

21
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

EFFECTOS *IN VITRO* DE LAS CELULAS DEL SISTEMA INMUNE SOBRE LA
VIABILIDAD DEL CISTICERCO DE *TAENIA CRASSICEPS*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL
TITULO DE BIOLOGO
P R E S E N T A

VERONICA EVA BUNGE VIVIER

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, DF. 1991.



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.

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	
1. Problemática de la Cisticercosis humana y porcina	2
2. Modelo Experimental Murino	3
2.1 Efecto del Sexo en la Susceptibilidad	4
2.2 Respuesta Inmune hacia el Cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i>	5
Material y Métodos.....	9
Resultados	
Reestructuración del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	18
Movilidad de cisticercos <i>in vitro</i>	20
Viabilidad afectada en cisticercos	22
Observación microscópica del tipo de células linfoides que se adhieren a los cisticercos	27
Discusión	28
Conclusiones	33
Apéndice 1. Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	34
Apéndice 2. Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	36
Bibliografía	39

RESUMEN

La mayoría de los estudios experimentales relacionados con la cisticercosis provocada por *Taenia solium* utilizan el modelo murino proporcionado por el metacéstodo de *T. crassiceps*.

En este trabajo se logró sentar las bases para la elaboración de un sistema *in vitro* que permite el estudio detallado de la relación hospedero-parásito en la cisticercosis de *T. crassiceps*.

Este modelo ofrece similitudes con lo que ocurre *in vivo*, en cuanto a que el sistema inmune de ratones inmunizados combate con mayor eficiencia al parásito de lo que lo hace el de ratones sin inmunizar. Además fortalece trabajos hechos *in vivo* en los que se propone que la respuesta inmune celular es la importante en esta parasitosis. Por otro lado, *in vitro* no se observaron diferencias entre el aparato inmune de hembras y machos - *in vivo* las hembras son más susceptibles- lo que sugiere que el aparato inmune está bajo estimulación hormonal constante y no predeterminado.

INTRODUCCION

1. PROBLEMATICA DE LA CISTICERCOSIS HUMANA Y PORCINA

La cisticercosis es una enfermedad provocada por el establecimiento del metacéstodo de *Taenia solium* en los tejidos del hombre o del cerdo (Flisser y Malagón 1989).

En el hombre, el cisticerco puede provocar la muerte del individuo cuando se aloja en algunos sitios del tejido cerebral, o resultar asintomático o causar fuertes dolores cuando se establece en vísceras, músculo u otras zonas del cerebro (Aluja et al 1987). En México, el 10% de los pacientes neurológicos presentan cisticercosis, el 2% de las autopsias revelan la presencia de éste parásito y del 1 al 4% de las muestras de la encuesta serológica de 1974 en población abierta urbana resultaron seropositivos a esta enfermedad (Woodhouse, Flisser & Larralde 1982).

En la economía de la porcicultura la cisticercosis causa grandes pérdidas ya que los cerdos infectados son descartados o subutilizados. En 1981, las pérdidas de carne de puerco por decomiso de carne infectada en rastros se calcularon en más de 906 millones de pesos (Flisser y Malagón 1989).

Debido a que la cisticercosis es frecuente en países pobres de Asia, Africa y Latinoamérica es a nosotros a quienes corresponde su estudio y solución.

2. MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Una manera de explorar los factores biológicos que propician esta enfermedad ha sido mediante un modelo experimental constituido por el cisticerco de *Taenia crassiceps* que infecta al ratón.

El cisticerco de *T. crassiceps* presenta un ciclo de vida muy parecido al de *T. solium*. Estudios de la composición antigénica de estos dos parásitos han demostrado que existe antigenicidad cruzada entre ellos, incluso inmunoprotección cruzada (Larralde *et al* 1989a y Sciutto *et al* 1990).

El parásito murino se puede mantener fácilmente en el laboratorio ya que presenta reproducción asexual (Freeman 1962). Se puede tener un "almacén" de cisticercos inoculándolos por vía intraperitoneal a ratones. Además, este cisticerco no parasita al hombre lo cual proporciona mayor seguridad en su manejo.

Cuando los cisticercos de *T. crassiceps* son inoculados al ratón a través de una jeringa, se rompen en distintos tamaños; los fragmentos de membrana resultantes se organizan originando varios cisticercos pequeños, de los cuales algunos maduran y se reproducen. Sciutto *et al.* en 1991a sugirieron que es en el periodo de reorganización, o en los primeros quince días después del desafío con el parásito, cuando ocurre la confrontación decisiva del sistema inmune del hospedero con el parásito.

La estrategia utilizada por el cisticerco para resistir al sistema inmune del hospedero todavía es incierta. Se ha encontrado que los cisticercos de *T. crassiceps* comparten antígenos de histocompatibilidad con cepas de ratones susceptibles, lo cual sugiere una posible estrategia de mimetismo o regulación inmune en la sobrevivencia del parásito (Fragoso *et al* 1991). También existe la idea de que el parásito secreta alguna

sustancia inmunosupresora. Estudios al respecto han indicado que el sobrenadante de cultivos de cisticercos de *T. crassiceps* tiene un efecto negativo sobre la degranulación de células cebadas; incluso el suero de ratones con treinta y cinco días de parasitados inhibe la degranulación de éstas células (Seifert y Geyer 1989).

2.1 EFECTO DEL SEXO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD

En la cisticercosis experimental murina se han observado diferencias en la susceptibilidad a la infección dependiendo del sexo del ratón (Freeman 1962). Las hembras son más susceptibles que los machos, presentan alrededor de 200 y 50 parásitos respectivamente después de un mes de infección. En otras parasitosis de helmintos como la trichinosis (*Trichinella spiralis*), hidatidosis (*Echinococcus granulosus*), y diversas taeniasis, sucede lo contrario, los machos resultan más susceptibles que las hembras (Fragoso et al. 1990).

Esto llama la atención pues en general las hembras presentan una capacidad inmune superior a la de los machos (Ansar, Dauphinee y Talal 1985), tienen un nivel de inmunoglobulinas más alto, principalmente de IgM y una inmunidad humoral y celular bastante más notable. (Butterworth McClelland, Allansmith 1967 y Graff, Lappe, Snell 1969). En 1984 Weinstein, Ran y Segal encontraron que los estrógenos aumentan la respuesta específica hacia ciertos antígenos y que la testosterona inhibe esta respuesta. También observaron que células de bazo extraídas de machos normales y hembras tratadas con testosterona producían menos interleucina-2 (I1-2) que las células de hembras normales. Contrariamente a lo anterior, en 1985 Ansar, Dauphinee y Talal encontraron que el estrógeno disminuye los niveles de I1-2 y la testosterona aumenta o mantiene estos niveles.

El hecho de que en la cisticercosis por *T. crassiceps* las hembras sean más susceptibles que los machos no se explica fácilmente. Se ha sugerido que esta susceptibilidad puede estar determinada genéticamente en el cromosoma "Y" o bien resultar de la influencia del sistema neuroendócrino, ya sea que éste actúe directamente sobre el parásito o a través del sistema inmune (Fragoso et al 1990).

Si bien en el nemátodo *Trichinella spiralis* las hormonas tienen un efecto directo sobre la ovoposición *in vitro* (Reddington et al 1981), en el caso de *T. crassiceps* las hormonas no influyen directamente sobre el cisticerco (Huerta et al 1991). Para este último, cabe pensar que las hormonas están actuando sobre el sistema inmune y entonces preguntarse porqué la diferente susceptibilidad entre sexos no es igual en todas las parasitosis en cuya defensa esté involucrada la inmunidad. Una posible respuesta es que las hormonas pueden actuar sobre el sistema inmune alterando diferencialmente poblaciones celulares de este sistema que a su vez son requeridas de manera distinta en el ataque contra diversos parásitos.

