1984) la reacción se mide espectrofotométricamente, siendo la absorbancia aproximadamente proporcional a la concentración de anticuerpos.

En este ELISA se utilizó gamma-globulina anti-IgG de ratón acoplada a biotina y conjugado estreptoavidina-peroxidasa, placas para ELISA Dynatech Immulon y un detector-lector BEHRING ELISA-PROCESSOR M.

B) METODO.*

B.1 Sensibilización de las placas.

Se utilizaron dos grupos de placas, uno sensibilizado con líquido vesicular de cisticerco (LVC) variedad Orf y el otro con LVC variedad Hyg.

Para ello se agregó a cada pozo 1 ug de proteína contenida en 100ul en PBS. Se incubaron una hora a temperatura ambiente y a 4°C durante toda la noche. En forma paralela, como control de unión inespecífica, se incubaron placas con albúmina sérica bovina (ASB) al 1%.

B.2 Bloqueo de las placas.

Para minimizar que las proteínas séricas de ratón se unieran a las placas, se bloquearon con ASB al 1% en PBS, adicionando 100ul a cada pozo, y manteniendo las placas a temperatura ambiente durante dos horas.

B.3 Reacción inmunológica.

Se agregaron los sueros diluidos 1/20 en PBS-ASB (0.1%), por duplicado a las placas, colocando 100ul en cada pozo e incubando a 37°C durante dos horas .

*NOTA: Después de cada paso entre B.1 y B.4, las placas se sometieron a lavados por triplicado con PBS-Tween al 1.0%, para eliminar los excesos de reactivo.

B.4 Segundo anticuerpo.

Para revelar la reacción Ag-Ac entre el antígeno parasitario y los anticuerpos séricos del ratón se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a biotina, Se agregaron 100ul de una dilución 1/2000 de anti-IgG de ratón biotinilada a cada pozo y se incubó durante una hora a 37°C.

B.5 Adición del conjugado.

Se adicionó el conjugado diluido 1/2000 de Estreptoavidina-peroxidasa a cada pozo (100ul) y se incubó durante una hora a 37°C.

B.6 Sustrato.

Se adicionaron 100ul/pozo del sustrato de orto-fenilendiamina (0.04% en amortiguador de citrato-fosfato pH=5 y 50ul de peróxido de hidrógeno al 30%), y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

B.7 Detención de la reacción.

Para detener la reacción enzimática se agregaron 50ul de ácido sulfúrico 4N a cada pozo.

B.8 Lectura.

Inmediatamente después del paso anterior se procedió a la lectura a 492nm, en el lector para placas de ELISA de la casa Behring.

III. ESTUDIO DE LA INMUNOSUPRESION.

A) INTRODUCCION.

Para evaluar el fenómeno de inmunosupresión se eligió un método que reflejara el estado global de la respuesta inmune

del hospedador. Para este fin es convención elegir la cuantificación de anticuerpos contra un estímulo de glóbulos rojos de carnero, por medio de la hemaglutinación directa.

B) ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se emplearon 70 ratones divididos en siete grupos, cada uno de los cuales estaba integrado de 5 hembras y 5 machos. El primer grupo se denominó grupo control, el cual no sería infectado con *I. scassiceps*, y a los 6 restantes se les llamó grupos de experimentación. Los animales se dividieron por sexo y se colocaron en jaulas con diez ratones cada una: para diferenciar un grupo de otro, la mitad de los ratones en cada caja se marcaron mediante una perforación en la oreja. Se alojaron en el bioterio del Instituto y se alimentaron con Furina Rat Chow y agua ad libitum.

C) ANTIGENO

Se utilizaron glóbulos rojos de carnero, recién extraídos con aguja estéril y suspendidos en solución de Alsever estéril. Se lavaron tres veces en PBS y se preparó una suspensión al 10% en solución salina amortiguada. Antes de ser inoculada a los animales se combinó esta suspensión con otra de Al(OH)₃ (1 mg/ml) en proporción 1:2 para conseguir una concentración final de eritrocitos del 5%.

D) DESAFIO-INFECCION

Los ratones de experimentación se inyectaron con 10 parásitos

de la variedad ORF, y los ratones control permanecieron sin ser infectados. Los grupos de experimentación se dividieron en 6 grupos de 10 ratones, 5 hembras y 5 machos. Divididos de esta forma se fueron desafiando sucesivamente los 7 grupos con glóbulos rojos de carnero, de acuerdo al siguiente esquema.

DIA POST-INFECCION						
GRUPO	0	6	12	20	24	30
CONTROL	x					
GRUPO 1	x					
GRUPO 2		x				
GRUPO 3			x			
GRUPO 4				x		
GRUPO 5					x	
GRUPO 6						x

TABLA 2. Secuencia de desafío con eritrocitos de carnero en el estudio de la inmunosupresión.

El desafío se realizó inyectando 0.2 ml. de la suspensión de glóbulos rojos al 5 % (con adyuvante de hidróxido de aluminio) por tres vías hasta completar la dosis: cojinete plantar, intramuscular e intraperitoneal.

E) RECOLECCION DE SUEROS

Dos semanas después de la inoculación con los eritrocitos, los ratones se anestesiaron con éter, y se sangraron por el plexo retroorbital, recolectándose la sangre para la separación posterior del suero. Estos sueros se almacenaron en refrigeración a 4°C para ser procesados todos juntos 24 h después de recolectar los correspondientes al último grupo.

E) ESTUDIO DE LA CONCENTRACION DEL ANTIGENO

Con el fin de obtener una sensibilidad adecuada, y observar la especificidad del método se realizó un estudio previo para determinar la concentración adecuada del antígeno para ser utilizado en la prueba de hemaglutinación. Se probaron dos concentraciones del antígeno, 2% y 5%. Como suero positivo se utilizó el suero de uno de los ratones inmunizados y no infectados, y como control negativo el suero de un ratón no inmunizado y no infectado*.

F) DESCRIPCION DEL METODO

Los sueros obtenidos de los ratones control y de los ratones del grupo experimental se sometieron a calentamiento a 56°C durante 30 min, para inactivar al complemento. Luego se diluyeron con solución salina amortiguada con fosfatos (dilución 1:2). En una placa de microaglutinación con 12 pozos de largo por 8 de ancho, se hicieron diluciones seriadas con el mismo amortiguador hasta tener en el último pozo (12) una dilución de 1:2048. El volumen final en cada pozo fué de 25 ul. Una vez preparadas las diluciones de todos los sueros, se agregó a cada pozo 25 ul. de la suspensión de eritrocitos de carnero al 2%. Se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente y se leyeron los resultados, considerándose positiva la prueba con aglutinación total.

*Inmunizado significa haber sido inoculado con los antígenos eritrocitarios, e infectado es haber sido inyectado con los cisticercos de *I. glausiceps*.

RESULTADOS

1. INFECCION SIMULTANEA

A continuación se presentan los resultados de la infección simultánea, incluyendo el número de parásitos de cada variedad por ratón y por grupo, la media y la desviación estándar (Tablas 3 a 6).

RATONES NO INMUNIZADOS

grupo:	HEMBRAS parasito: ORF	HEMBRAS HYG	HEMBRAS ORF e HYG
	NUMERO	NUMERO	NUMERO O H
1	72	10	12B 0
2	26	21	51 5
3	101	0	36 5
4	113	0	0 0
5	100	3	70 10
6	117	12	22 1
7	0	0	76 6
8	22	20	4 0
9	5	0	56 0
10	0	0	37 0
M	55.6	6.6	48 2.7
D.E	49.56	8.55	37.89 3.5

TABLA 3. Resultados del experimento de infección simultánea. Se muestra el número de parásitos por ratón. La media (M) y desviación estándar (D.E.) corresponden al número de cisticercos. La última columna está referida a la infección simultánea por lo que se anota el número de parásitos de cada variedad, ORF (O) e. HYG (H), en cada uno de los ratones.

RATONES NO INMUNIZADOS

sexo: MACHOS	MACHOS	MACHOS	
parasito: ORF	HYG	ORF	HYG
No.	No.	No.	H
1 34	3	5	4
2 5	5	10	0
3 29	14	3	3
4 11	0	12	5
5 8	5	12	3
6 17	5	11	1
7 13	1	13	2
8 2	6	24	3
9 17	8	13	2
10 41	10	10	1
M 17.7	5.7	11.3	2.4
D.E. 12.94	4.16	5.57	1.50

TABLA 4. Resultados del experimento de infección simultánea. Se muestra el número de parásitos por ratón la media (M) y desviación estandar (D.E.) son del número de cisticercos. La última columna corresponde a la infección simultánea por lo que se anota el número de parásitos de cada variedad, ORF (O) e HYG (H), de cada uno de los ratones.

Como podrá observarse en las tablas, el número de parásitos recuperados en las hembras es casi siempre mayor que el recuperado de los machos, esto es consistente para cualquier variedad del cisticercos, e independiente del estado inmune del hospedador.

