

01663



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

N:1
2Ej.

EVALUACION DEL GLICOCALIX DE FASCIOLAS ADULTAS
COMO INMUNOGENO CONTRA LA INFECCION POR
Fasciola hepatica EN CONEJOS

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
AREA DE MEDICINA PREVENTIVA

P r e s e n t a:

MVZ Miguel Angel García Ortiz

A S E S O R:

M.V.Z. M.SC. Carlos Ramón Bautista Garfias

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

EVALUACION DEL GLICOCALIX DE FASCIOLAS ADULTAS COMO INMUNOGENO
CONTRA LA INFECCION POR Fasciola hepatica EN CONEJOS

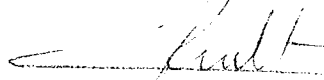
Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

MIGUEL ANGEL GARCIA ORTIZ

marzo de 1994

APROBADA POR



MVZ MSc. CARLOS RAMON BAUTISTA GARFIAS
Asesor Principal

RESUMEN

GARCIA ORTIZ, MIGUEL ANGEL. Evaluación del glicocálix de fasciolas adultas como inmunógeno contra la infección por Fasciola hepatica en conejos (Bajo la dirección de CARLOS RAMON BAUTISTA GARFIAS).

Se evaluó la inducción de inmunidad protectora contra Fasciola hepatica por medio de un ensayo exploratorio y dos ensayos experimentales, en los cuales se observó la respuesta a seis cantidades de glicocálix (GLX) de fasciolas adultas (2, 1, 0.5, 0.25, 0.13 y 0.07 mg) y a dos cantidades de Adyuvante Completo de Freund (0.5 y 0.25 ml) en el modelo experimental del conejo. Todos los tratamientos fueron administrados en un volumen total de 1 ml por vía intraperitoneal, posteriormente todos los conejos fueron confrontados con metacercarias de F. hepatica por vía oral. No se observaron diferencias entre los grupos tratados y los grupos control de infección para los parámetros: número y longitud de parásitos; ganancia de peso, mortalidad y peso del hígado del conejo. En la fluctuación de inmunoglobulinas IgG contra un extracto crudo de F. hepatica, mediante una prueba de ELISA, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre el grupo tratado con 0.07 mg de GLX y el grupo control de infección; también se observaron diferencias ($P < 0.005$) entre el grupo control de infección y el grupo control no infectado contra un extracto crudo y contra productos de excreción/secreción de F. hepatica; en los demás tratamientos no se encontraron diferencias. En el presente estudio

DATOS BIOGRAFICOS

El autor nació en México, D.F., el 6 de febrero de 1957. Efectuó sus estudios de licenciatura en la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México que le otorgó el título de Médico Veterinario y Zootecnista en 1984.

De 1983 a 1987 y de 1989 a 1992 trabajó en el Campo Experimental Forestal y Agropecuario de Morelia, Michoacán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Actualmente está adscrito al Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria del INIFAP, SARH en Jiutepec, Morelos. Ha participado como ponente y organizador en congresos, reuniones de investigación y cursos cortos de actualización; ha publicado en Técnica Pecuaria en México.

En 1987 se inscribió como estudiante de posgrado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, Area de Medicina Preventiva.

A Guillermina
mi hija y mi esposa
por nuestro proyecto de vida.

A mis padres:

Profra. Esperanza Ortiz López
Prof. Camerino García Jaimes

A mis suegros:

Sra. Josefina Ramírez Villarruel
Sr. Victor Avila Armas

pilares de nuestra familia.

A la memoria del maestro
Dr. J. Rafael A. Mejía García
por su mística y disciplina.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Ramón Bautista Garfias por su acertada dirección y conducción del presente estudio.

A la Q. Rosa María Sánchez Manzano de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por su desinteresada ayuda en la obtención del material antigénico evaluado.

A la MCB Guillermina Avila Ramírez por su asesoría en la realización de las pruebas inmunológicas.

Al Dr. Froylán Ibarra Velarde, al B. Láuro Trejo Castro y a la B. Natividad Montenegro Cristino por su desinteresada ayuda en la obtención de las metacercarias de Fasciola hepatica.

Al Dr. Esteban Labranderos Iñiguez y a los compañeros del Bioterio del CENID-Microbiología del INIFAP-SARH por su apoyo en la obtención de los animales empleados en el presente estudio.

A las autoridades y empleados del Rastro Municipal de Toluca, México por sus facilidades en la adquisición del material biológico.

A los Drs. Froylán Ibarra V., Ma. Teresa Quintero M., Antonio Morilla G., Carlos Rosales O., y C. Ramón Bautista G., así como a la MCB Guillermina Avila Ramírez por su interés en la revisión del texto.

A los Drs. Carlos Agustín Vega y Murguía, Ramón Claverán Alonso, Everardo González Padilla, Ana Flisser Steinbruch, Federico Rodríguez Garza y Diódoro Batalla Campero por su interés y facilidades en la ejecución de las diferentes etapas del estudio.

A la MCB Guillermina Avila Ramírez, al Ing. Ignacio Vidales Fernández y a los Drs. José Arce Menocal, Fernando Duarte Vera y David Herrera Rodríguez por su comprensión y apoyo en los momentos difíciles.