2.2 RESPUESTA INMUNE HACIA LA CISTICERCOSIS POR *T. CRASSICEPS*

En la infección por *T. crassiceps* se ha visto que existe una respuesta inmune específica del hospedero contra el parásito. En 1978 Siebert, Good y Simons encontraron que en ratones, el desafío previo con cisticercos por vía subcutánea crea cierta protección al hospedero cuando posteriormente, se inoculan más cisticercos por vía intraperitoneal. Estudios hechos *in vitro* sobre el efecto del suero normal, inmune e hiperinmune de ratones sobre la estructura del tegumento de metacéstodos de *T. crassiceps*, demostraron que el suero hiperinmune en sólo dos días provocó la pérdida

del tegumento y degeneración del subtegumento (Siebert & Good 1979). En 1980, los mismos autores demostraron que el daño inmune celular sobre las larvas fué mayor que el humoral.

Aprovechando esta respuesta inmune específica, Sciutto *et al.* en 1991 lograron hacer una vacuna que resultó eficaz en la cisticercosis murina, ya que reduce significativamente la carga parasitaria de los ratones inmunizados. Esto indica que en esta parasitosis, la preestimulación del sistema inmune es de suma importancia.

A pesar de que Siebert y Good en 1979 hayan encontrado que los anticuerpos dañaban las membranas de los cisticercos, estudios hechos por Sciutto *et al.* en 1991b indican que estos no participan en la protección del hospedero. En 1990, Bojalil y Terrazas (com.pers.) realizaron transferencias pasivas de linfocitos y macrófagos a ratones timentomizados neonatalmente que tampoco los protegieron, sin embargo, cuando transfirieron células de bazo de ratones inmunizados entre las que predominaban los linfocitos T, sí lograron proteger a los ratones, tanto a machos como a hembras.

Existen otras células linfoides con actividad inespecífica que también tienen un papel relevante en diversas parasitosis. En el tremátodo *Schistosoma mansoni*, los eosinófilos parecen ser las células efectoras más activas, y en *Trypanosoma cruzi*, los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos provocan serios daños al parásito (Freeman 1986).

En resumen, el estudio *in vivo* de la interacción hospedero-parásito resulta bastante complicada (Figura 1) por no tener bajo control la mayoría de los factores involucrados en esta parasitosis. Con un sistema de estudio *in vitro* se lograría elucidar con mayor precisión los mecanismos

involucrados en la defensa del ratón contra el cisticerco. A este sistema se le podría añadir diversas variantes bien conocidas y cuantificables que permitieran tener al investigador el control casi total de los fenómenos que pudieran estar ocurriendo.

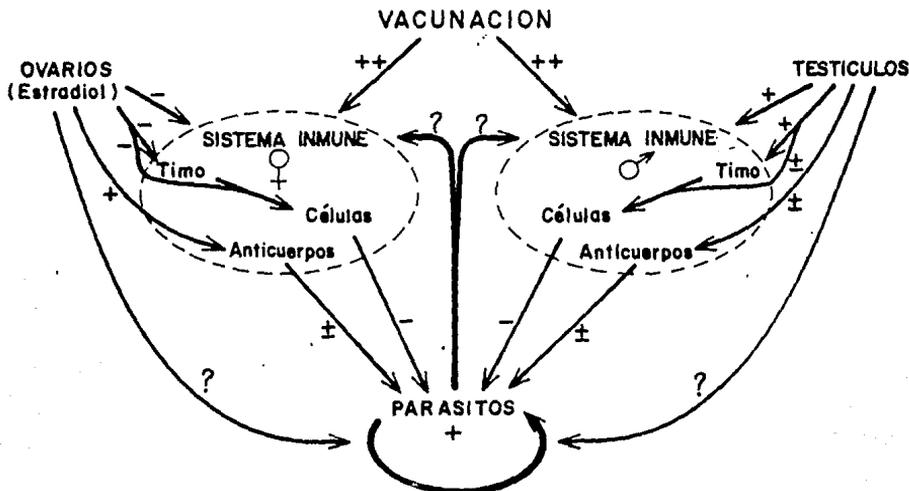


Figura 1. Interacción del Sistema Inmune con su entorno en lo que respecta a la parasitosis por *T. crassiceps*. Los signos representan: "+" influye positivamente; "-" influye negativamente; "+ -" no influye; "?" no se conoce el tipo de interacción.

La vacunación de los ratones con extracto de cisticercos de *T. crassiceps* les induce inmunidad protectora en contra del parásito (Sciutto et al 1990). A su vez, las gónadas de hembras tienen un efecto negativo sobre el aparato inmune mientras que las de macho influyen de manera positiva (Bojalil y Terrazas com.pers.). Si bien las células del sistema inmune actúan negativamente sobre el crecimiento del cisticerco, los anticuerpos no parecen tener efecto sobre el mismo (Sciutto et al 1991b). No hay evidencia de que haya una influencia directa de las gónadas sobre el parásito (Huerta et al 1991). Por su parte, éste se autoestimula positivamente y parece tener una influencia inhibitoria sobre el sistema inmune de su hospedero.

El objetivo de esta tesis es elaborar un modelo *in vitro* como instrumento para explorar en detalle los mecanismos que determinan el destino de la relación hospedero-parásito sobre todo en lo que se refiere a la participación del sistema inmune.

En este trabajo se han anexado dos apéndices que explican el ciclo de vida de *T. solium* y *T. crassiceps*.

MATERIAL Y METODO.

La parasitosis del cisticerco de *Taenia crassiceps* se mantiene en el laboratorio mediante la inoculación de parásitos por vía intraperitoneal a ratones hembras de la cepa BALB/C.

Para simular lo que ocurre *in vivo* después de la inoculación, los cultivos *in vitro* se realizaron con cisticercos pasados por una jeringa. Este procedimiento rompe a los cisticercos en varios fragmentos.

Uno de los primeros experimentos consistió en observar el desarrollo de los fragmentos de cisticerco cultivados *in vitro* durante cinco días en RPMI, un medio de cultivo líquido. El estado en el que se encontraban se determinó observando su movilidad. Después, a un cultivo similar se le agregaron células provenientes del bazo de ratones hembras y machos, normales y parasitados y se observaron diariamente durante cinco días para registrar su movilidad.

Como este parámetro de movilidad resultó ser un tanto subjetivo, se cambió la medición del estado del cisticerco por la evaluación de su viabilidad, lo cual se consigue al inocular los cisticercos previamente tratados en ratones hembras y, cuantificando la carga parasitaria de éstas al término de un mes.

Tomando en cuenta esta nueva medida, se averiguó si el tiempo de incubación *in vitro* de los cisticercos afectaba su viabilidad independientemente de la presencia de células. Para ello se cultivaron pedazos del parásito durante distintos períodos y posteriormente se inocularon en ratones hembras. Después de un mes, se cuantificó el número de parásitos recuperados en cada ratón.

También se realizaron cultivos mixtos de células linfoides y cisticercos; sin embargo, ahora los grupos estuvieron formados por células del bazo de ratones hembras y machos, normales e inmunes.

Al medio de cultivo se agregó un sobrenadante rico en interleucina-2 (IL-2) ya que su presencia estimula y prolonga la vida de los linfocitos T (Roitt 1988). Este sobrenadante se obtuvo a partir de linfoblastomas de rata (Jurkat Rat) que producen IL-2.

En cada experimento los ratones ocupados fueron de la cepa endogámica Balb/c con cinco semanas de edad, proporcionados por el bioterio de IIB de la UNAM. Cada cultivo de cisticerco estuvo representado por cinco réplicas.

I.- OBTENCION DE SOBRENADANTE RICO EN IL-2.

El sobrenadante rico en (IL-2), se obtuvo a partir de linfoblastomas de rata de la línea Jurkat.

Cien millones de células Jurkat fueron cultivadas en 10ml de RPMI 1640 (GIBCO) -suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-streptomicina- y 10ml de concanavalina A (ConA) a una concentración de 6.7 ug/ml. Después de 48 horas, se cosechó el sobrenadante y se fraccionó en alícuotas de 2ml. Lo preservamos a -20 C. La concentración óptima de ConA se obtuvo a partir de una curva dosis-respuesta de estimulación del mitógeno sobre células Jurkat y de ratón hembra Balb/c (FIGURA 2).