RATONES INMUNIZADOS

sexo: HEMBRAS	HEMBRAS	HEMBRAS	
parásito: DRF	HYG	DRF	e HYG
No.	No.	No.	
		O	H
1 293	0	163	57
2 382	33	216	40
3 336	22	323	33
4 17	14	137	17
5 292	9	88	14
6 276	32	75	3
7 210	10	197	18
8 448	42	63	15
9 122	68	258	23
10 156	6	121	10
M 253.2	21.6	164.1	23.0
D.E. 128.81	21.7	80.58	16.05

TABLA 5. Resultados del experimento de infección simultánea. Se muestra el número de parásitos por ratón. La media (M) y la desviación estándar son del número de cisticercos. La última columna corresponde a la infección simultánea por lo que se anota el número de parásitos de cada variedad, DRF (O) e HYG (H), de cada uno de los ratones.

RATONES INMUNIZADOS

sexo: MACHOS	MACHOS	MACHOS	
parásito: DRF	HYG	DRF e HYG	
No.	No.	No.	
		O	H
1 36	0	10	2
2 40	7	5	3
3 0	0	11	2
4 23	2	12	2
5 26	0	5	2
6 60	19	9	1
7 8	17	4	0
8 22	0	4	0
9 4	0	16	3
10 42	5	4	3
M 26.3	5	8	1.8
D.E. 18.65	7.28	4.21	1.13

TABLA 6. Resultados del experimento de infección simultánea. Se muestra el número de parásitos por ratón la media (M) y desviación estandar (D.E.) son del número de parásitos. La última columna corresponde a la infección simultánea por lo que se anota el número de parásitos de cada variedad, DRF(O) e HYG(H), en cada uno de los ratones.

Las cepas de *Taenia crassiceps* tienen velocidades distintas de reproducción, diferencias que se mantienen en la infección simultánea. La variedad más rápida es DRF, esto puede ser constatado observando que en la mayoría de los casos se presentan mayor número de parásitos de esta variedad, en promedio de 3-15 veces más que HYG. Es decir, que la velocidad de reproducción de las 2 cepas es independiente entre si.

Al observarse el número de parásitos encontrados en los ratones inmunizados y no inmunizados se notará la diferencia que existe entre estos dos grupos, destacamos el hecho de que en los ratones inmunizados el número de parásitos es mayor. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas, como se verá más adelante.

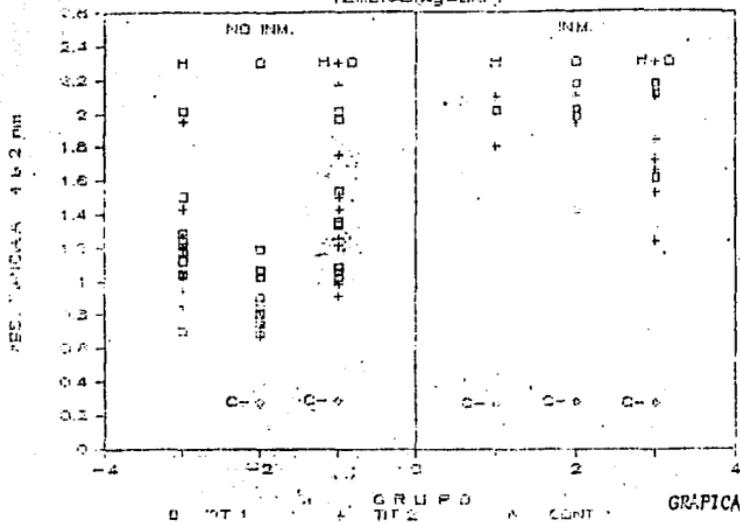
II. TECNICA DE ELISA

En la obtención de los resultados de ELISA, en el momento de correr todas las muestras, simultáneamente se analizaron sueros negativos, y algunos controles de adhesión inespecífica, con albúmina en lugar de antígeno. Con los datos de absorbancia que proporciona el lector automatizado, se construyeron las gráficas, donde se observan las diferencias en la concentración de anticuerpos anti-cisticercos entre los ratones de experimentación y los ratones que no fueron infectados, tanto del grupo inmunizado, como del grupo no inmunizado. Para la construcción de estas gráficas se restaron a todos los valores obtenidos, el valor de la extinción de los pozos con albúmina, que corresponden a los controles de adherencia inespecífica, para posteriormente poder comparar los resultados entre el grupo control y el grupo de experimentación. En las siguientes páginas se muestran estos resultados.

Se utilizaron dos grupos de placas (ver metodología), por lo que aparece indicado en la parte superior de la gráfica el antígeno utilizado en la sensibilización de cada una.

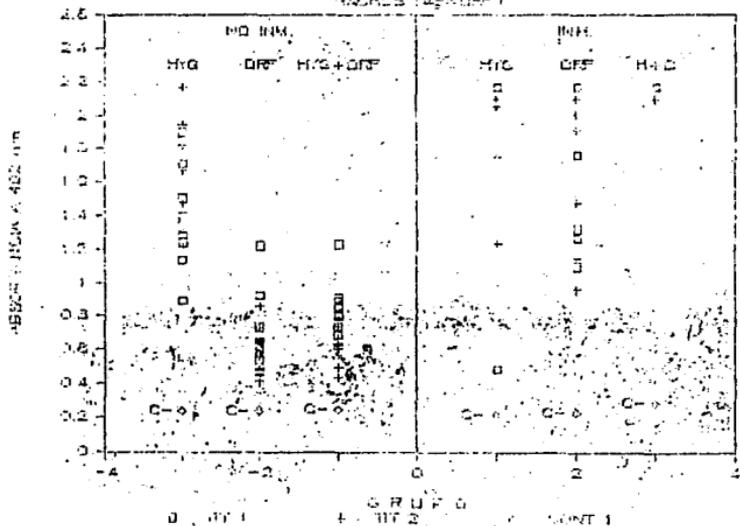
RESPUESTA INMUNE

(ZMBRAS(Ag=DRP))



RESPUESTA INMUNE

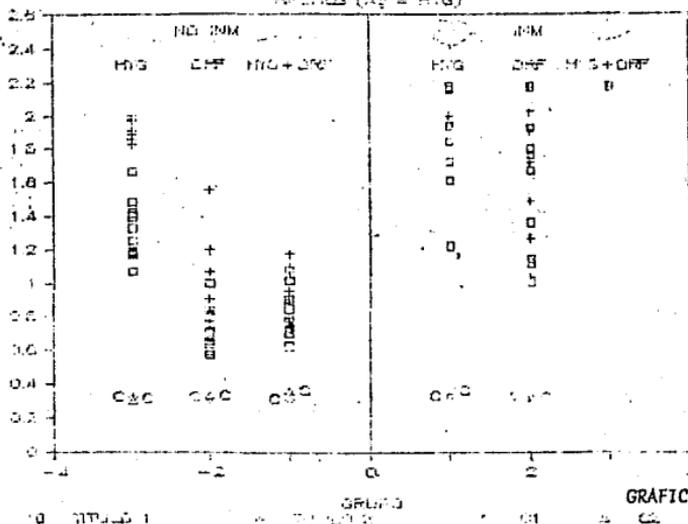
(ZMBRAS(Ag=DRP))



RESPUESTA INMUNE

HEMERAS (wg = H.G.)

4-PROTEINICA A 482nm

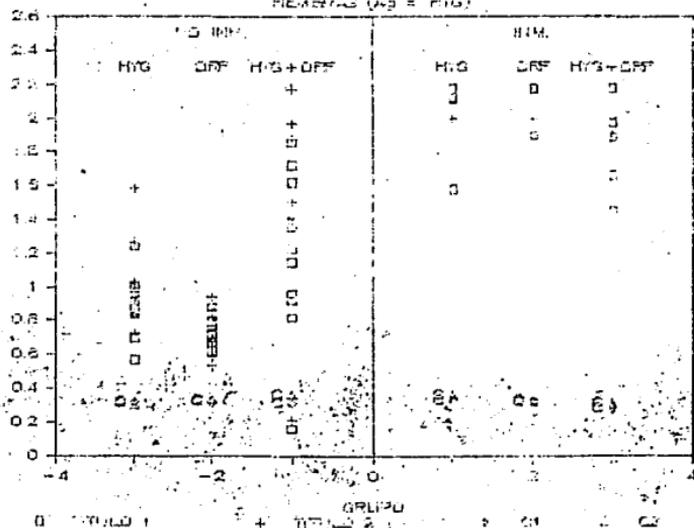


GRAFICA 4

RESPUESTA INMUNE

HEMERAS (wg = HVG)

4-PROTEINICA A 482nm



GRAFICA 3

Las gráficas están divididas en dos sectores, el primero corresponde al grupo no inmunizado y el segundo al grupo inmunizado. La determinación se hizo por duplicado y en la parte superior de cada gráfica se señala el sexo del animal.