A las familias García Ortiz y Avila Ramírez por su apoyo y amor brindado.

A mis amigos y compañeros de posgrado de la FMVZ de la UNAM, del Campo Experimental Forestal y Agropecuario de Morelia, Michoacán y del Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria de Jiutepec, Morelos del INIFAP-SARH por su amistad y solidaridad en estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, registro 54022; así como al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos por el apoyo económico para la realización de los estudios de posgrado. De igual manera al INIFAP-SARH su apoyo económico para la realización del presente estudio.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
PRESENTACION DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	3
PRESENTACION DE LA ENFERMEDAD	3
RESPUESTA INMUNE	8
JUSTIFICACION	13
HIPOTESIS	16
OBJETIVO	16
MATERIAL Y METODOS	17
METODOS	17
TECNICAS	24
DISEÑO EXPERIMENTAL	31
ANALISIS ESTADISTICO	32
RESULTADOS	37
MODELO EXPERIMENTAL	37
NUMERO DE FASCIOLAS	37
LONGITUD DE FASCIOLAS	40
GANANCIA DE PESO EN EL CONEJO	43
PESO DEL HIGADO	47
ANTICUERPOS IgG	49
CUADROS Y FIGURAS	54

DISCUSION	85
NUMERO PROMEDIO DE FASCIOLAS	85
LONGITUD PROMEDIO DE FASCIOLAS	88
GANANCIA DE PESO EN EL CONEJO	88
PESO DEL HIGADO	89
ANTICUERPOS IgG	91
GLICOCALIX COMO INMUNOGENO	92
CONCLUSIONES	94
LITERATURA CITADA	95

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro.</u>		<u>Página.</u>
1.	Diseño del ensayo exploratorio.	34
2.	Diseño del primer ensayo.	35
3.	Diseño del segundo ensayo.	36
4.	Número promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del ensayo exploratorio.	54
5.	Número promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del primer ensayo.	55
6.	Número promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del segundo ensayo.	55
7.	Longitud promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del ensayo exploratorio.	57
8.	Longitud promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del primer ensayo.	58
9.	Longitud promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del segundo ensayo.	58
10.	Anch. promedio de las fasciolas recuperadas a la necropsia en los conejos del segundo ensayo.	60
11.	Ganancia de peso promedio de los conejos durante el ensayo exploratorio.	61
12.	Ganancia de peso promedio de los conejos durante el primer ensayo.	62
13.	Ganancia de peso promedio de los conejos durante el segundo ensayo.	62

<u>Cuadro.</u>	<u>Página.</u>
14. Peso promedio del hígado de los conejos a la necropsia durante el ensayo exploratorio.	64
15. Peso promedio del hígado de los conejos a la necropsia durante el primer ensayo.	65
16. Peso promedio del hígado de los conejos a la necropsia durante el segundo ensayo.	65
17. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el ensayo exploratorio.	67
18. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el primer ensayo.	72
19. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	74
20. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra productos de excreción/secreción de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	77
21. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	78
22. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra productos de excreción/secreción de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	78
23. Efecto del tratamiento en los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el ensayo exploratorio.	81

Cuadro.

Página.

24.	Efecto del tratamiento en los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el primer ensayo.	82
25.	Efecto del tratamiento en los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	83
26.	Efecto del tratamiento en los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra productos de excreción y secreción de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	84

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura.</u>	<u>Página.</u>
1. Número promedio de parásitos obtenidos a la necropsia en los conejos.	56
2. Longitud promedio de parásitos obtenidos a la necropsia en los conejos.	59
3. Ancho promedio de parásitos obtenidos a la necropsia en los conejos del segundo ensayo.	60
4. Ganancia de peso promedio de los conejos.	63
5. Peso promedio del hígado de los conejos a la necropsia.	66
6. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el ensayo exploratorio, subgrupo a.	68
7. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el ensayo exploratorio, subgrupo a.	69
8. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el ensayo exploratorio, subgrupo b.	70
9. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el ensayo exploratorio, subgrupo b.	71
10. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el primer ensayo.	73
11. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	75

<u>Figura.</u>	<u>Página.</u>
12. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra un extracto crudo de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	76
13. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra productos de excreción/secreción de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	79
14. Valores de absorbancia a 405 nm obtenidos en el ELISA para anticuerpos IgG de conejo contra productos de excreción/secreción de <u>F. hepatica</u> durante el segundo ensayo.	80

1. INTRODUCCION

- A) PRESENTACION DEL PROBLEMA A INVESTIGAR.
- B) ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.
- C) JUSTIFICACION.
- D) HIPOTESIS.
- E) OBJETIVO.

A. PRESENTACION DEL PROBLEMA A INVESTIGAR:

En México la fasciolosis es la única enfermedad causada por trematodos económicamente importante para los rumiantes domésticos (18). Su ocurrencia está en función de la presencia de ecosistemas adecuados donde coexistan los hospederos definitivos, los hospederos intermediarios y el parásito. De esta manera la presentación de esta parasitosis es endémica en la mayor parte de la República (58).