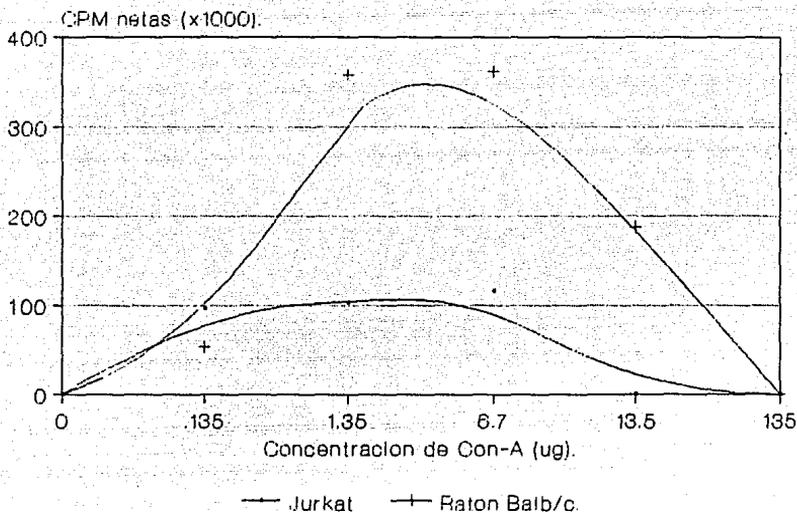


FIGURA 2. Curva dosis-respuesta de Con-A sobre células provenientes de rat3n y de la l3nea Jurkat de rata. Cada dato expresa el promedio de tres r3plicas.

II.-INMUNIZACION DE LOS RATONES.

El ant3geno utilizado en la inmunizaci3n de los ratones fu3 un extracto soluble de cisticercos de *T.crassiceps* elaborado de la siguiente manera:

- a) Se colectaron los par3sitos de la cavidad intraperitoneal de hembras Balb/c con dos meses de infecci3n, haciendo lavados con una soluci3n de fosfato de sodio 0.1M con un pH de 7.4 (PBS).

- b) Los metacéstodos se lavaron 4 veces en PBS para disminuir las proteínas del hospedero adheridas a la superficie externa de los parásitos.
- c) Se resuspendieron en PBS (solución salina) en una proporción de 3:1 (v/v).
- d) Se homogeneizaron en un Polytron, obteniendo un extracto crudo.
- e) Se centrifugó el extracto crudo a 20000 rpm ó 32700 g durante 1 hora a 4C.
- f) Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.
- g) Finalmente se separó el extracto soluble en alícuotas de 1ml y se almacenó a -70 C.

Se inmunizaron ratones de cinco semanas de edad. La cantidad de inmunógeno que se administró por vía intraperitoneal fué de 100 ug de proteína en un volumen de 200ul. Como adyuvante se utilizó hidróxido de aluminio $[Al(OH)_3]$ en una proporción de 1mg por 29.76 mg de proteína total del extracto.

La preparación del antígeno con el adyuvante se elaboró en el momento de la inmunización.

III.- OBTENCION DE CISTICERCOS.

Los cisticercos de *T. crassiceps* variedad ORF fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/C con dos meses de infección.

Se colectaron de manera aséptica en PBS y se seleccionaron cisticercos de aproximadamente 2mm de diámetro, sin gemas.

IV.- OBTENCION DE CELULAS DE BAZO.

Los ratones donadores de las células de bazo fueron anestesiados con éter y posteriormente desangrados por el plexo retro-orbital. Después, en condiciones estériles, se les extirpó el bazo dejándolo reposar en RPMI durante escasos minutos. Enseguida, se perfundió el bazo obteniéndose las células. Se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm. Posteriormente por cada bazo se agregó 1 ml de solución hemolizante, compuesta por cloruro de amonio al 0.7%, como solución lisadora de eritrocitos obteniendo así una muestra rica en células linfoides. La viabilidad de las células fué mayor al 95%. En general, había un 57% de linfocitos, un 33% de neutrófilos y un 10% de monocitos (Tabla 1).

PORCIENTO DE CELULAS EN BAZO

	Linfocitos	Neutrófilos	Monocitos
HEMBRA NORMAL	54	39	8
HEMBRA INMUNE	58	30	12
MACHO NORMAL	65	27	8
MACHO INMUNE	51	37	12

Tabla 1. Tabla del tipo de células encontradas en los distintos grupos experimentales expresado en por ciento.

Si bien el lugar de la infección experimental causada por el cisticerco de *T. crassiceps* es la cavidad peritoneal, las células linfoides utilizadas en los cultivos mixtos con parásitos se obtuvieron del bazo del ratón. Esto obedece fundamentalmente a dos motivos: 1.- la perfusión del bazo provee muchas más células que las obtenidas por lavados de la cavidad peritoneal y, 2.- trabajos preliminares demostraron que no había diferencias claras en cuanto al efecto de células provenientes de peritoneo y bazo sobre la movilidad del cisticerco.

V.- CULTIVO MIXTO DE CELULAS LINFOIDES CON CISTICERCOS.

En cajas de cultivo con 24 pozas (COSTAR), se colocaron 10 cisticercos de aproximadamente 2mm de diámetro pasados por una jeringa con aguja número 25 en un volumen de 300ul que los rompía en distintos tamaños. Después, a cada poza se adicionaron células en cantidades variables provenientes del bazo de hembras o machos, normales, inmunes o parasitados en un volumen de 0.5 ml. La cantidad de células varió entre 2, 4, 6 y 8 millones según el experimento. El medio utilizado fué RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-streptomina. Al cultivo se añadieron también 100ul de sobrenadante rico en IL-2 en una dilución 1:10 con el propósito de prolongar la vida de los linfocitos. Esta dosis no resultó ser la óptima en la estimulación de linfocitos.

Diariamente a cada poza se agregó 0.5 ml de medio suplementado nuevo, retirándole antes la misma cantidad de medio viejo. Los cultivos mixtos se mantuvieron durante 3 ó 5 días en una incubadora a 37 C, con 5% de CO₂ y 5% de humedad.



FIGURA 3. Dos pedazos de cisticercos en un cultivo con células linfoides. 20 X.

VI.- DESAFIO Y CONTEO DE CISTICERCOS.

Los cultivos de cisticercos que estuvieron durante tres días en contacto con células del sistema inmune, fueron inoculados por vía intraperitoneal a ratones hembras Balb/c con cinco semanas de edad. Antes de hacer esto, los pedazos del parásito se separaron de las células

mediante 4 lavados con PBS. En caso de no haber estado en cultivo con células, los cisticercos se lavaron una vez con PBS.

La carga parasitaria de cada ratón se midió al mes de la infección. Estos ratones eran sacrificados y posteriormente se les abría la cavidad peritoneal, obteniendo todos los cisticercos de su interior. Las vísceras también se lavaron para aumentar la eficiencia del conteo (FIGURA 4).

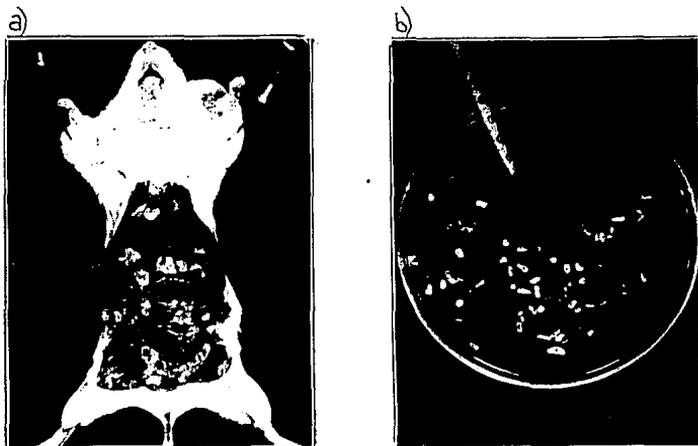


FIGURA 4. a) Cisticercos de *T.crassiceps* en la cavidad peritoneal de un ratón, b) cisticercos obtenidos en una caja de Petri.

VII. DETERMINACION DE POBLACIONES CELULARES AÑADIDAS EN LOS CULTIVOS MIXTOS IN VITRO.

El tipo de células linfoides y su proporción en los cultivos mixtos con cisticercos se determinó haciendo un frotis de la muestra a colocar en el cultivo. Este frotis se tiñó con hematoxilina-eosina y posteriormente se determinó y se examinó al microscopio.