Como puede observarse en todas las gráficas, el título de anticuerpos, medido como la absorbancia a 492nm., siempre es mayor en los animales parasitados que en los ratones libres de infección.

Los ratones infectados con la variedad HYG poseen anticuerpos contra el extracto de ORF, como puede observarse en las gráficas que presentan los resultados del título de anticuerpos contra el antígeno de ORF (Gráficas 1 y 2).

III. HEMAGLUTINACION DIRECTA

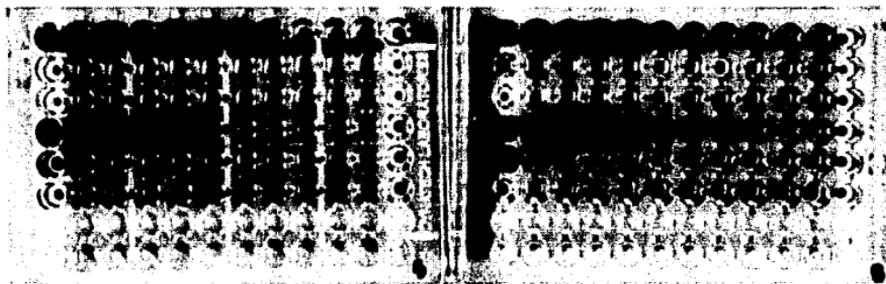
Se consideró como el título de anticuerpos a la máxima dilución donde se presentó aglutinación total de los eritrocitos de carnero. Para poder comparar los datos de los ratones infectados con los no infectados, se recurrió a la elaboración de gráficas que permitieran la apreciación objetiva de las diferencias entre los títulos de los dos grupos a comparar.

Para ello se graficó el inverso de la dilución máxima donde se presentó aglutinación, contra el tiempo de infección, lo que nos permitiría detectar inmunosupresión, en caso de existir, o simplemente las diferencias en el título de los dos grupos.

Es conveniente recordar, que estas determinaciones se hicieron por triplicado, realizándose un estudio previo, donde se

determinó la concentración adecuada de antígeno. (ver fotografía 4.)

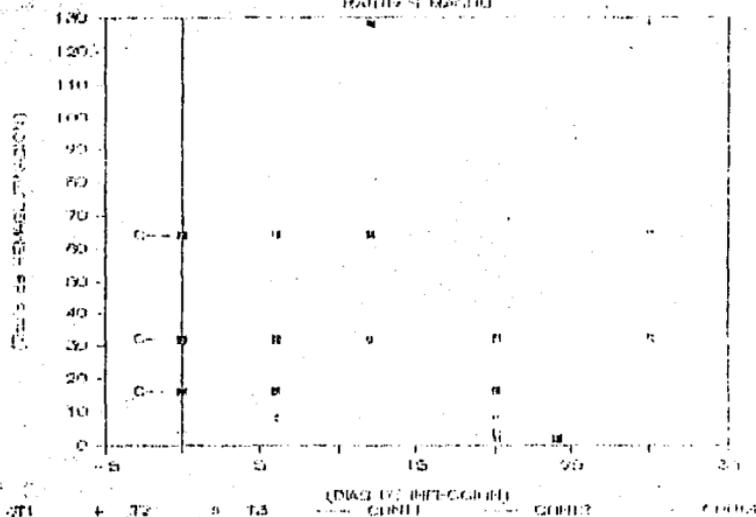
EFFECTO DE LA CONCENTRACION
DE LOS GLOBULOS ROJOS DE CARNERO.



Fotografía 4. Estudio de la concentración óptima de eritrocitos de carnero para el estudio de la inmunosupresión.

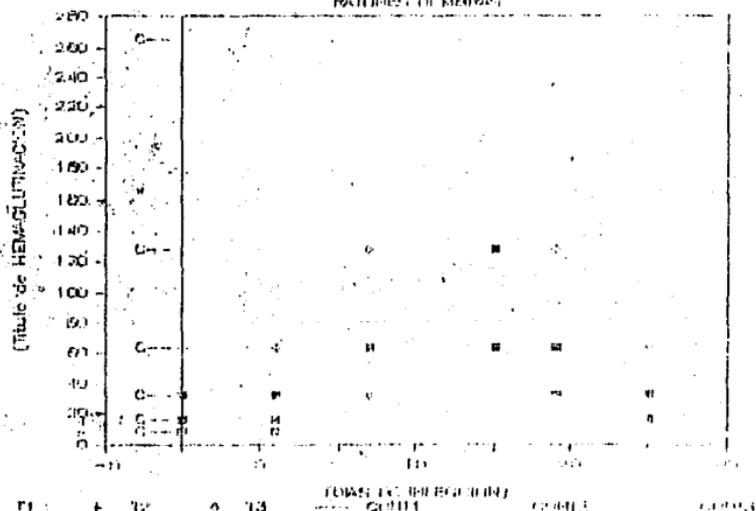
Obsérvese que el título de los animales de experimentación, o infectados, consistentemente entra dentro del intervalo que fijan los títulos de los animales no infectados -control-.

ESTUDIO DE INMUNOSUPRESION MADRES HERMANAS



GRAFICA 6

ESTUDIO DE INMUNOSUPRESION MADRES HERMANAS



GRAFICA 5

DISCUSSION

DISCUSION

A. INFECCION SIMULTANEA.

En la tabla 7. están reunidos los resultados del número de parásitos en la infección simultánea. Para el análisis estadístico se calcularon media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

Como se observa, la interpretación de estos datos implica una comparación: es decir, nos interesa conocer la existencia de diferencias entre varios grupos. Primero conocer el efecto que resulta de la infección simultánea -una de las variedades sobre la otra-. Segundo, si la inmunización previa con un

GRUPO	INMUNIZADOS		NO INMUNIZADOS		
	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	
PARASITO	M.	26.3	253.2	17.7	55.6
DRF	D.E.	18.65	128.81	12.94	49.56
	C.V.	0.70	0.50	0.73	0.89
	M.	5.0	21.6	5.7	6.6
HYG	D.E.	7.28	21.7	4.16	8.55
	C.V.	1.45	1.01	0.73	1.26
DRF EN	M.	8.0	164.1	11.3	48.0
INFECC.	D.E.	4.21	80.58	5.57	37.89
SIMULTA.	C.V.	0.52	0.49	0.49	0.78
HYG EN	M.	1.8	23.0	2.4	2.7
INFECC.	D.E.	1.13	16.05	1.5	3.5
SIMULTA.	C.V.	0.62	0.69	0.63	1.31

Tabla 7. Resultados del experimento de infección simultánea. Se muestran en el orden acostumbrado: Media (M.), Desviación Estándar (D.E.) y el Coeficiente de Variación (C.V.).

extracto de ORF es eficaz para que el sistema inmune controle un segundo desafío. Y por último, nos interesa saber si existen diferencias entre sexos. Amén de corroborar que la velocidad de crecimiento de las cepas es distinta.

Para realizar estas comparaciones se utilizó la prueba de t de Student de dos colas, considerándose significativa la diferencia a $p < 0.05$. El valor crítico de $t = 2.101$, con 18 grados de libertad. (Snedecor, G.W. y Cochran, W.G., 1968).

Las comparaciones de las muestras están incluidas en las tablas 8 a 10.

GRUPO COMPARADO	MACHOS		HEMBRAS	
	[t]	Signific.	[t]	Signific.
ORF vs. ORF*	1.436	N.S.	0.385	N.S.
HYG vs. HYG*	2.360	$p < 0.05$	1.330	N.S.
ORFINM vs. ORFINM*	3.020	$p < 0.001$	1.850	N.S.
HYGINM vs. HYGINM*	1.370	N.S.	0.164	N.S.

Tabla 8. Experimento de Infección simultánea. Comparación entre el grupo experimental (Infección simultánea) y el grupo control (Infección simple). * Indica infección simultánea.

De la comparación entre los grupos con infección simultánea contra los de infección simple se observa que salvo en dos grupos, ambos de los animales machos, no parece existir ninguna diferencia entre las muestras. En los grupos donde se detectó diferencia, ésta consiste en la disminución del nd-

mero de parásitos contados en la infección simultánea, en comparación con los parásitos esperados de acuerdo a la infección simple.

En cambio, cuando observamos las diferencias entre el grupo inmunizado y no inmunizado, en las hembras existe un efecto relevante, siendo nulo en los machos. En las hembras inmunizadas existe un claro aumento del número de parásitos esperados, en referencia al grupo no inmunizado. La variedad menos virulenta, HYG, parece no ser afectada significativamente por la inmunización previa.

SEXO:	MACHOS		HEMBRAS	
	[t]	Signific.	[t]	Signific.
GRUPO COMPARADO				
ORFINM vs. ORF	1.190	N.S.	4.520	p<0.001
HYGINM vs. HYG	0.260	N.S.	2.030	N.S.
ORF* vs. ORFINM*	1.490	N.S.	4.120	p<0.001
HYG* vs. HYGINM*	1.010	N.S.	3.900	p<0.01

Tabla 9. Experimento de Infección simultánea. Efecto de la inmunización sobre la infección con metacéstodos de *IAEDDIA CRASSICEPS*. *indica infección simultánea.