Debido a su importancia económica, el control de la fasciolosis ha sido y es objeto de estudio. En México, el control se ha realizado principalmente hacia el parásito adulto mediante antihelmínticos. Otros métodos alternos incluyen el control de los hospederos intermediarios, el uso de diferentes sistemas de manejo y el control del hospedero definitivo por inmunización o vacunación (58).

La inmunización de un animal contra una enfermedad puede ser mediante la inmunidad pasiva, por medio de la cual se consigue una resistencia temporal merced a la transferencia a un animal susceptible de los anticuerpos o células procedentes de un animal resistente, o mediante la inmunización activa, para lo cual se aplica un antígeno determinado al animal con el propósito de estimular una respuesta inmune que puede estar mediada por anticuerpos, por células o por ambos (72).

En el caso particular de Fasciola hepatica, todas las especies animales infectadas producen anticuerpos contra el parásito, pero estos no son necesariamente protectores. Los antígenos de F. hepatica se pueden agrupar en antígenos somáticos o estructurales y antígenos metabólicos o productos de excreción/secreción (5).

Los ensayos de inmunización pasiva o activa, así como los estudios de la fasciolosis natural o experimental han comprobado diferentes grados de respuesta inmune que confieren cierta protección ante una reinfección o desafío experimental. Esta protección ha sido evidente al observar la elevación del título de anticuerpos a la par de la reducción del tamaño de las fasciolas y de la mortalidad de los animales inmunizados; sin embargo, el período de protección ha sido corto y la reducción del número de fasciolas no ha sido significativa (5).

B. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS:**PRESENTACION DE LA ENFERMEDAD****Fasciola hepatica**

Género: Fasciola Linnaeus, 1758

Especie: Fasciola hepatica Linnaeus, 1758

Este parásito se localiza en el hígado de ovinos, caprinos y bovinos; sin embargo, llega también a parasitar al hombre y en general puede parasitar a cualquier mamífero; ocasionalmente se localiza en forma errática en pulmones y tejido subcutáneo (2, 70).

Su ciclo biológico es indirecto. Los hospederos intermediarios de Fasciola hepatica, son caracoles de la familia Lymnaeidae que se localizan desde los 100 m a los 3,200 m S.N.M.; se han identificado más de 40 especies del género Lymnaea; sin embargo, algunos autores los identifican con el nombre genérico de Fossaria galva, Pseudosuccinea y Stagnicola. En México se han identificado como hospederos intermediarios siete especies, las cuales a partir de abril de 1993 se reconocen como: Fossaria humilis, Bakerilymnaea cubensis, Fossaria bulimoides, Lymnaea

Fossaria obrusa, Pseudosuccinea columella, Lymnaea Stagnalis attenuata y Lymnaea Stagnalis palustris ¹

Morfología.

El adulto tiene forma de hoja, la parte anterior se caracteriza por tener una proyección cónica central que se continua con unos "hombros", esta porción es más ancha que la posterior. Su tamaño oscila entre 18 a 50 mm de largo por 4 a 14 mm en la parte anterior más ancha. Es de color café rosa grisáceo, la zona más ancha y oscura de la vitelaria se puede observar a simple vista. La cutícula esta cubierta de espinas que desaparecen con el tiempo. Posee una ventosa oral situada en el extremo de la proyección cónica central de la parte anterior y otra ventosa ventral a la altura de los "hombros"; el tubo digestivo es bifurcado, forma dos ciegos que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo (13, 27, 44, 70).

El poro genital se halla debajo de la ventosa ventral; los parásitos son monoicos, cada individuo posee aparato reproductor masculino y femenino. Los huevos son operculados y amarillentos, miden en su diámetro mayor de 130 a 150 micras y en el diámetro menor de 3 a 90 micras (13, 27, 44, 70).

¹ Trejo C.,L.: Epidemiología de los huéspedes intermediarios de Fasciola hepatica en México. Mesa redonda sobre fasciolosis. III Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, Mérida Yucatán, octubre 4-6 (1993).

Ciclo evolutivo.

Los parásitos localizados en el conducto biliar liberan sus huevos a través de la bilis, los que abandonan al hospedero definitivo junto con las heces. En el suelo, en un medio hídrico adecuado, el miracidio abandona el huevo e inmediatamente busca y penetra al hospedador intermediario. Dentro del caracol se reproduce asexualmente y se desarrollan los estadios de esporoquistes y redias; al terminar esta etapa se forman las metacercarias las cuales abandonan a los caracoles y se enquistan en vegetales y objetos que rodean su entorno; las etapas de miracidio y cercaria necesitan un medio hídrico para su desplazamiento; la fase infectante la constituye la cercaria enquistada o metacercaria. El hospedero definitivo adquiere la fasciolosis en forma pasiva al ingerir alimento contaminado con metacercarias; en el intestino las fasciolas se liberan de su quiste, atraviesan la pared intestinal y migran a través de la cavidad abdominal; al llegar al hígado perforan su pared, penetran y en este órgano tienen una etapa de migración errática; finalmente alcanzan su madurez en los conductos biliares. Desde que el huevo se liberó por bilis y se desarrolló en una nueva fasciola madura tuvieron que pasar entre 17 y 18 semanas por lo menos (13, 27, 44, 70).