En cada caso se contaron un total de 100 células, y así se obtuvo el porcentaje de cada población celular en las distintas muestras. Se fijó el cultivo entero con alcohol al 96%. Los cisticercos se colocaron sobre un portaobjetos y fueron aplastados con otro. Enseguida se tificaron con hematoxilina-eosina contándose los tipos celulares que se encontraron sobre el cisticerco de la misma manera en que se hizo con los frotis.

RESULTADOS

REESTRUCTURACION DEL CISTICERCO DE *T. CRASSICEPS*

Sucesivas observaciones de cisticercos rotos cultivados *in vitro*, nos ha sugerido la evolución que sufre cada pedazo y que circunstancias les son más favorables (FIGURA 5).

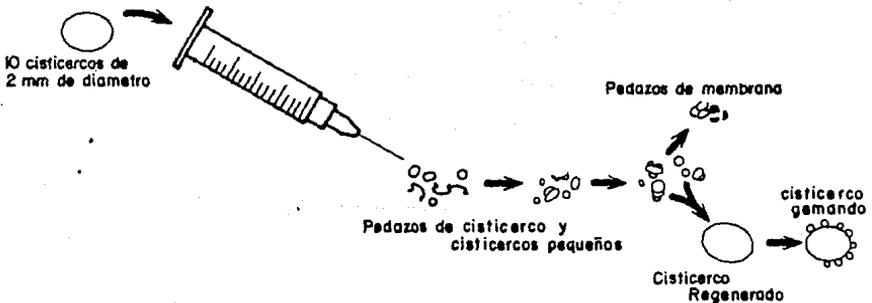


FIGURA 5. Evolución de la reorganización del cisticerco después de su inoculación al ratón.

Algunos cisticercos cuando son pasados por la jeringa únicamente se desinflan, y en un par de días empiezan a recuperarse. Otros en cambio, se rompen en distintos tamaños. Los fragmentos de membrana resultantes se organizan originando varios cisticercos pequeños, de los cuales, algunos maduran y se reproducen. Durante esta reorganización se forman conglomerados entre pedazos, y muchas veces presentan gemas que al parecer,

posteriormente se desprenden y originan a un nuevo cisticerco.

Se ha visto que la aguja de la jeringa utilizada no debe tener un diámetro menor a la del número 25 ya que de ser así , la recuperación del cisticerco no es evidente. Si el diámetro es mayor, los cisticercos ya no se rompen. Además, en la poza de cultivo debe haber un mínimo de 10 cisticercos pasados por una jeringa, ya que con cinco cisticercos la reorganización es pobre, y con un cisticerco, es nula.



FIGURA 6. Apariencia de fragmentos de cisticerco cultivados *in vitro*. En a) conglomerado de pedazos de cisticerco el cual tiende a producir muchas gemas; en b) pedazo de cisticerco aclarándose; y c) pedazo de cisticerco completamente recuperado.

MOVILIDAD DE CISTICERCOS IN VITRO

Observando la movilidad de los cisticercos se obtuvo el porcentaje de cisticercos que continúan móviles a lo largo de cinco días. Se encontró que no hay diferencias claras conforme pasan los días (FIGURA 7).

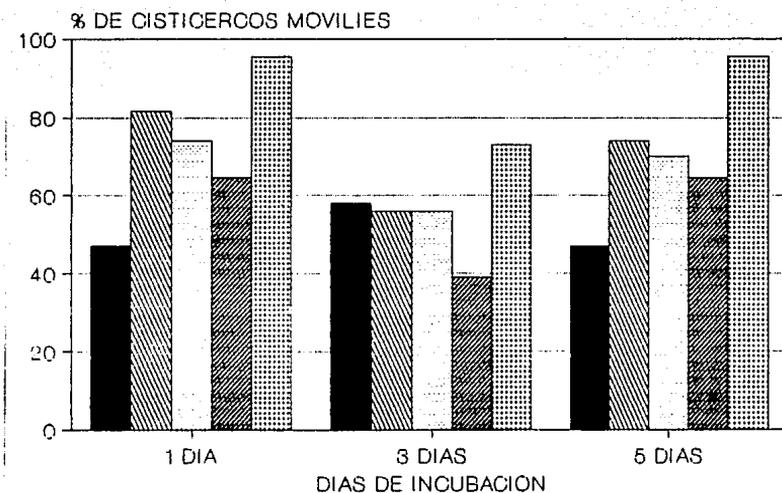


FIGURA 7. Cada barra representa el porcentaje de cisticercos móviles en una poza de cultivo. El experimento se realizó con cinco pozas, indicadas en la figura con un dibujo diferente. El porcentaje está calculado en base al número inicial de cisticercos móviles e inmóviles en el primer día de cultivo.

En un cultivo mixto de cisticercos y células provenientes del bazo de ratones machos y hembras, normales y parasitados, encontramos que los cisticercos cultivados en ausencia de células presentaron mayor movilidad que los que fueron cultivados junto con células (FIGURA 8). En el primer día de incubación, ninguna poza presentaba células.

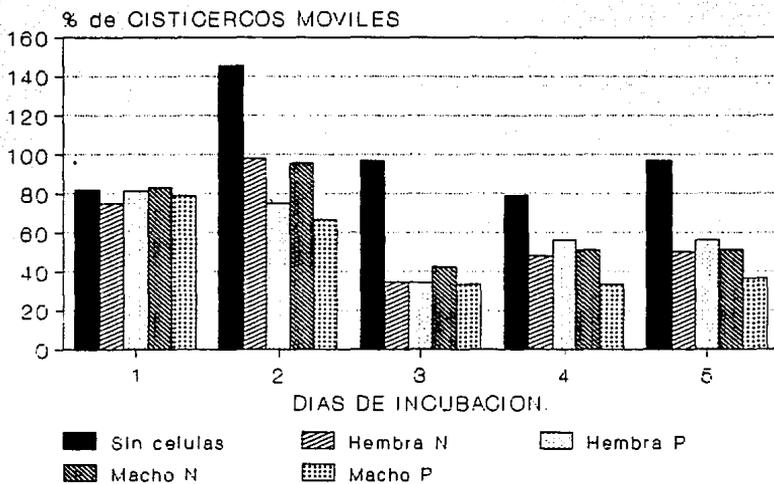


FIGURA 8. Cada barra indica el porcentaje de cisticercos móviles calculado de la misma manera que en la gráfica anterior. En el primer día, ninguna poza tenía células. Dos horas después les fueron agregadas 2.5 millones de células. "N" se refiere a normales y "P" a parasitados.

VIABILIDAD AFECTADA EN CISTICERCOS

Un parámetro más cuantificable para evaluar el estado del cisticerco en cultivo consiste en tomar en cuenta su viabilidad. Esta se determina inoculando a los cisticercos -previamente incubados *in vitro*- en la cavidad peritoneal del ratón y midiendo su carga parasitaria después de un mes de infectado.

EFFECTO DEL TIEMPO DE PREINCUBACION SOBRE LA VIABILIDAD DEL CISTICERCO

Para saber si el tiempo de incubación *in vitro* de los cisticercos afecta su viabilidad independientemente de si han estado o no en contacto con linfocitos o macrófagos, se hizo un cultivo de cisticercos sin células durante distintos periodos (FIGURA 9).