Por último, el efecto del sexo sobre la susceptibilidad a la infección es dramático, observándose que solo en animales inmunizados, infectados con la variedad HYG, éste efecto parece no existir.

TIPO DE PARASITO	MACHOS vs. HEMBRAS NO INMUNIZADOS		MACHOS vs. HEMBRAS INMUNIZADOS	
	[t]	Signific.	[t]	Signific
DRF	2.330	p<0.05	5.510	p<0.001
HYG	2.990	p<0.01	2.290	p<0.05
DRF*	3.030	p<0.01	6.110	p<0.001
HYG*	0.249	N.S.	4.160	p<0.001

Tabla 10. Experimento de Infección simultánea. Efecto del sexo sobre la susceptibilidad con metacístodos de *Taenia crassiceps*. Se compara el número de parásitos de cada variedad en machos y hembras. *indica infección simultánea.

En la tabla 11 se muestran las diferencias en virulencia que presentan ambas cepas, independientemente del sexo o estado inmune del hospedador.

GRUPO COMPARADO	SEXO: MACHOS		SEXO: HEMBRAS	
	[t]	Signific.	[t]	Signific
DRF vs. HYG	2.790	p<0.02	3.080	p<0.01
DRF* vs. HYG*	4.880	p<0.001	3.760	p<0.01
DRFINM vs. HYGINM	3.360	p<0.01	5.600	p<0.001
DRFINM* vs. HYGINM*	4.490	p<0.001	5.490	p<0.001

Tabla 11. Experimento de Infección simultánea. Diferencia en la virulencia de ambas cepas entre sí. * indica infección simultánea.

B. RESPUESTA INMUNE.

A continuación se presentan los resultados de la titulación de anticuerpos, por la técnica de ELISA, en los ratones del

experimento de infección simultánea. Se comparan con el grupo que no fué infectado al que llamamos grupo control. (Tablas 12 y 13).

PLACAS SENSIBILIZADAS CON: ORF

GRUPO EXPERIMENTAL	MEDIA	D.E.	VALOR DE t [t]	SIGNIFICANCIA
HEMBRAS:				
CONTROL	0.287	0.023		
ORF	0.812	0.084	19.06	p<0.001
HYG	1.218	0.319	9.20	p<0.001
SIMULTANEA	1.454	0.381	9.67	p<0.001
ORF INM.	1.977	0.186	28.51	p<0.001
HYG INM.	2.044	0.045	109.94	p<0.001
SIMUL. INM.	1.972	0.227	23.35	p<0.001
MACHOS:				
CONTROL	0.245	0.026		
ORF	0.632	0.172	7.03	p<0.001
HYG	1.496	0.278	14.16	p<0.001
SIMULTANEA	0.758	0.109	14.47	p<0.001
ORF INM.	1.776	0.454	10.64	p<0.001
HYG INM.	1.986	0.398	13.80	p<0.001
SIMUL. INM.	2.131	0.003	227.88	p<0.001

Tabla 12. Resultados del experimento de Evaluación de la respuesta inmune. Placas sensibilizadas con ORF. La media corresponde al promedio de la evaluación por duplicado de 10 ratones. Se anota la absorbancia a 492nm.

PLACAS SENSIBILIZADAS CON: HYG

GRUPO EXPERIMENTAL	MEDIA	D.E.	VALOR DE t [t]	SIGNIFICANCIA
HEMBRAS:				
CONTROL	0.322	0.023		
DRF	0.711	0.085	13.97	p<0.001
HYG	0.942	0.200	9.73	p<0.001
SIMULTANEA	1.541	0.353	10.89	p<0.001
DRF INM.	2.070	0.044	111.33	p<0.001
HYG INM.	2.049	0.093	57.00	p<0.001
SIMUL. INM.	1.994	0.141	37.00	p<0.001
MACHOS:				
CONTROL	0.318	0.008		
DRF	0.804	0.204	7.52	p<0.001
HYG	1.627	0.118	35.00	p<0.001
SIMULTANEA	0.859	0.127	13.44	p<0.001
DRF INM.	1.680	0.395	10.90	p<0.001
HYG INM.	1.957	0.161	32.15	p<0.001
SIMUL. INM.	2.173	0.092	63.52	p<0.001

Tabla 13. Resultados del experimento de Evaluación de la respuesta inmune. Placas sensibilizadas con HYG. La media corresponde al promedio de la evaluación por duplicado de 10 ratones. Se anota la absorbancia a 492nm.

Como podemos observar, la instalación de *Taenia crassiceps* en el ratón despierta una respuesta inmune humoral importante. El título de anticuerpos se incrementa significativamente en todos los casos con respecto a los ratones no infectados. La presencia de anticuerpos anti-extracto de HYG en ratones

infectados con la cepa ORF, y de anticuerpos anti-extracto de ORF en ratones infectados con HYG demuestran un claro cruce antigénico entre las dos variedades de *Taenia crassiceps* para el ratón.

Por otro lado, en las graficas observamos que la variedad HYG resulta más inmunogénica que ORF (resultados estadísticamente significativos, pero que no se presentan aquí).

C. INMUNOSUPRESION.

Para el análisis de estos resultados presentaremos aquí el promedio del inverso del título de 5 ratones. Cada determinación se hizo por triplicado.

Para hacer la comparación estadística de los resultados se utilizó nuevamente la prueba de t de Student de dos colas, ahora con 8 grados de libertad, considerándose significativa la diferencia a $p < 0.05$, siendo el valor crítico de $t = 2.306$.

El análisis se resume en la tabla 14.

Como puede observarse de las comparaciones, no hay inmunosupresión consistente en todos los casos, en las hembras que son las más susceptibles, se observa inmunosupresión en solo un caso, mientras que en machos en dos. Algo que se debe notar es que en los machos se presenta una potenciación de la respuesta inmune en dos casos específicos.

Debe notarse además, que la fluctuación alrededor del valor promedio debe ser tomada con reservas, pues la técnica de

hemaglutinación tal como se hizo no permite una resolución mayor que la mitad o el doble de concentración, pues las diluciones seriadas se hicieron en base dos (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, etc).

GRUPO (DÍAS)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	VALOR de [t]	SIGNIFICANCIA
HEMBRAS				
CONTROL (0)	82.19	60.97		
I (0)	22.39	12.16	2.15	N.S.
II (6)	21.86	13.11	7.54	p<0.001
III (12)	66.13	11.68	0.57	N.S.
IV (20)	38.4	57.24	1.17	N.S.
V (24)	61.86	15.82	0.72	N.S.
VI (30)	21.33	11.92	2.19	N.S.
MACHOS				
CONTROL (0)	28.79	9.69		
I (0)	39.73	23.33	0.97	N.S.
II (6)	27.73	14.67	0.13	N.S.
III (12)	91.73	31.64	4.25	p<0.005
IV (20)	8.53	11.53	3.00	p<0.025
V (24)	2.0	0.0	6.18	p<0.001
VI (30)	61.86	15.82	3.98	p<0.005

Tabla 14. Experimento de Inmunosupresión. Se presentan el promedio del inverso del título de 5 ratones, cada suero evaluado por triplicado, la desviación estándar y el valor absoluto de t (prueba de 2 colas) con t crítico= 2.306, y p<0.05, como significancia estadística.

CONCLUSIONES

La relación hospedador-parásito es afectada y modulada por

muchos factores, algunos de los cuales han surgido de manera natural a lo largo de este trabajo.

Aún cuando se controle el mayor número de variables conocidas -para observar el efecto de una variable de interés aislada-, es muy común encontrarse con otros factores no previstos que, incluso, llegan a ser más importantes, o de efecto más sobresaliente, de lo que esperábamos.

Esto en lugar de ser una frustración invita a una observación minuciosa de lo que nos ofrece el modelo.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos logrado detectar el comportamiento biológico de dos variedades de *I. crassiceps*, que lejos de ser semejante, ha mostrado que las dos cepas son diferentes, tal y como lo sugerían Dorais, Mount y otros investigadores (Dorais & Esch, op.cit.; Freeman, R.S., et al, op.cit.).

La mayor velocidad de crecimiento observada en la variedad ORF, con respecto a la variedad HYG nos habla de una profunda diferencia biológica que se refleja desde su morfología. No es aventurado sugerir que la variedad que durante más tiempo ha sido manipulada en el laboratorio (ORF), haya sufrido cambios (mutaciones?) que le permiten mantener la reproducción asexual a la que está sometida dentro de los roedores. Esta cepa no ha necesitado utilizar su capacidad de reproducción sexual y ha eliminado esta característica (Freeman, R.S. et al op.cit.).