Patogénesis.

El daño ocasionado en el hígado depende del número de parásitos, de su sobrevivencia o muerte, y de la reacción tisular

del hospedero definitivo. Al penetrar los parásitos en el hígado, las células de este órgano son destruidas. Cuando el hospedero se parasita con una cantidad grande de metacercarias el daño en el hígado es extenso, conduciendo a un síndrome agudo caracterizado por anemia, eosinofilia, peritonitis y a menudo muerte. La presencia del parásito en los conductos biliares estimula considerablemente la reacción tisular; el epitelio biliar y la mucosa de la vesícula biliar pueden estar hiperplásicas. A menudo se observa la obstrucción parcial o total de los conductos biliares debido a una proliferación fibrosa pudiendo llegar a la calcificación en las áreas fibróticas. La cicatrización alrededor de los conductos biliares puede alcanzar el interior de los lóbulos hepáticos, lo cual puede afectar grandes porciones del órgano. En infestaciones persistentes, la elevación de enzimas hepáticas en suero, la eosinofilia, la hipoproteïnemia y la anemia progresiva son hallazgos comunes. La hipoproteïnemia se atribuye a la pérdida de plasma a través de los conductos biliares. La anemia es comúnmente normocítica normocrómica; la síntesis de albúmina no está comprometida (39, 69).

Distribución geográfica.

Fasciola hepatica tiene una distribución geográfica mundial. En México la mayor parte del territorio no es apta para la presentación de la fasciolosis, sin embargo, las zonas más ricas en ganado, por disponer de agua y tierras fértiles, mantienen la enfermedad en forma enzoótica. Este parásito ha sido señalado en

todos los estados de México, excepto en Baja California Sur, Yucatán y Quintana Roo; las razones en el primero son falta de humedad y en el segundo y tercero la presencia de suelos calcáreos con buen drenaje. La información disponible indica que los estados que mantienen una alta prevalencia de la enfermedad son Tabasco y Veracruz; le siguen con una mediana prevalencia los estados de México, Guanajuato, Michoacán, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Jalisco, Durango, Aguascalientes, Sinaloa, Oaxaca y Chiapas; en contraste, los estados de Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí son considerados estados con baja prevalencia de fasciolosis (59).

Transmisión.

La mayor transmisión de Fasciola ocurre en el período de lluvias en zonas con temporales definidos, sin embargo en las zonas con humedad permanente las condiciones de transmisión pueden estar presentes en todo el año. Se consideran factores de alto riesgo para la transmisión del trematodo los años lluviosos, las inundaciones y las zonas de riego con condiciones para que se infecte al hospedero intermediario de F. hepatica (28, 59). Otros factores que favorecen la diseminación, son la gran longevidad del parásito, el potencial reproductivo del parásito y del hospedero intermediario, la gran resistencia del estadio infectante (metacercaria), la variedad de hospederos definitivos, la elevada densidad de animales por hectárea, la contaminación de praderas con humedad constante por excremento fresco del hospedero definitivo y

la resistencia del hospedero intermediario a condiciones ambientales adversas (7).

RESPUESTA INMUNE

La inmunidad contra este trematodo se presenta a dos niveles: en la cavidad peritoneal contra fasciolas juveniles y en el hígado contra fasciolas adultas. En modelos de animales de laboratorio se ha informado que las fasciolas juveniles son las responsables de la inducción de inmunidad adquirida contra esta infección (57); ésta se manifiesta en las reinfecciones al destruir a las fasciolas juveniles en la cavidad peritoneal (29, 31). Las fasciolas juveniles, al migrar por la cavidad peritoneal de animales inmunes, son cubiertas por anticuerpos opsonizantes, posteriormente los eosinófilos se adhieren a los parásitos y los destruyen por medio de procesos enzimáticos antes de que lleguen al hígado (6). En la inmunidad contra fasciolas adultas, al parecer interviene la respuesta humoral y celular, además de factores mecánicos naturales y factores mecánicos derivados de la respuesta inmune; esta respuesta puede proteger a un bovino de una reinfección hasta en un 94% (20); por el contrario, aún con títulos altos de anticuerpos en suero y bilis, en el ovino no hay protección (75).

La protección contra Fasciola hepatica, debida a la respuesta inmune específica, ha sido estudiada en modelos de animales de

laboratorio, principalmente ratón, rata y conejo, así como en el ovino y en el bovino (37, 71).

Esta protección ha sido observada en ratas al reducir en un 64% el número de fasciolas al administrarles suero inmune homólogo (rata) o heterólogo (ovinos y bovinos) de animales con fasciolosis natural o experimental (3, 33, 51).

La importancia de la inmunidad conferida en la fasciolosis temprana se ha comprobado al incubar fasciolas en sueros de ratones que tuvieron infecciones de 25 y 100 días in vitro. Al transferir los parásitos a ratones susceptibles, el número de fasciolas tratadas con suero de infecciones tempranas disminuyó con respecto a las tratadas con sueros de infecciones de 100 días y con respecto a los testigos (43).