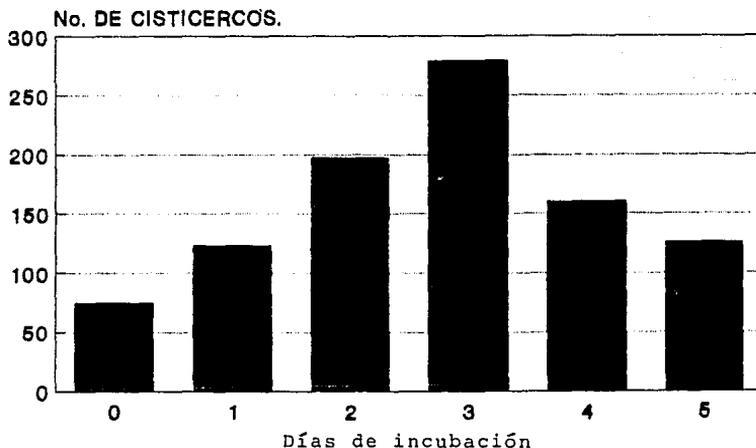


FIGURA 9. Cada barra representa el promedio de la carga parasitaria de cinco ratones después de un mes de haber sido infectados con pedazos de cisticerco previamente incubados *in vitro* durante 0-5 días. Como análisis estadístico se utilizó la regresión polinomial. Valor lineal= 7.7, $P < .05$; valor cuadrático= 46.1, $P < .01$; valor cúbico= no significativo, $P > .05$; valor cuártico= 9.5, $P < .01$

Evidentemente la infectividad de los cisticercos aumenta hasta un máximo en el tercer día, después del cual estos reducen su capacidad para invadir al huésped. El análisis estadístico por regresión polinomial confirma la tendencia recién mencionada.

EFFECTO DEL NUMERO DE CELULAS LINFOIDES SOBRE LA VIABILIDAD DEL CISTICERCO

Al agregar células del sistema inmune al cultivo de cisticercos rotos, observamos que tanto células provenientes de ratones machos inmunizados como de hembras inmunizadas tienen un efecto negativo sobre el desarrollo del parásito. El daño es más severo mientras más células se agreguen al cultivo (FIGURA 10).

a) Células de macho inmune

b) Células de hembra inmune

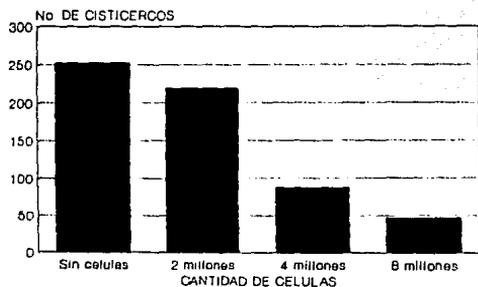
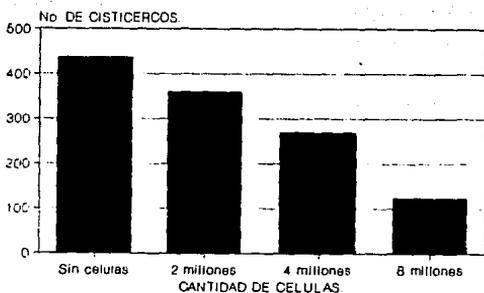


FIGURA 10. Los datos representan el promedio de la carga parasitaria de cinco ratones después de un mes de infectados con cisticercos previamente incubados con células. Para a) y b) se utilizaron dos fuentes distintas de cisticercos. Las células provienen del bazo de ratones a) machos inmunizados y en b) de hembras inmunizadas. Análisis estadístico por regresión lineal: HEMBRAS: Coeficiente de X= -293.6, R cuadrada= .576, grados de libertad= 12, probabilidad < .01; MACHOS: Coeficiente de X= -393.9, R cuadrada= .349, grados de libertad= 12, probabilidad < .05

Si bien, a simple vista parece que las células provenientes de ratones hembras inmunizadas disminuyen más la viabilidad de los cisticercos que las provenientes de machos inmunes (FIGURA 11), el análisis estadístico no encuentra diferencias significativas entre ellos.

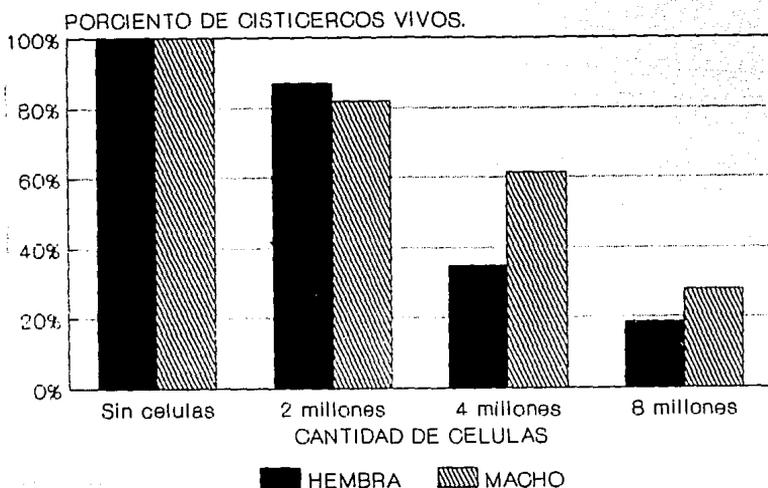


FIGURA 11. Cada barra representa el por ciento del promedio de cisticercos recuperados de cinco ratones después de un mes de infectados con respecto a los grupos que no presentan células. Los datos fueron obtenidos del experimento representado en la figura 10. El análisis estadístico por regresión lineal no muestra diferencias significativas entre hembras y machos.

DIFERENCIAS ENTRE CELULAS NORMALES E INMUNES

En otro cultivo mixto de cisticercos con 6 millones de células provenientes de ratones hembras y machos, normales e inmunizados se corrobora que no hay diferencias entre sexos en su capacidad de eliminar al parásito, sin embargo es evidente que las células de ratones inmunes disminuye más exitosamente la viabilidad del cisticerco que las células de ratones normales (FIGURA 12).

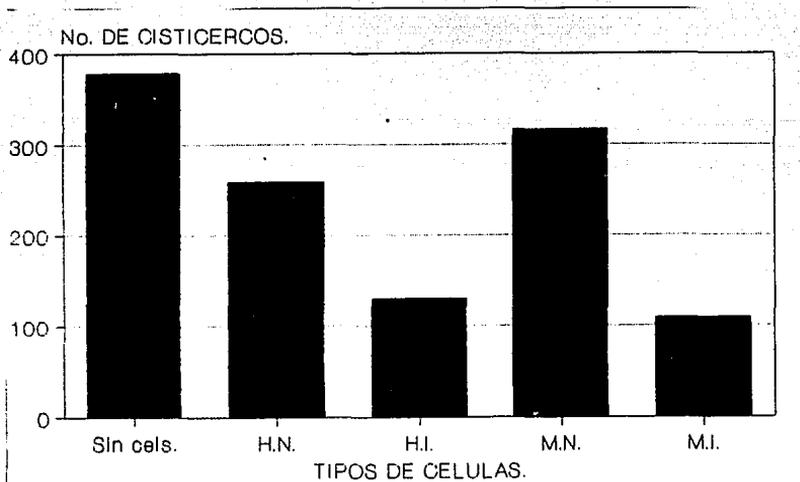


FIGURA 12. Cada barra representa el promedio de la carga parasitaria de cinco ratones después de un mes de infectados con cisticercos previamente incubados *in vitro*. "H" significa hembra; "M" macho; "N" normal e "I" inmune.

TABLA DE SIGNIFICANCIAS DE LA FIGURA 12.

	Sin céls.	H. Nor	H. Inm.	M. Nor.	M. Inm.
SIN CELULAS	---	NS	.003	NS	.004
HEMBRA NORMAL	NS	---	NS	NS	.042
HEMBRA INMUNE	.003	NS	---	.012	NS
MACHO NORMAL	NS	NS	.012	---	.011
MACHO INMUNE	.004	.042	NS	.011	---

Prueba de T student.

NS: No significativo ($p > .05$).

La prueba estadística indica que existen diferencias significativas entre los ratones inoculados con cisticercos incubados sin células y aquellos inoculados con cisticercos que estuvieron en contacto con células tanto de hembra como de macho inmune, presentando estos últimos una carga parasitaria menor a los primeros. Así mismo se observaron diferencias significativas entre los grupos de machos normales y machos inmunes, siendo los primeros los que provocaron una carga parasitaria mayor.

**OBSERVACION MICROSCOPICA DEL TIPO DE CELULAS LINFOIDES QUE SE
ADHIEREN A LOS CISTICERCOS**

Después de tres días de incubación con células, los cisticercos fueron fijados y se observó el tipo de células que presentaban en su superficie, las cuales no son fiel reflejo de las que originalmente se añadieron a la poza de cultivo.