Durante la infección simultánea no se observó ningún efecto de una cepa sobre la otra, por ello proponemos que la diferente capacidad reproductora no es debida a una regulación de la respuesta inmune del hospedador, en cambio sí debe constituir una cualidad biológica propia e intrínseca de cada variedad.

Es necesario insistir en que la infección simultánea de dos parásitos con diferencias palpables en cuanto a velocidad de crecimiento y morfología no perturba al sistema inmunológico del ratón, de tal suerte que permanece la capacidad de respuesta independiente a cada infección, es decir, que pueden ser reconocidos ambos tipos de parásito y enfrentados de manera independiente. Además, en este caso no se observa ni un efecto sinérgico para el hospedador ni antagónico entre las dos variedades sugiriendo que la relación que se establece es sólo entre parásito-hospedador.

La clara diferencia de susceptibilidad entre sexos es una llamada de atención para un estudio endocrinológico posterior. La mayor carga parasitaria que afecta a las hembras, probablemente dependa de características del hospedero, y no del parásito. Es interesante observar que la velocidad de crecimiento en el ratón de la cepa HYG es menos afectada que ORF, aunque la diferencia entre sexos se conserve. Probablemente la diferencia sea menos notable debido a que se aproxima a cero la cantidad de parásitos recuperados de esta variedad.

Por otro lado, la inoculación previa con extracto crudo de ORF no tiene un efecto inmunizante en el hospedador. Aunque hay observaciones que indican que si puede haber protección si la inmunización se realiza con la dosis adecuada.

A diferencia de la Dra. Good (Good, A.H. op.cit.), nosotros no detectamos que la inmunosupresión fuera el mecanismo por medio del cual el céstodo estudiado se instalara con éxito dentro del roedor, o bien existe una inmunosupresión específica, o por lo menos no es éste fenómeno el responsable de la diferente virulencia entre las cepas, tal y como lo demuestran nuestros estudios de Inmunosupresión.

El título elevado de anticuerpos contra los parásitos nos indica que si son reconocidos como extraños por el sistema inmune, lo que nos permite eliminar la falta de inmunogenicidad como mecanismo de evasión. Es interesante notar que pese a las diferencias morfológicas entre especies ambas tienen antígenos comunes. Una observación adicional es el hecho de que la variedad HYG parece ser más inmunogénica que ORF, es decir, tiene algunos antígenos que no comparte con ORF y que probablemente sean más importantes para la protección del hospedador, esto podría explicar parcialmente la diferente capacidad reproductiva, que es consistente con la observación de la disminución en el número de parásitos de ORF en la infección simultánea. Para saber si este antígeno o antígenos importantes en la protección están presentes en ORF, pero no en cantidad adecuada, se debe recurrir a una técnica que nos permita ver con mayor resolución los antígenos que nos inter-

resan, por ejemplo el Western Blot'.

Resumiendo, concluimos que

*LAS VARIEDADES ORF E HYG CRECEN DE MANERA INDEPENDIENTE EN UNA INFECCION SIMULTANEA.

*ORF E HYG POSEEN ANTIGENOS COMPARTIDOS.

*LA INFECCION POR Taenia crassiceps NO CURSA CON UNA INMUNOSUPRESION INESPECIFICA.

*LA PREVALENCIA DEL PARASITO OCURRE AUN EN PRESENCIA DE UNA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INTENSA.

*ENTRE HEMBRAS Y MACHOS SE OBSERVA UNA LIGERA DIFERENCIA EN LA CAPACIDAD DE RESPUESTA CONTRA GLOBULOS ROJOS DE CARNERO, DURANTE UNA INFECCION CON LA VARIEDAD ORF.

Ha surgido la necesidad de utilizar métodos con mayor resolución para detectar diferencias en la inmunogenicidad de las variedades, que puedan explicar probablemente la diferente virulencia, apareciendo diferentes para el sistema inmune del hospedero.

También queda latente la necesidad de estudiar la susceptibilidad a la infección dependiente del sexo del animal parasitado.

APENDICES

APENDICE 1.

MECANISMOS PARASITARIOS DE
EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE.

APENDICE 1.

MECANISMOS PARASITARIOS DE EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE. (1)

INTRODUCCION.

En la naturaleza se presentan innumerables ejemplos de interacción entre especies. Estos fenómenos no son sólo frecuentes, sino necesarios en muchos casos para que se mantenga el equilibrio natural.

El ser humano ha prestado atención a estos fenómenos no sólo por su afán de conocer "su" mundo y modificarlo, sino porque repetidamente se encuentra involucrado con organismos que en muchas ocasiones le causan daño.

A lo largo de esta revisión trataremos lo concerniente a la relación parásito-sistema inmune. Es pues conveniente introducir algunos conceptos:

Básicamente, el parasitismo es la asociación de organismos y la relación entre ellos. Existen diversas formas que van desde el comensalismo hasta la simbiosis. Esta clasificación depende del efecto que produce uno de los organismos sobre el otro.

En las parasitosis uno de los organismos vive a expensas del otro perjudicándolo. Lo llamamos parásito al que produce el daño y hospedador u hospedero (host), al que contiene al parásito.

El sistema inmune es un conjunto de mecanismos cuya función es la de reconocer lo propio de lo extraño, e incluye la

(1) Ogilvie, B. M., 1976

presencia de anticuerpos específicos, de linfocitos sensibilizados y de células accesorias. Cuando un agente exógeno (inmunógeno) penetra en un organismo susceptible, se presenta una cascada de eventos que da como resultado el establecimiento del estado inmune, el cual está encargado de la eliminación del inmunógeno.

Así, se han implementado estrategias para conocer la relación hospedador-parásito y comprender los mecanismos utilizados en el establecimiento parasitario, de tal suerte que se permita contrarrestar el efecto nocivo.

Un hospedador generalmente produce una respuesta inmune contra los agentes que lo infectan. No obstante, los parásitos sobreviven provocando incluso una afección crónica. En algunas infecciones se ha logrado explicar esta persistencia por medio de los mecanismos desarrollados por los parásitos para destruir, evadir, contrarrestar o coexistir con respuestas inmunes potencialmente protectoras del hospedador (Flisler, A. 1985; Karavadin, L y Ash, L. 1982). Estos mecanismos sólo pueden ser estudiados en relación a la respuesta inmune específica, que es provocada por la infección particular (Cohen, S. 1974). Recordemos que los parásitos pueden despertar tanto inmunidad por anticuerpos como la mediada por células, y la respuesta predominante dependerá del tipo de parásito (Roitt, I. 1984.).

La forma en que estos organismos sobreviven a las consecuencias potencialmente letales de inmunización es de profunda

interés biológico. La evasión inmune, término que se acuñó para explicar la sobrevivencia de los parásitos en hospedadores vertebrados inmunocompetentes, presenta diversas modalidades. Aquí se mostrarán algunos de los mecanismos involucrados en el fenómeno de instalación parasitaria y el efecto que tiene sobre el sistema inmune.

MECANISMOS DE EVASION PARASITARIA.

Hasta ahora se han identificado una veintena de distintos modos en que los parásitos se instalan en los hospedadores susceptibles. Todos ellos pueden incluirse en tres mecanismos generales, a saber:

- (1) El parásito no es reconocido por el sistema inmune.
- (2) El parásito evade la respuesta inmune, presente.
- (3) El parásito resiste a los productos del sistema inmunológico.

En esta revisión mencionaremos aquellas formas de evasión más frecuentemente descritas, ejemplificando algunas de ellas.

Algunos autores (Ogilvie & Wilson, 1976) describen los mecanismos de evasión en función del responsable del éxito de

*El sentido de evadir es distinto a resistir, sin embargo, cuando se hable en forma general, el término evadir será utilizado indistintamente.

la relación hospedador-parásito, y los agrupa en dos divisiones:

La primera se refiere a los defectos en la respuesta inmune del hospedador e incluye en esta división la falta de respuesta de origen genético; la depresión del sistema inmune que sufren los hospederos jóvenes, lactantes o durante el embarazo de las hembras; las infecciones por gran carga parasitaria y activación policlonal facilitadora por anticuerpos; disfunción de los macrófagos; inmunosupresión e inmunoincrementación, y la formación de complejos inmunes con antígenos solubles del parásito.

La segunda división se refiere a las características propias que le permiten al parásito evadir la respuesta inmune; Aquí quedan incluidas la variación antigénica, los factores inmunosupresores y anticomplementarios producidos por el parásito, etcétera.

Basándonos en esta clasificación empezaremos a revisar en forma particular las pruebas presentadas en la descripción de estos tipos de evasión.

1. DEFECTOS EN LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.

a. Bases genéticas de la falta de respuesta.