En conejos existen evidencias de protección contra Fasciola gigantica al emplear sueros heterólogos y homólogos (rata y conejo) de animales infectados experimentalmente. El mayor grado de protección se observó con suero heterólogo (4).

El papel de la inmunidad celular por otra parte, ha sido observada al transferir células linfoides de ratas parasitadas a ratas receptoras (12). De manera similar, este protocolo se ha ensayado en bovinos y ovinos (66); en el ensayo con ratas isogénicas se alcanzó un alto grado de protección; sin embargo, la

protección en ratas y terneras homocigóticas ha sido inconsistente; en ovinos la protección fue nula (66).

Por su parte Balawy (4) trató a conejos susceptibles con suero inmune de conejos parasitados con F. gigantea y además transfirió células linfoides logrando con esto un alto grado de protección ante el desafío de F. gigantea.

Por otro lado, se ha considerado la importancia del factor de transferencia de ratas parasitadas, observándose la reducción del 55.6% de las fasciolas inoculadas, después del desafío, en ratas susceptibles. Al emplear factores de transferencia de bovinos y ovinos no se ha observado reducción significativa en el número de fasciolas a la confrontación (51)

Los primeros ensayos de inmunización activa, se realizaron al emplear implantes de fasciolas por vía subcutánea o intraperitoneal (24), observándose los mejores resultados al usar cámaras de difusión (32). El éxito relativo de los implantes, sobre todo usando cámaras de difusión, sugiere que la respuesta inmune es debida a los productos metabólicos solubles liberados por las fasciolas.

Con el fin de buscar una protección adecuada, se han empleado vacunas experimentales a base de extractos somáticos crudos y de

productos de excreción/secreción de los diferentes estadios de desarrollo del parásito en modelos de roedores, lagomorfos y rumiantes (35, 60).

Una protección similar a la alcanzada con antígenos metabólicos de fasciolas se ha obtenido al inmunizar a roedores y bovinos con metacercarias irradiadas (9, 55).

Por otra parte, se ha comprobado cierto grado de inmunidad cruzada con otros helmintos como Taenia hydatigena en ovinos (10, 19), Nippostrongylus brasiliensis en ratas (21), Schistosoma mansoni en ratones (14) y S. bovis en bovinos y ovinos (52, 62, 67).

Las vacunas experimentales en fasciolosis y en esquistosomiasis han evaluado diversas concentraciones de antígenos de superficie, las cuales han variado desde 5 microgramos hasta 2 mg; las vías de inoculación empleadas primordialmente han sido intraperitoneal, intramuscular y subcutánea. A la fecha la protección observada no ha sido satisfactoria (30, 34, 68).

Con el fin de aumentar la respuesta inmune se han utilizado adyuvantes que al mezclarse con los antígenos permiten una lenta liberación de estos últimos, proporcionando así un estímulo prolongado. De esta forma se induce la respuesta inflamatoria que atrae células inmunocompetentes que procesan adecuadamente al

antígeno. El Adyuvante Completo de Freund (ACF) es un adyuvante formado por un medio oleoso, al cual se le añadió micobacterias muertas. El ACF además de estimular una reacción inflamatoria local, estimula la función de linfocitos T y favorece la protección de IgG (53, 72). Algunos adyuvantes han mostrado ser capaces de inducir resistencia inespecífica al ser administrado sin el antígeno; en éste sentido, experiencias en ovinos han indicado que el ACF inoculado intraperitonealmente, induce por sí solo resistencia inespecífica contra la infección por Fasciola hepatica, debido tal vez a la activación de macrófagos peritoneales (8, 26); en forma similar en esquistosomiasis el adyuvante LPS (lipopolisacárido B de S. enteritidis), administrado subcutáneamente, confirió por sí solo protección contra esta infección (68).

El tegumento o glicocálix de los helmintos se ha caracterizado como una mezcla de oligo o polisacáridos, glicoproteínas y proteínas (15, 22, 46); puede ser responsable o contribuyente de las propiedades de absorción, transporte, características eléctricas, conducta inmunológica y naturaleza adhesiva del parásito (38). El glicocálix o algunas fracciones de éste se han empleado en vacunas experimentales (16, 36).

Contra Fasciola hepatica se ha evaluado una vacuna a partir de antígenos superficiales aislados con anticuerpos monoclonales sin el éxito deseado (30); asimismo se tienen expectativas favorables

hacia la posible protección que pueda conferir una clona de la glutatión-S transferasa de F. hepatica (54). En Schistosoma se ha comprobado que existen polipéptidos superficiales que están presentes durante toda la vida del trematodo, así como polipéptidos que son retirados o que se expresan en cierta etapa de desarrollo (65), asimismo, se ha conseguido cierto grado de protección contra Schistosoma mansoni al emplear glicocáliz o fracciones de éste como inmunógenos (42, 56, 61, 68).