**PORCIENTO DE CELULAS OBTENIDAS DE BAZO Y DE CELULAS
ENCONTRADAS SOBRE LOS CISTICERCOS**

	Linfocitos	Neutrófilos	Monocitos
HEMERA NORMAL	54/---*	39/---	8/---
HEMERA INMUNE	58/35	30/50	12/15
MACHO NORMAL	65/37	27/53	8/10
MACHO INMUNE	51/30	37/53	12/17

* El numerador indica el por ciento de células obtenidas del bazo del ratón; el denominador representa el por ciento de células encontradas sobre la superficie del parásito.

Tabla 2. Esta tabla representa el por ciento de los tipos celulares obtenidos del bazo de ratones y, el por ciento de las mismas encontradas sobre la superficie del parásito.

En resumen, mientras que el por ciento de células obtenidas del bazo estaban representadas por un 57% de linfocitos, 33% de neutrófilos y 10% de monocitos, sobre los cisticercos se observa un 34% de linfocitos, 52% de neutrófilos y 14% de monocitos.

DISCUSION

La observación del desarrollo *in vitro* de cisticercos rotos permitió el estudio de algunos aspectos de la relación de este parásito con el sistema inmune de su hospedero, lo cual resulta menos complicado que estudiarlo *in vivo*. En efecto, los cisticercos pasados por una jeringa se rompen, pero después algunos se reorganizan y más tarde se reproducen por gemación. Los animales capaces de gemar o de regenerar una porción de su cuerpo generalmente presentan células que funcionan de manera bastante independiente una de otra (Barnes 1985).

Debido a que algunos pedazos de cisticerco resultan viables y otros no, es posible pensar que aquellos pedazos de membrana provenientes del extremo adyacente al escólex (región donde se originan las gemas) sean los que resulten infectivos, y los provenientes de otros lugares, mueran y se desintegren.

Este periodo de reorganización es el que parece ser crítico en la adaptación del parásito con su hospedero ya que es el momento en que el cisticerco se encuentra más vulnerable al aparato inmune del ratón.

Tomando en cuenta la movilidad de los cisticercos, se observó que aquellos que habían estado incubados *in vitro* con células provenientes del sistema inmune disminuyeron su movilidad. Esta disminución en la movilidad podría deberse tanto al efecto inmunológico de las células linfoides sobre el cisticerco como a un fenómeno de espacio; las células podrían estar ocasionando un impedimento físico en la movilidad del metacéstodo. Sin embargo, la observación de la movilidad de los cisticercos es un tanto subjetiva, y aunque algo indica de su vitalidad, nada nos dice de su

capacidad para infectar al hospedero. En cambio, la evaluación de la viabilidad es un parámetro objetivo que directamente mide la infectividad del parásito.

La incubación de los cisticercos en ausencia de células durante distintos periodos de tiempo antes de ser inoculados a los ratones reveló importantes resultados. La capacidad infectiva de los fragmentos de cisticerco aumentó con el tiempo de cultivo hasta alcanzar una máxima infectividad al tercer día de incubación después del cual, comienza a decrecer. Este comportamiento sugiere que el cisticerco al ser inoculado directamente al ratón, sufre un daño que podría hacerlo más vulnerable al control del hospedero. En cambio, si se permitiera que el cisticerco se reorganizara sin obstrucción ambiental, el parásito se encontraría en mejores condiciones para invadir al ratón. Por otro lado, después de tres días de incubación, a pesar de que la mitad del medio de cultivo se cambiara diariamente, al cisticerco le empieza a faltar algo que debe resultar esencial para su buen desarrollo, ya que su capacidad infectiva disminuye. Nuestros experimentos nada nos dicen acerca de ésta disminución en la viabilidad.

Los cultivos de cisticercos *in vitro* a los cuales se agregaron células linfoides demostraron el efecto de éstas sobre el parásito. Añadiendo Il-2 a estos cultivos como estimulador de linfocitos T, se logró observar una clara disminución en la viabilidad de los cisticercos que habían estado incubados con células linfoides.

Utilizando seis millones de células linfoides se encontró que aquellas que provenían de ratones inmunes tenían un efecto mayor en la disminución de la viabilidad de los cisticercos que las células de ratones normales. Si bien entre ratones hembras normales e inmunes no se obtuvieron

diferencias significativas, los datos sugieren que aumentando el número de muestras en los experimentos la diferencia podría resultar evidente. Estos resultados concuerdan con lo que ocurre *in vivo* y apoyan la idea de la importancia de una preestimulación del sistema inmune para lograr combatir con mayor eficiencia al metacéstono (Larralde *et al* 1989).

En esta parasitosis se observa que *in vivo* los ratones hembras son mucho más susceptibles que los machos, sin embargo, sorprendentemente, los estudios *in vitro* han revelado que no hay diferencias significativas en el efecto de las células de ambos sexos sobre el crecimiento parasitario. Esto podría sugerir que las células inmunes al ser extraídas del organismo se privan de la influencia vigente de las hormonas del entorno; además podría ser que la Il-2 que se agrega al medio ayude a eliminar las diferencias aumentando la eficiencia de las células de hembra de tal manera que logran semejar a la de los machos.

Se ha observado que la exposición prenatal de ratones a hormonas sexuales afecta la capacidad inmune evidenciada por cambios permanentes en el número de linfocitos, producción de Il-2, producción de anticuerpos y actividad de las células NK (Ansar, Penhale & Talal 1985). Sin embargo, las gonadectomías de ratones de ambos sexos con cuatro semanas de edad provocan una tendencia a igualar la susceptibilidad a la infección por cisticercos de *T. crassiceps* (Huerta *et al* 1991). Esto indica que el efecto de las hormonas sobre el sistema inmune es esencial tanto en el desarrollo del hospedero como de manera continua durante la vida de éste.

Así, las células cultivadas *in vitro* en estos experimentos podrán estar ya diferenciadas sexualmente por el efecto que tuvieron las hormonas sobre ellas antes de que fueran extraídas del ratón. Sin embargo, este efecto no debió ser suficiente y al sacarlas de un medio donde el estímulo

hormonal era constante, las células se volvieron "más o menos" asexuadas y no lograron combatir al parásito de manera distinta entre machos y hembras. Así, la diferente susceptibilidad entre sexos puede estar determinada por efectos prenatales y continuos de hormonas sexuales sobre el sistema inmune del hospedero. Si bien esta idea es muy llamativa, es necesario tomar en cuenta que el suero fetal bovino que se utiliza en los cultivos *in vitro* contiene muchas proteínas, entre las cuales bien podrían hallarse hormonas que homogeneizaran sexualmente a todas las células.

Por otro lado, en apoyo a la posibilidad del papel que pueda desempeñar la Il-2, existen experimentos (Ansar, Dauphinee & Talal 1985) que demuestran que el estrógeno depleta los niveles de Il-2, y en base a esto, se podría suponer que la Il-2 *in vivo* no se encuentra en concentraciones suficientes en las hembras para permitirles combatir esta infección, y al agregarla de manera conveniente al medio de cultivo, la efectividad de éstas se vuelve equiparable a la de machos.

Es de mucho interés conocer el tipo de células que más ligadas se encuentran al cisticerco macroscópicamente. Era de esperarse que no se encontraran diferencias en el tipo de células obtenidas del bazo de hembras y machos, normales e inmunes, ya que probablemente lo que los haga distintos sean las subpoblaciones de linfocitos, lo cual no se apreciaba con el método de tinción utilizado. Por otro lado, a pesar de que en la muestra de células agregadas a los cultivos mixtos predominaron los linfocitos representando aproximadamente el 55 %, sobre la superficie de los cisticercos predominaron los neutrófilos constituyendo un 50%. Esto puede deberse a la manera en que actúan estos tipos de células. Los linfocitos, si bien algunos podrían actuar directamente sobre el parásito liberando enzimas líticas como los linfocitos T citotóxicos (Bach 1984),

los demás (T cooperadores y T supresores) son células de actividad indirecta que liberan factores solubles los cuales regulan la actividad de otras células (Roit 1988). En cambio, los neutrófilos son células efectoras, que de manera análoga a los linfocitos T citotóxicos y por mecanismos de fagocitosis, eliminan directamente al organismo extraño. Por lo pronto nuestros resultados no señalan cuáles son las células que desempeñan el papel más importante en la confrontación hospedero-parásito, ya que si bien hay más neutrófilos que linfocitos sobre el cisticerco, no se sabe cual daña de manera más eficiente.