En ratones Schofield (Wakelin, 1975), la capacidad de responder inmunológicamente al nemátodo *Icthyocricus muris* requiere de la expresión de un pequeño número de genes dominantes no asociados con el complejo mayor de histocompatibilidad (H-2). De estos ratones existen dos tipos: los

"respondedores" y los "no respondedores". Aunque se haga una transferencia pasiva de anticuerpos, ésta sólo será efectiva en los ratones del fenotipo respondedor (Wakelin, 1975). Cabe señalar que ambos fenotipos producen anticuerpos circulantes. Esto parece indicar que la susceptibilidad a ciertas infecciones parasitarias está relacionada con genes no asociados al H-2. Sin embargo, en un estudio con *Jaenia crassiceps* (Sciutto, 1987) se observó que, para este parásito, la susceptibilidad de diversas cepas de ratones está ligada en forma importante con el complejo H-2, además de que se corroboró que existen otros genes que también participan en la predisposición a la infección. Esto, evidentemente depende del hospedador, y ayuda a explicar porque muchas infecciones son limitadas a ciertas especies animales. Queda claro que no pueden hacerse aún generalizaciones, e incluso hacerlas podría distraer la atención al hecho de que estas diferencias entre los parásitos son las que determinan su comportamiento biológico.

- b. Falta de respuesta en animales jóvenes, lactantes y durante el embarazo de las hembras.

Se han descrito infecciones que no pueden ser controladas por animales jóvenes, pues su respuesta inmune no ha alcanzado el desarrollo apropiado. Ejemplos de esta falta de respuesta han sido reportados en diversas ocasiones. Por ejemplo la capacidad de resistir una infección o *N. brasiliensis* no se expresa en las ratas sino hasta alcanzar las 7-9 semanas de

edad (Jarret, 1971). O la capacidad de las ovejas para controlar la infección de *Haemaphysalis contortus* solo aparece después del 60-80. mes de edad (Urquhart, 1970).

Por otro lado, se ha intentado correlacionar la respuesta deficiente a agentes infecciosos con el embarazo y durante la época de lactancia (Love & Ogilvie, 1974).

Esto parece significar que el desarrollo del sistema inmunológico depende de muchos factores para su cabal maduración, desde agentes asociados al sexo, como las funciones endócrinas, hasta la exposición a diversos agentes ambientales que "activen" al sistema inmune, promoviendo su evolución final.

c. Gran carga parasitaria e incremento en la cantidad de anticuerpos.

La "inmunoincrementación" no ha sido confirmada formalmente como mecanismo que permita que las infecciones se mantengan durante largo tiempo. Sin embargo, se ha especulado que esto puede ocurrir debido a que existen respuestas no esterilizantes caracterizadas por la abundancia de anticuerpos y la presencia de inmunidad mediada por células.

No obstante, usando extractos parasitarios, se ha logrado demostrar la presencia de moléculas que inducen lo que se conoce como activación policlonal (Greenwood, 1974; Hudson, et al, 1976). Particularmente este efecto se ha observado en la malaria: "En adultos (infectados) inmunocompetentes en el Este de África, la producción de IgG es, aproximadamente siete veces más grande que la de los europeos normales." (Oviedo-Alvarez, A.M., 1986). La síntesis de las inmunoglobulinas no

específicas sugirió la asociación de un mitógeno de células B con la presencia de Plasmodium (Greenwood, B.M., 1974).

Por otro lado, se ha observado una tolerancia parcial desarrollada en animales expuestos a una infección intensa: Cuando se aplican a ratones inóculos pequeños de Leishmania estos pueden resistir la presencia del parásito, en cambio cuando el inóculo es grande, el parásito persiste, sin que se reduzca el tamaño de las lesiones provocadas por el parásito (Preston & Dumonde, 1976). Se han presentado reportes apoyando este tipo de inmunomodulación en Leishmaniasis en humanos, y en Esquistosomiasis en ratas (Phillips, et al, 1975).

d. Alteración en la fase aferente de la inmunidad: fallas en la función del macrófago.

Algunos protozoarios como Toxoplasma, Leishmania y Trichinella cruzi cursan su ciclo biológico, o parte de él, dentro de los macrófagos. Después de la fagocitosis, el Toxoplasma evita la fusión del fagosoma con los lisosomas, al menos in vitro, según algunos reportes (Hirsch, Jones & Lee, 1974), de forma análoga se presenta la incapacidad del macrófago para eliminar a los parásitos antes mencionados por éstos y otros mecanismos. Algunos autores sugieren que el efecto destructivo contra los protozoarios intracelulares depende de la combinación particular hospedador-parásito que se presente (Mauel, Bohin, et al, 1974). El procesamiento antigénico ineficiente por parte del macrófago, contribuye a que se incrementa el tiempo de la infección, tal y como ocurre en los casos de malaria (Loose, Cook & Di Luzio, 1972).

e. Células reguladoras y factores solubles; Inmunosupresión e inmunoincrementación.

Ya hemos hablado del efecto mitogénico que parecen tener algunos parásitos, provocando que las células B sintetizen cantidades anormales de inmunoglobulinas. Sin embargo, el efecto observado puede tener otro origen: En la tripanosomiasis africana la concentración de IgM está anormalmente aumentada (Cohen, 1974), la infección puede inducir esta anomalía en la síntesis de inmunoglobulinas interfiriendo en la función de las células T.

En todos los casos, el aumento en la Ig's no está relacionado con un parásito específico, lo que sugiere que el incremento resulta de la interacción de los parásitos con los mecanismos de regulación que el sistema inmune utiliza para liberar o producir los anticuerpos.

Ahora bien, en otros casos, los hospedadores parasitados presentan una disminución en su capacidad de responder inmunológicamente a antígenos aparentemente no relacionados con la infección. Estos efectos han sido estudiados en la malaria, tripanosomiasis y en infecciones por helmintos (Keller, Oglivie & Simpson, 1971; Faubert & Tanner, 1975). La inmunosupresión en estas infecciones es atribuible a alteraciones no específicas, tales como cambios en la función monocítica, competencia antigénica, a la reducción del número de linfocitos o la activación de células T supresoras. No obstante, con

Trichinella spiralis hay evidencia que apoya la existencia de factores parasitarios que destruyen a los linfocitos (Fauber & Tanner, op. cit.).

Por último, una gran variedad de parásitos activan al complemento por la vía alterna, causando varios efectos:

- a) La lisis directa del parásito
- b) La inducción de la destrucción del parásito mediada por células y
- c) Facilitación de la parasitemia.

Taenia taeniformis y Onchocerca volvulus consumen factores del complemento (C3). En particular, se ha detectado que T. taeniformis libera un proteoglicano polianiónico sulfatado que es el que consume complemento. También Entamoeba histolytica consume complemento y Schistosoma exhibe antígenos solubles con una fuerte actividad anticomplementaria provocando un decremento dramático en los niveles de complemento en suero. Así que debe jugar un importante papel en la regulación de la respuesta inmune (Oviedo-Alvarez, A.M., op.cit.).

f. Antígenos parasitarios.

Los antígenos liberados por los parásitos a la circulación de su hospedero constituyen otra forma de evitar que el sistema inmune afecte la integridad parasitaria. Por un lado, los antígenos libres "distraen" a los productos de la respuesta, pues las interacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) se hacen en un lugar distinto de donde está el parásito, agravando la situación el hecho de que estos complejos Ag-Ac dañan al

organismo parasitado: La persistencia de estos complejos puede inhibir la migración de los macrófagos, e inducir una hiper-respuesta específica (Incremento de anticuerpos, pero no tolerancia) al bloquear a los macrófagos y otras células inmunocompetentes. Aquí, la competencia inmunológica, entre Ag's solubles y formes, adquiere gran importancia en la evasión. (Ogilvie, B.M. op.cit.).

Entre los parásitos que presentan la característica de liberar productos que actúan como antígenos solubles podemos mencionar a *Trypanosoma*, *Plasmodium falciparum*, *Babesia*, *Haemonchus contortus*, *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni* y *Iaenia solium* (Oviedo-Alvarez, A.M., op.cit.).

2. CARACTERISTICAS DE LOS PARASITOS QUE LES PERMITEN EVADIR LA RESPUESTA INMUNE.

Los parásitos logran numerosas adaptaciones para asegurar su transmisión a un nuevo hospedador. Los siguientes párrafos describirán algunas modificaciones en la estructura o fisiología en los parásitos que les aseguran poder completar, en un ambiente inmunológicamente hostil, el ciclo de vida que lo caracteriza.

a. Protozoarios.

Algunas infecciones, como las de *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Babesia*, se caracterizan, primero por una prolongada permanencia de la infección, en la que fluctúa el número de parásitos, y segundo, por el cambio periódico en la superficie antigénica del parásito (Ogilvie, B.M., op.cit.). Resumiendo, la variación antigénica es el proceso mediante el cual

una cubierta antigénica es reemplazada por otra diferente, lo que permite explicar las fluctuaciones en el número de parásitos, la elevación de las cifras de inmunoglobulinas y la prolongada infección. Esta variación puede llevarse al cabo por mutación y selección de mutantes, recombinación genética, cambios en la actividad genética y adquisición o reemplazo de simbioses, epistomas o plásmidos (Oviedo-Alvaraz. A.M., op.cit.). Así *Trypanosoma brucei*, un tripanosoma transmitido por la mosca Tse-tse al humano y los ungulados, tienen una cubierta (glicocalix) que contiene las variantes antigénicas. Es interesante hacer notar que esta enorme variedad de "glucoproteínas variables de superficie", está codificada por genes, que al igual que los anticuerpos, parecen combinarse para codificar un número virtualmente infinito de determinantes antigénicos distintos. De forma análoga se han demostrado variaciones antigénicas en *Nippostrongylus brasiliensis*, *Entamoeba histolytica* y *Paramecium*.

b. Helminths.