C. JUSTIFICACION:

Las pérdidas por esta enfermedad parasitaria se clasifican en dos grandes grupos: pérdidas directas e indirectas. Las primeras se relacionan con la pérdida del hígado en la matanza al no ser apta para el consumo humano y con la muerte de los animales, principalmente en ovinos, a consecuencia de la migración de las fases juveniles del parásito a través del parénquima hepático durante infecciones en gran escala. Las pérdidas indirectas comprenden la baja producción y mala calidad de la leche, las bajas tasas de crecimiento y mala conversión alimenticia, la baja producción y mala calidad de la lana y las pérdidas por trastornos reproductivos; éstas, se derivan de la acción menos severa del parásito adulto alojado en los conductos biliares, presentando la forma crónica de la enfermedad. Sin duda el mayor impacto a la industria pecuaria se debe a las pérdidas indirectas, debido a que

son más frecuentes, menos notorias y generalmente no se les da la importancia que realmente tienen (49).

Las pérdidas por fasciolosis en la ganadería mexicana actualmente se desconocen; sin embargo, en 1980 se aceptó que las mayores pérdidas de índole sanitario se debían a enfermedades parasitarias y de éstas, invariablemente la fasciolosis ocupaba el primer lugar en pérdidas directas e indirectas, tanto en ovinos como en bovinos (18). Más de 10 años después la información disponible nos indica que esta situación se mantiene e incluso la frecuencia de fasciolosis en los rumiantes domésticos de México podría estar aumentando; así en el período de 1979-1987 en 14 plantas Tipo Inspección Federal en la República Mexicana, en un total de 5,797,466 bovinos sacrificados se observó una frecuencia de fasciolosis de 7.3%, siendo 1980 y 1984 los años con menor y mayor frecuencia (4.2% y 9%) respectivamente (11); en este mismo sentido, en el estado de Michoacán, durante el período de 1987 a 1991 se observó en el Rastro Municipal de Morelia un incremento continuo de la frecuencia de fasciolosis en bovinos sacrificados, de esta manera en 1987 se observaron 4 bovinos fasciolosos por cada mil bovinos sacrificados, cifra que se incrementó a 46 en 1991 (73).

Hasta ahora, el control de la fasciolosis es aún deficiente e insuficiente dado que prácticamente de todos los recursos disponibles para su control, por lo general solo se emplean los

fasciolicidas, lo que hace más evidente sus desventajas, tales como susceptibilidad de los animales a la infección después del tratamiento y la resistencia de los estadios inmaduros del parásito al tratamiento; además habrá que considerar el riesgo de contaminación de carne y leche para consumo humano y el alto costo de los fármacos.

Debido a estos hechos, es necesario desarrollar métodos alternos de control con el fin de complementar el empleado hasta ahora. De acuerdo a estas perspectivas, en el presente ensayo se evaluó el glicocáliz de fasciolas adultas, aislado y purificado mediante un método para aislar glicoproteínas de eritrocitos, como inmunógeno contra éste trematodo.

D. HIPOTESIS

La inoculación intraperitoneal de glicocálix de fasciolas adultas induce resistencia contra la infección por Fasciola hepatica en conejos.

E. OBJETIVO

Evaluar la capacidad del glicocálix de fasciolas adultas para inducir inmunidad protectora contra Fasciola hepatica en conejos.

MATERIAL Y METODOS

- A) METODOS**
- B) TECNICAS**
- C) DISEÑO EXPERIMENTAL**
- D) ANALISIS ESTADISTICO**

Todos los ensayos en el presente estudio se efectuaron en el Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria del INIFAP -SARH en Jiutepec, Morelos.

A) METODOS

Se evaluó la inducción de inmunidad protectora contra Fasciola hepatica por medio de un ensayo exploratorio y dos ensayos experimentales, en los cuales se observó la respuesta a seis cantidades o niveles de glicocáliz de fasciolas adultas (2, 1, 0.5, 0.25, 0.13 y 0.07 mg) y a dos cantidades o niveles de Adyuvante Completo de Freund (0.5 y 0.25 ml) utilizando al conejo como modelo experimental. Todos los tratamientos fueron administrados en un volumen total de 1 ml intraperitonealmente, posteriormente todos los conejos fueron confrontados con metacercarias de Fasciola hepatica por vía oral.

El glicocáliz se extrajo y purificó a partir de fasciolas recolectadas de hígados de bovinos sacrificados en el Rastro

Municipal de Toluca, siguiendo el método descrito por Marchesi y Andrews (47).

Se emplearon conejos Nueva Zelanda de ambos sexos de aproximadamente dos kg al inicio del experimento. Todos los conejos empleados en el presente estudio fueron proporcionados por el Bioterio del Centro Nacional de Investigaciones Interdisciplinarias en Microbiología, INIFAP, SARH. Desde el momento de su recepción y hasta el final del experimento se mantuvieron en jaulas; su alimentación consistió en alimento balanceado comercial para conejos y agua potable. Antes de iniciar cada experimento, los conejos permanecieron al menos 15 días en un período de adaptación; posteriormente fueron pesados al inicio del experimento y asignados por sorteo al azar a cada tratamiento. Las muestras de suero se obtuvieron con jeringa hipodérmica estéril de la vena auricular, mediante sujeción del conejo con cepo e irritación previa del pabellón auricular externo con xilol (53). Todas las muestras de suero se almacenaron en congelación hasta su uso. Antes del sacrificio, la totalidad de los conejos se pesaron por segunda ocasión para determinar la diferencia de peso del conejo en pie.