Los próximos trabajos a realizarse consistirán en agregar hormonas femeninas y masculinas al cultivo mixto de cisticercos y células linfoides. Esto es con el fin de averiguar si las células requieren o no ser estimuladas continuamente para presentar una diferencia *in vitro* en la susceptibilidad a esta cisticercosis y para corroborar hallazgos de otros autores (Grossman 1984) que sugieren que la testosterona no afecta directamente la acción de los linfocitos periféricos (al parecer por no presentar receptores) si no que lo hacen modificando el medio tímico. También, con el mismo modelo intentaremos elucidar de manera específica las poblaciones celulares involucradas en el combate del hospedero contra el parásito. Pensamos que la combinación óptima de células y/o moléculas para esta lucha en favor del hospedero, se podrá determinar con este modelo experimental *in vitro*.

CONCLUSIONES.

Se estableció un modelo *in vitro* de la confrontación que suscita la inoculación de cisticercos de *T. crassiceps* en ratones de la cepa BALB/C.

Con este sistema se observó que:

1. Los cisticercos al ser inoculados al hospedero y romperse, son capaces de reorganizarse para constituir después varias unidades infectivas. Su agresividad aumenta en cuanto mejor reorganizado se encuentre al momento del desafío.
2. Las células linfoides afectan negativamente la viabilidad del cisticerco. Aquellas que provienen de ratones inmunizados resultan más efectivas que las provenientes de ratones normales.
3. *In vitro* y sin hormonas no se observan diferencias en la susceptibilidad a esta parasitosis entre las células linfoides provenientes de distinto sexo; al parecer es necesario un estímulo constante de las hormonas sobre las células del sistema inmune.

APENDICE 1. CICLO DE VIDA DE *TAENIA SOLIUM*.

Taenia solium es un helminto perteneciente a la clase Cestoda y al phylum Platelmineto. Es un gusano aplanado y alargado que puede llegar a medir entre 2 y 7 metros de longitud. En la parte anterior del cuerpo presenta un escólex adaptado para adherirse al epitelio intestinal del huésped. El escólex se continúa con el cuello, porción germinal que da origen a los proglótidos que conforman la siguiente y última porción corporal, el estróbilo. Esta región está formada por 800 a 1000 proglótidos, cada uno de los cuales constituye una unidad de reproducción (Flisser & Malagón 1989).

Cuando una persona ingiere un cisticerco -proveniente siempre de la carne de cerdo mal cocida- el parásito evagina y se convierte progresivamente en una taenia adulta. Este proceso ocurre en el canal alimenticio del huésped y requiere de la presencia de pepsina, tripsina y sales biliares para llevarse a cabo. La taenia entonces se ubica en el intestino delgado y se adhiere con ganchos y ventosas al epitelio. Diariamente este gusano libera miles de huevecillos que son excretados por el huésped. Estos huevecillos llegan así al drenaje de aguas negras, mismas que se utilizan de riego, provocando así su dispersión (Aluja *et al.* 1982).

El desarrollo ulterior de estos huevos continúa únicamente cuando son ingeridos por el cerdo o el hombre. Cuando esto ocurre, el huevo alcanza vasos sanguíneos o linfáticos y es transportado a cualquier tejido, en donde se desarrolla un cisticerco (FIGURA 13).

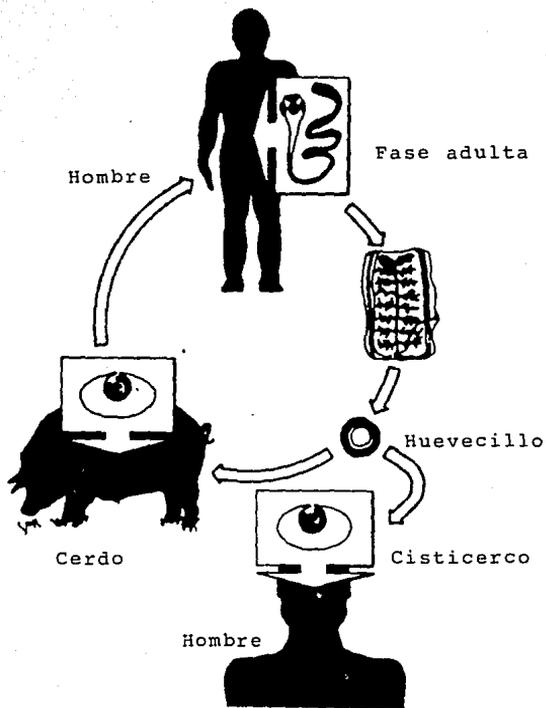


FIGURA 13. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

APENDICE 2. CICLO DE VIDA DE *TAENIA CRASSICEPS*.

Taenia crassiceps es un céstodo que requiere de un huésped definitivo para desarrollar la forma adulta y de un huésped intermediario en el cual pasa su etapa larvaria.

En su etapa adulta este parásito es un gusano aplanado dorsoventralmente que mide de 70 a 140 mm de longitud y 2.4 mm de diámetro. Presenta dos coronas de ganchos y cuatro ventosas en la porción anterior, lo cual le ayuda a fijarse en el epitelio intestinal del huésped; específicamente se aloja en el tercio medio del intestino delgado.

A la forma larval se le conoce comúnmente como cisticerco, *Cysticercus longicollis*, el cual es una vesícula con tres pares de ganchos que terminan en forma aguda. Una vez desarrollados miden de .87mm a 1cm de diámetro.

El huésped definitivo de este parásito es el zorro rojo *Vulpes vulpes* en Europa y el zorro ártico *Alopex lagopus innuitus* en Norteamérica. Se han reportado otras infecciones naturales en lobos, perros y coyotes. El huésped intermediario incluye a diversos roedores pequeños.

Los roedores se infectan al ingerir heces contaminadas con huevecillos de *T. crassiceps*. Estos huevecillos se encuentran protegidos por una serie de membranas estriadas que son removidas al exponerse a los jugos digestivos en el intestino. Se presume que el pretratamiento del huevo con jugos del estómago no es suficiente para la remoción de las membranas estriadas (Freeman 1962).

Una vez liberado el huevo de sus membranas, el embrión atraviesa la pared intestinal del huésped y migra a través de los ductos linfáticos a diversos tejidos. En orden de intensidad, el cisticerco de este parásito se aloja: en tejido subcutáneo de cuello, extremidades, axila, abdomen,

espalda y pecho; en cavidad peritoneal; en el cerebro (con reproducción asexual muy lenta); cavidad pleural; y corpus adiposum del ojo (Del Valle 1989).

El cisticerco de *T. crassiceps* tiene la capacidad de reproducirse asexualmente por gemación exógena a partir de la porción adyacente al escólex (Freeman 1962), característica que ha sido aprovechada para mantenerlo en el laboratorio.

Cuando el zorro o algún otro cánido devora un roedor contaminado con cisticercos adquiere la enfermedad. Estos cisticercos se "activan" por enzimas digestivas y sales biliares en su trayecto hacia el intestino delgado. Una vez allí, evaginan su escólex y con su corona de ganchos y ventosas se adhiere a la mucosa intestinal. Posteriormente comienza a formar proglótidos a partir de la región inferior del cuello, y después de 5 ó 6 semanas ya son un organismo adulto. Cada proglótido equivale a una unidad de reproducción sexual (FIGURA 14).