Tremátodos: En la supervivencia de *Schistosoma mansoni* parece estar involucrado lo que se conoce como la 'hipótesis de los antígenos del hospedero', que propone que existe una cubierta de antígenos propios del hospedador sobre la superficie del gusano adulto que cambia la apariencia inmunológica frente a los mecanismos de reconocimiento, lo que se refleja en una aparente falta de inmunogenicidad por el parásito.

Céstodos: En estados tempranos de migración, las larvas de céstodos son susceptibles a la acción de anticuerpos y complemento; más tarde llegan a ser resistentes a la acción de los anticuerpos, lo que sugiere un cambio evidente en su estructura propia y de su membrana, la cual es permeable a las proteínas séricas. Se ha demostrado que en el fluido vesicular existen altos niveles de un factor anticomplementario que protege al parásito contra la acción de las inmunoglobulinas (Ogilvie, B.M. op. cit.).

Nemátodos: Los estados larvarios de algunos nemátodos llegan a ser inhibidos en su desarrollo cuando infectan a un hospedador que fué parasitado previamente y se ha hecho resistente. Sin embargo, como en el caso de Toxocara canis o Uncinaria lucasi, en los hospedadores hembras en estado de gravidez o durante la lactancia, cuando ocurren diversos cambios hormonales, las larvas antes controladas se ven activadas e invaden a la madre e incluso, por vía transplacentaria o través de la leche materna, a las crías. Tales adaptaciones aseguran la infección a la siguiente generación de hospederos.

3. OTROS MECANISMOS DE EVASION QUE NO SE DEBE A LA INTERACCION PARASITO-SISTEMA INMUNE.

Como debe haberse percibido, en el establecimiento de una parasitosis está involucrada una compleja conjunción de factores, dependientes del hospedador o del parásito, que una vez instalada da como resultado la enfermedad.

Hay, por otro lado, otros aspectos que debemos contemplar: La

susceptibilidad a una infección también depende de la vía de entrada, de las migraciones y localización definitiva del hospedador, de la carga parasitaria y potencial reproductor, de la actividad fisiológica del organismo parasitado, de las condiciones climatológicas, de los hábitos de higiene y alimentación, del hacinamiento en las ciudades, y en fin, de muchos otros factores circunstanciales, pero siempre presentes.

4. Conclusiones.

Los mecanismos que han sido propuestos se esquematizan en el diagrama A.1. Durante esta discusión hemos incluido la variación antigénica, la adquisición de antígenos parecidos a los del hospedador, la producción de factores anticomplementarios, la interferencia con la respuesta del hospedero a nivel de la actividad macrofágica (que resulta en el inapropiado procesamiento antigénico), el igual que inhibidores de la fusión lisosomal.

También hablamos de los antígenos solubles y la formación de complejos inmunes los cuales alteran el equilibrio de las células supresoras o efectoras, bloqueando a las células precursoras de los linfocitos B, etc. Esta lista es amplia y puede extenderse más en un futuro cercano. Estamos en el momento en que dilucidar cómo los parásitos prolongan exitosamente su estancia en el hospedador puede sugerirnos la forma de activar eficazmente al sistema inmune, ya sea con vacunas u otros medios; para la ulterior eliminación del agresor. En realidad no terminamos aquí, empezamos a conocer

a los parásitos y a entender a nuestro propio sistema inmunológico.

APENDICE 2

Taenia crassiceps.

APENDICE 2.

IAENIA CRASSICEPS

Iaenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Ces-
todo: cyclophyllidea).

En 1952 el Dr. Reino Freeman, de la Ontario Research Founda-
tion, aisló de un zorro una cepa de *Iaenia crassiceps* a la
cual se le denominó, DRF.

Inicialmente, el ciclo de vida de esta cepa se mantuvo por
los procedimientos normales, es decir, por pasajes sucesivos
entre ratones de laboratorio y los hospedadores caninos defi-
nitivos. Posteriormente el parásito se mantuvo por reinocula-
ciones seriadas en la cavidad peritoneal del ratón, únicamen-
te.

En 1962, Freeman reportó que sus intentos por reestablecer el
ciclo de vida normal del metacéstodo en sus hospedadores
caninos definitivos habían fracasado, así que siguió conser-
vando la cepa por inoculación en ratones.

Francis J. Dorais y Gerald W. Esch aislaron en el verano de
1965 una nueva cepa de *Iaenia crassiceps* a la que bautizaron
como cepa KBS, obteniéndola de un roedor, *Microtus pennsylvan-
icus* en Michigan (Dorais, F.J. & Esch, G.W., 1967). A esta
variedad la mantuvieron mediante la inoculación seriada de
ratones, siguiendo el método de Freeman (Freeman, R.S., 1962)

Se han reportado varias cepas más del céstodo: Entre ellas hay una que Freeman aisló del ojo de un humano en 1972, denominada cepa DEB (Freeman, R.S., et al, 1973). Por último HYG se aisló en Noviembre de 1974 a partir de una infección natural en zorro rojo (Sally, C.Y. & Freeman, R.S., 1976).

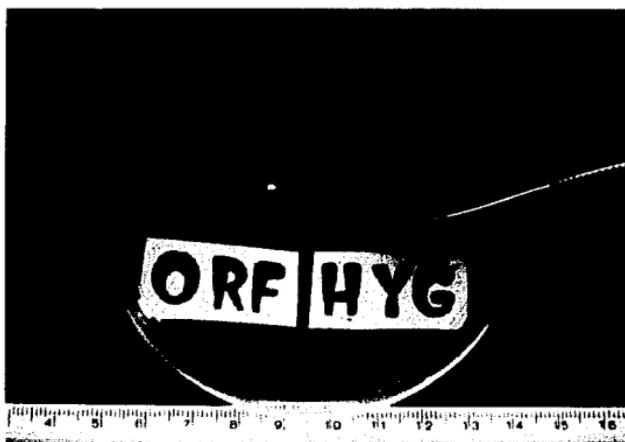
Las ventajas que ofrece *Taenia crassiceps* en el estudio de la relación céstodo-hospedador, son principalmente la facilidad con que se mantiene la cepa en el laboratorio, además de su capacidad de reproducirse asexualmente mediante gemación exógena. Este metacéstodo puede crecer en una gran variedad de tejidos, principalmente en cavidad peritoneal e intrapleurai. La inoculación directa por vía intraperitoneal permite producir una infección que puede evaluarse con facilidad, pues al final de un periodo preestablecido, al abrir la cavidad, se pueden recuperar los parásitos, contarlos y reinocularlos en caso necesario.

El utilizar a este ténido como modelo experimental de cisticercosis ha sido de enorme ayuda para poder determinar varios fenómenos inmunológicos, desde la forma de instalación, hasta el tipo de respuesta que el hospedador monta ante la invasión.

Se ha señalado que los metacéstodos de *Taenia crassiceps* no solo infectan al ratón, sino que por diversos mecanismos como la inmunosupresión inducida se han logrado infectar ratas (*Rattus norvegicus*) que se tornan tolerantes al cisticercosis

(Blair, L.S. & Campbell, W.C., 1976), e incluso Freeman consiguió mantener sin artificios, en cavidad peritoneal de ratas cisticercos de ORF e HYB, dándoles suficiente tiempo para establecerse, e indicando que existe una dependencia entre susceptibilidad y dosis inicial de céstodos inoculados (Sally & Freeman, loc. cit.).

En el laboratorio del Dr. Carlos Larralde se ha encontrado que además de todas las ventajas que hemos mencionado, *Iaenia crassiceps* tiene cruce antigénico con *Iaenia solium*, lo que justifica más aún el uso de este parásito como modelo experimental (Fragoso, G., Lemus, D., Trueba, L., tesis profesional). El tener varias cepas de este agente infeccioso ha provocado que existan diversos estudios comparativos entre ellas. Así tenemos los experimentos de Dorais y Esch con las variedades KBS y ORF, donde observan que la cepa mejor conocida, ORF, tiene una capacidad reproductiva mayor, proponiendo que este fenómeno es resultado de una mutación genética, en acuerdo con observaciones previas de Mount (Dorais y Esch, op.cit.). Parte de las observaciones de Mount (1969) se refieren a la diferente morfología del escólex de larvas ORF y KBS. Estas diferencias sirvieron para el estudio de la presente tesis, pues las cepas ORF e HYB (la más vieja y la más nueva, respectivamente) son claramente diferentes en esta característica (ver fotografía A.1)



Fotografía A.1. Se observa que la variedad ORF no contiene escólex visible, mientras que HYG sí (señalado).