Los parámetros registrados en el presente estudio correspondieron a:

a) Número de fasciolas. Fasciolas halladas en la disección del hígado de los conejos post-sacrificio.

b) Longitud de fasciolas. Dimensión determinada con el empleo de un Vernier.

c) Ganancia de peso en el conejo. Ganancia de peso de los animales en pie durante el desarrollo del experimento.

d) Peso del hígado. Parámetro determinado inmediatamente después del sacrificio de los conejos.

e) Anticuerpos IgG. Fluctuación de inmunoglobulina IgG contra antígenos de Fasciola hepatica, determinada por los valores de absorbancia obtenidos mediante un Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (23, 74).

En forma paralela, se establecieron las colonias de caracoles Fossaria humilis necesarias para la producción de metacercarias, de acuerdo a la técnica del Agricultural Development and Advisory Service de Londres (1) con modificaciones.

ENSAYO EXPLORATORIO.

El ensayo comprendió el estudio de dos factores, glicocálix de fasciolas adultas (GLX) y Adyuvante Completo de Freund (ACF), seis tratamientos y seis repeticiones; la unidad experimental estuvo representada por un conejo, cuyo peso promedio inicial fue de 1,933 g, con una desviación estándar (s) de ± 320 g; el tratamiento fue repartido en dos dosis.

Los tratamientos fueron inoculados de la siguiente forma:

Primera dosis, cuatro semanas antes de la confrontación:

Grupo I: 0.5 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.2.

Grupo II: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo III: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo IV: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo V: 0.5 ml de SSAF.

Grupo VI: 0.5 ml de SSAF.

Segunda dosis, dos semanas antes de la confrontación:

Grupo I: 0.5 ml de SSAF.

Grupo II: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo III: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF + 1 mg de glicocálix (GLX).

Grupo IV: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF + 2 mg de GLX.

Grupo V: 1 mg de GLX en 0.5 ml de SSAF.

Grupo VI: 2 mg de GLX en 0.5 ml de SSAF.

Cuatro y dos semanas antes de la confrontación con metacercarias de Fossaria humilis se administró la primera y la segunda dosis del tratamiento respectivamente. Dos semanas después de la última administración de los tratamientos, todos los animales fueron desafiados con 40 metacercarias de "origen bovino", liberadas de caracoles Fossaria humilis. Posteriormente, en la

novena semana post-confrontación, todos los animales fueron pesados y sacrificados (cuadro 1). Asimismo se pesó el hígado y se determinó el número de fasciolas. A su vez se tomaron muestras de suero a tres animales diferentes de cada grupo en forma alterna las semanas -3 y -1 durante la etapa previa a la infección y en las semanas 4, 6 7 y 8 postinfección.

PRIMER ENSAYO

El primer ensayo comprendió el estudio de dos factores, glicocálix y adyuvante completo de Freund en 4 tratamientos y 10 repeticiones; la unidad experimental estuvo representada por un conejo, cuyo peso inicial promedio fue de 2,174 g (s = \pm 281 g); el tratamiento fue repartido en dos dosis.

Los tratamientos fueron administrados de la siguiente forma:

Primera dosis, cuatro semanas antes de la infección:

Grupo I: 0.5 ml de SSAF.

Grupo II: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo III: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo IV: 0.5 ml de SSAF.

Segunda dosis, dos semanas antes de la confrontación:

Grupo I: 0.5 ml de SSAF.

Grupo II: emulsión de 0.25 ml de SSAF + 0.25 ml de ACF.

Grupo III: 1 mg de GLX en 0.5 ml de SSAF.

Grupo IV: 1 mg de GLX en 0.5 ml de SSAF.

Los tratamientos se administraron cuatro y dos semanas antes del desafío. Cinco y dos semanas antes de la infección, y a partir de ésta, cada dos semanas, se colectaron muestras de suero de la totalidad de animales. Dos semanas después de la última inoculación de los tratamientos, todos los animales fueron desafiados con 40 metacercarias de "origen bovino", liberadas de caracoles Fossaria humilis. Posteriormente en la décima semana postinfección, todos los animales fueron pesados y sacrificados; asimismo se pesó el hígado y se determinó el número de fasciolas (cuadro 2).

SEGUNDO ENSAYO

El segundo ensayo comprendió el estudio de un solo factor, glicocálix, en seis tratamientos y 6 repeticiones, asimismo se contó con un grupo control negativo con 4 repeticiones, al que no se le administró tratamiento alguno y no se le expuso a la infección por Fasciola; la unidad experimental fue representada por un conejo, cuyo peso inicial promedio fue de 2,060 g (s = \pm 469 g); el tratamiento se administró a todos los conejos en una sola dosis.

Los tratamientos se administraron en la siguiente forma:

Tres semanas antes de la confrontación (dosis única):

- Grupo I: 1 ml de SSAF.
- Grupo II: 1 mg de GLX en 1.0 ml de SSAF.
- Grupo III: 0.5 mg de GLX en 1.0 ml de SSAF.
- Grupo IV: 0.25 mg de GLX en 1.0 ml de SSAF.
- Grupo V: 0.13 mg de GLX en 1.0 ml de SSAF.
- Grupo VI: 0.07 mg de glicocálix en 1.0 ml de SSAF.