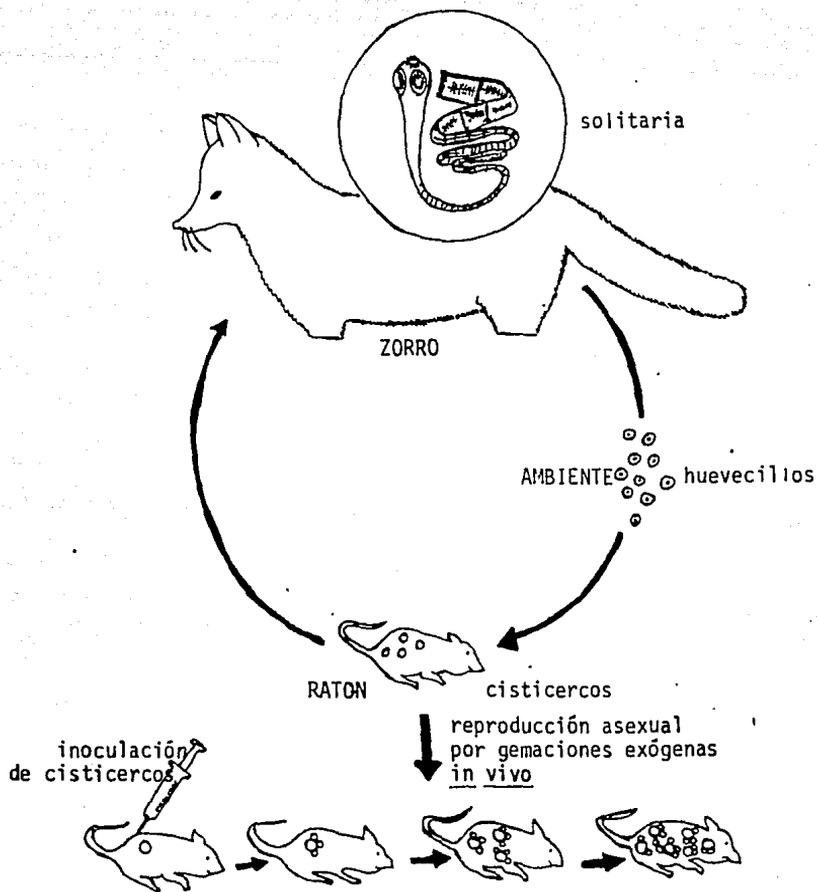


FIGURA 14. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

BIBLIOGRAFIA

ANSAR, A.; PENHALE, WJ.; TALAL, N. (1985). Sex hormones, Immune responses, and Autoimmune diseases. American Journal of Pathology 121: 531-551.

ANSAR, A.; DAUPHINEE, M.; TALAL, N. (1985). Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. The Journal of Immunology 134 (1):204-210.

ALUJA, A.; ESCOBAR, A; ESCOBEDO, F.; FLISSER, A.; LACLETTE, JP.; LARRALDE, C.; MADRAZO, I.; VELAZQUEZ, V.; WILLMS, K. (1987) "Cisticercosis". Fondo de Cultura Económica, México.

BACH JF. (1984). "Inmunología". Ed.Limusa, México, 908 pags.

BARNES, . (1986). "Zoología de Invertebrados". Ed. Interamericana México, p.p. 213.

BOJALIL, R.; TERRAZAS, L.I.; GOVEZENSKY, T.; SCIUTTO, E.; LARRALDE, C. (1991). *Taenia crassiceps*: Delayed hypersensitivity and resistance to experimental murine cysticercosis. Manuscrito en preparación.

BUTTERWORTH, M.; McCLELLAND, B.; ALLANSMITH, M. (1967). Influence of sex on immunoglobulin levels. Nature 214 : 1224.

DEL VALLE, B. (1989). Larvae of *Taenia crassiceps* (Cestoda): host specificity and localisation. Parasitol.Res. 76 : 181-182.

FLISSER, A. Y MALAGON, F. (1989). "Cisticercosis humana y porcina". Limusa, México, D.F. P.p.: 3-6, 233-242.

FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; ESTRADA, I.; LARRALDE, C. (1990). Susceptibilidad genética a infecciones parasitarias murinas. Enviado para su publicación a Revista Latinoamericana de Microbiología.

FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; DIAZ, ML.; RUIZ, B.; MONTOYA, RM.; GOVEZENSKY, T.; SANCHEZ, I.; LOMELI, C.; ROSENSTEIN, Y.; LARRALDE, C. (1991). Sharing of MHC (H-2) antigens and related DNA sequences between host and parasite are strongly related to growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. Enviado para su publicación al Journal of Immunology.

FREEMAN, R.S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolph 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology 10: 969-990.

FREEMAN, R.S. (1986). "Microbiología". Ed. Interamericana, Barcelona.

GRAFF, RJ.; LAPPE, MA.; SNELL, GD. (1969). The influence of the gonads and adrenal glands on the immune responses to skin grafts. Transplantation 7: 105-111.

GROSSMAN, C.; (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. Endocrin. Review. 5 (3): 435-454.

HUERTA, L.; TERRAZAS, I.; SCIUTTO, E.; LOMELI, C.; MONTOYA, RM.; DIAZ, ML.; GOVEZENSKY, T.; LARRALDE, C. (1991). Immunological mediation of gonadal influence on experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). Manuscrito en preparación.

LARRALDE, C.; SCIUTTO, E.; GRUN, J.; DIAZ, ML.; GOVEZENSKY, T.; MONTOYA, RM. (1989). Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*: influence of sex, mayor histocompatibility complex and vaccination. In: "Cell Function and Disease", pp. 325-332 Canedo, L., Todd, L., Packer, L., Jaz, J. (Eds.). Plenum Publishing Corporation.

LARRALDE, C.; SCIUTTO, E.; HUERTA, L.; TERRAZAS, I.; FRAGOSO, G.; TRUEBA, L.; LEMUS, D.; LOMELI, C.; TAPIA, G.; MONTOYA, RM.; DIAZ, ML.; GOVEZENSKY, T. (1989). Experimental Cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 57(2): 131-134.

REDDINGTON, JJ.; STEWART, GL.; KRAMAR, GW.; KRAMAR, MA. (1981). The effects of host sex and hormones in *Trichinella spiralis* in the mouse. *J. Parasitol.* 67(4): 548-555.

ROIT, I. (1988). "Essential Immunology". Blackwell Scientific Publication. London, 286pages.

SEIFERT, B.; GEYER, E. (1989). Inhibition of in vitro and in vivo mast cell degranulation by *Taenia crassiceps* metacestodes in vitro incubation products. *International Journal of Medical Microbiology* 271 (4) : 521-531.

SIEBERT, A.; GOOD, A.; SIMMONS, E. (1978). Kinetics of primary and secondary infections with *Taenia crassiceps* metacestodes (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: Cyclophyllidea). *Int. Journal for Parasitology*. 8:39-43.

SIEBERT, A.; GOOD, A. (1979). *Taenia crassiceps*: Effect of normal and immune serum on metacestodes in vitro. *Exp. Paras.* 48: 164-174.

SIEBERT, A.; GOOD, A. (1980). *Taenia crassiceps*: Immunity to metacestodes in Balb/c and BFD1 mice. Exp.Paras. 50: 437-446.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; TRUEBA, L.; LEMUS, D.; MONTOYA, RM.; DIAZ, ML.; GOVEZENSKY, T.; LOMELI, C.; TAPIA, G.; LARRALDE, C. (1990). Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. Parasite Immunology 12: 687-696.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; DIAZ, ML.; VALDEZ, F.; MONTOYA, RM.; GOVEZENSKY, T.; LOMELI, C.; LARRALDE, C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. Manuscrito en preparación.

SCIUTTO, E.; DIAZ, ML.; FRAGOSO, G.; GOVEZENSKY, T.; MONTOYA, RM.; LARRALDE, C. (1991)b. Role of antibodies in experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. Manuscrito en preparación.

WEINSTEIN, Y.; RAN, S.; SEGAL, S. (1984). Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. The Journal of Immunology 132 (2): 656-661.

WOODHOUSE, E.; FLISSER, A.; LARRALDE, C. (1982) Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. In "Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives". pp. 11 - 23 . Flisser, A.; Willms, K.; Lacleste, J.P.; Larralde, C.; Riadura, C.; Beltrán, F. (Eds.) Academic Press, New York.