También en el grupo del Dr. Larralde se han hecho estudios de susceptibilidad genética en varias cepas de ratón, observándose una dependencia con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (H2), y con otros genes no asociados con él (Sciutto, E. et al. com. pers.). De todas las cepas estudiadas de ratón (Balb/c, Balb/k, Balb/b, C57BL/6j) se encontró que la más susceptible era Balb/c. Al mismo tiempo se observó que en todos los casos las hembras resultan más susceptibles que los machos, hecho que aquí corroboramos.

En cuanto a la relación sistema inmune-Taenia crassiceps se han reportado diversos estudios, algunos de los cuales indican que para tener lugar el establecimiento dentro del hospedador, es necesario que el parásito provoque una inmunosupre-

sión (Good, A.H. y Miller, K.L., 1976). Incluso se ha evaluado la cinética de crecimiento en infecciones primarias y secundarias, concluyéndose que el tipo de respuesta a la infección primaria es mediada por anticuerpos y que es la respuesta de tipo celular la que juega el papel más importante en las reinfecciones. En el mismo reporte se hace la observación de que una previa inoculación subcutánea de los parásitos provoca que el animal resulte mejor preparado para resistir la reinfección (Siebert, A.E., Good, A.H. & Simmons-J.E., 1978). Esto se ha logrado confirmar inmunizando animales con extracto crudo de DRF y en los que se ha demostrado que quedan protegidos contra una infección posterior con metacéstodos viables (Fragoso, G. et al. op. cit.).

APENDICE 3

Reactivos.

APENDICE 3

REACTIVOS

En la elaboración de los reactivos necesarios para la realización de los experimentos se utilizaron preferentemente reactivos de la marca 'J.T. Baker S.A. de C.V.', salvo que se mencione otra casa comercial.

A continuación se describe la preparación de reactivos y técnicas empleadas en esta tesis.

Amortiguador salino de Fosfatos (PBS).

Na HPO	10.22g.
2 4	
NaH PO	3.86g.
2 4	
NaCl.....	74.0g

Se ajusta el pH a 7.35 ± 0.05 y se afora a un litro con agua destilada.

Alsever (Amortiguador para glóbulos rojos de cordero).

Dextrosa.....	20.50g
Citrato de Sodio.2 H O.....	8.00g.
2	
Acido cítrico.H O.....	0.55g.
2	
NaCl.....	4.20g.

Se ajusta el pH a 6.1, se afora con agua destilada a un litro y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 10 libras de presión.

Reactivos para la técnica de ELISA.

a) PBS-Tween (10%).

Tween 20 (Monolaurato de polioxietilen-sorbitan) (Sigma)
10ml por cada 90ml de PBS.

b) Albúmina sérica bovina al 1% en PBS (p/v)

c) Acido sulfúrico 4N.

ch) Amortiguador de citrato-fosfato, pH=5.

Fosfato de sodio dibásico 0.2N.....25.7ml

Ac. cítrico 0.1M.....24.3ml

Agua destilada cbp.....100ml.

d) Sustrato.

o-Fenilendiamina (0.04%) en amortiguador de citrato-fosfato.

Al momento de la reacción se agrega peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.012%

e) Anticuerpo anti-gammaglobulina de ratón-biotinilada (dilución 1/1000) (Berhing).

f) Conjugado estreptoavidina-peroxidasa (Berhing) (1/100).

Método de Lowry para Determinación de Proteínas

Sulfato de cobre al 1% (pentahidratado)....1ml.

Tartrato de Sodio y Potasio al 2%.....1ml.

Carbonato de Sodio al 2% en NaOH 0.1N.....98ml.

*Se hace una curva patrón que vaya de 10-100ug/ml de proteína con albúmina bovina o humana.

*Se hacen diluciones de la muestra problema (1:50, 1:100, 1:200) con PBS.

*El blanco es un mililitro de PBS.

*Se mezclan al momento y en el orden indicado los reactivos.

*Se agrega a cada tubo 3ml de la mezcla.

*Se deja reposar 10 minutos.

agregar a todos los tubos 0.3ml del reactivo de Fenol (Folin Ciocalteu) diluido con agua destilada 1:1 (v/v). Marca Sigma

de México S.A.

*Agitar bien y dejar reposando 30 min-2 h.

*Leer a 600nm de longitud de onda en colorímetro.

Preparación del extracto crudo de ORF.

- 1.Extraer los parásitos de la cavidad peritoneal del ratón.
- 2.Lavarlos al menos 3 veces con PBS.
- 3.Homogeneizar con la menor cantidad de PBS posible.
- 4.Cuantificar proteínas.
- 5.Ajustar la concentración a 500ug/ml.
- 6.Adicionar como adyuvante, Hidroxido de Aluminio (0.03mg/mg de proteína).

Reactivos para la hemaglutinación.

a)Glóbulos rojos de carnero al 2% en buffer de hemaglutinación.

b)Amortiguador para hemaglutinación.

FTA Hemagglutination Buffer BBL Div. Becton, Dickinson and Company. Fórmula:(gramos por litro preparado)

NaCl.....7.65g.

Fosfato disódico.....1.2688g.

Fosfato monosódico.....0.1g.

Fosfato monopotásico.....0.2113g.

Disolver 9.23g en un litro de agua destilada. pH 7.2 \pm 0.1.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Blair, L.S. y Campbell, W.C. (1976). The Journal of Parasitology, 62, (1), 163-164.
2. Cohen, S. (1974). A Ciba Foundation Symposium. Elsevier Expecta Medica. North Holland. 3-20.
3. Cohen, S. (1974). En: Porter, R y Knight, J., ed. Parasites in the immunized host: Mechanisms of survival.
4. Dorais, F.J. y Esch, G.W. (1969). Experiment. Parasitology, 25, 395-398.
5. Faubert, G.M. y Tanner, C.E. (1975). Immunology, 28, 1041-1050.
6. Fliesser, A.; Pérez-Monfort y Larralde, C. (1979) Bull. WHO., 57, 839-856.
7. Fragoso, G.; Lemus, D.; Trueba, L. (1987) Tesis. Comunicación personal.
8. Good, A.H. y Miller, K.L. (1976). Infection and Immunity, 4, (12), 449-456.
9. Greenwood, B.M. (1974). The Lancet, 16, 435-436.
10. Hirsch, J.G., Jones, T.C. y Len, L. (1974) En: Porter, R. y Knight, J. ed. Parasites in ..., 205-223.
11. Hudson, K.M.; Byner, C.; Freeman, J. y Terry, R.J. (1976) Nature, 264, 254-258.
12. Jarret, E.E.C. (1971). Clin. Exp. Immunol., 8, 141-150.

13. Karavadin, L.M. y Ash, L.R., (1982) *Parasite Immunol.* 4: 1-12.
14. Keller, F., Ogilvie, B.M. y Simpson, E. (1971), *The Lancet*, 1, 678-680.
15. Larralde, C., Lactett, J.F. et al. (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, (5), 965-973.
16. Loose, L.D., Cook, J.A. y Di Luzio, N.R. (1972). En: Sadum, E.H., ed. *Basic research in Malaria*, 484-481.
17. Manuel, J., Behin, R. et al (1974). En Porter, R. y Knight, J. ed. *parasites in...*, 225-242.
18. Mohammed, I.N., Heiner, D.C., Miller, B.L., Goldberg, M.A. y Kagan, I.G. (1984) *Journal of Clinical Microbiolouy* Oct. 775-779
19. Ogilvie, B.M. (1974) A Ciba Foundation Symposium. Elsevier, Amsterdam., 81-100.
20. Ogilvie, B.M. y Love, R.J. (1974). *Transplant. Rev.*, 19, 147-169.
21. Ogilvie, B.M. (1976) *Brit. Med. Bul.*, 32, (2)
22. Ovando Alvarez, A.M. (1986). Monografía, Fac. de Química, México.
23. Phillips, T.M. y Draper, C.C. (1975). *Br. Med. J.*, 2, 476-477.
24. Roitt, I.D. (1984), *Immunology*. Longman Press.

25. Sally, C.Y. y Freeman, R.S. (1976) The Journal of Parasitology. 62 (5), 837-839.
26. Sciotto, E., Larralde, C. et al. (1987) Comunicación personal.
27. Siebert, A.E., Good, A.H., y Simmons, J.E. (1978). International Journal for Parasitology. 8, 39-43.
28. Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. (1968), Statistical Methods, 6th. Edition. The Iowa State University Press.
29. Urquhart, G.M. (1970). Journal Parasitol. 56 (4) sect. 11, 547-551.
30. Wakelin, D. (1975). Parasitology, 71, 51-60.
31. Woodruff, A.W. (1968). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 446-452.