Tres semanas antes de la infección se administró el tratamiento en dosis única. Se colectaron muestras de suero cuatro semanas antes de la infección, así como en las semanas 2, 4, 7, 10 y 14 postinfección de la totalidad de animales; posteriormente tres semanas después de la aplicación de los tratamientos, todos los animales fueron desafiados con 80 metacercarias de "origen ovino", liberadas de caracoles Fossaria humilis y con una viabilidad del 44 %. Finalmente en la semana 15 postinfección, todos los animales fueron pesados y sacrificados. Se pesó también el hígado y se determinó el número de fasciolas (cuadro 3).

A los sueros del primer y segundo ensayo experimental se les determinó la fluctuación de anticuerpos anti-F. hepatica mediante la prueba de ELISA (23, 74). En el primer y segundo ensayo se emplearon como fuentes de antígeno un extracto crudo de fasciolas adultas completas, en el segundo ensayo además se empleó un antígeno de excreción/secreción de fasciolas adultas.

B) TECNICAS**AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL GLICOCALIX DE Fasciola hepatica ADULTA**

El glicocáliz de fasciolas adultas utilizado en la presente evaluación se aisló y purificó mediante un método empleado para aislar glicoproteínas de eritrocitos (47).

TECNICA:

a) Se separaron por disección 500 fasciolas enteras de hígados de bovinos positivos a Fasciola retirados de la matanza en la Inspección Sanitaria del Rastro Municipal de Toluca, Edo. de México.

b) A las fasciolas se les adicionó 20 ml de solución amortiguadora de Tris 0.05 M - diyodosalicilato de litio (Lys) 0.005 M (pH 7.5).

c) Se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación constante.

d) Al término de la incubación, se adicionaron dos volúmenes de agua destilada helada.

e) Se volvió a incubar durante 45 minutos a temperatura de refrigeración (0 -4 °C) con agitación constante.

f) Posteriormente se separó el sobrenadante por decantación.

g) Las proteínas se fraccionaron con un volumen de fenol al 60%.

h) Se centrifugó (Sorvall RT6000) a 4,000 g durante 60 minutos. Al término se desechó la fase fenólica.

i) El contenido de Lys se eliminó de la fase acuosa por medio de diálisis durante 24 a 72 horas.

j) Finalmente se liofilizó el glicocálix.

k) La resuspensión del liofilizado se efectuó inmediatamente antes de su uso con SSAF o agua destilada.

ELABORACION DEL EXTRACTO CRUDO DE Fasciola hepatica

Se preparó un extracto crudo de fasciolas adultas completas, según la técnica descrita por Espinoza y col., (25) con modificaciones en el origen del antígeno y en la eliminación de lípidos del antígeno.

TECNICA:

a) Se obtuvieron fasciolas de hígados de bovinos sacrificados en rastro, se lavaron cinco veces en solución salina fisiológica (0.15 M NaCl, SSF),

b) Las fasciolas se desengrasaron en acetona fría y se lavaron cinco veces en SSF.

c) Posteriormente se homogeneizaron en un baño de hielo con un Polytron (Brinkman Instruments) en SSAF, conteniendo cloruro de potasio 3 M, durante un minuto. Este procedimiento se repitió hasta que los parásitos quedaron perfectamente homogeneizados.

d) El extracto se mantuvo durante toda la noche en agitación ligera a 4 °C; al siguiente día se centrifugó (Sorvall RT6000) a 2,000 g durante 30 minutos a 4 °C.

e) Después se dializó contra SSAF y se volvió a centrifugar (Beckman J2-21) a 24,000 g durante una hora a 4 °C.

f) Finalmente el sobrenadante se almacenó a - 20 °C hasta su uso.

ELABORACION DE LOS PRODUCTOS DE SECRECION/EXCRECION DE Fasciola hepatica

Se prepararon productos de secreción/excreción de fasciolas de acuerdo a la técnica descrita por Morilla y Bautista (53).

TECNICA:

a) Inicialmente se colectaron fasciolas vivas en SSAF, pH 7.2 estéril. Inmediatamente se lavaron seis veces con SSAF.

b) Posteriormente se colocaron durante 10 minutos en SSAF con timerosal 1:10,000. Mas tarde se lavaron dos veces con SSAF.

c) En un matraz estéril se colocaron de 20 a 30 fasciolas y se añadió solución de Hedon-Fleig estéril a razón de 1 ml/fasciola.

d) Los matraces con las fasciolas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en "baño maría".

e) El sobrenadante se colectó en baño de hielo y se centrifugó (Sorvall RT6000) a 8,000 g por 20 minutos a 4 °C.

f) El sobrenadante se envasó en alícuotas de 3 ml y se almacenó a - 20 °C hasta su uso.

Solución de Hedon-Fleig:

NaCl	7.0 g
KCl	0.3 g
CaCl ₂	0.1 g
NaHCO ₃	1.5 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g
Glucosa	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	1,000 ml

La concentración de proteína total del extracto crudo, de los productos de excreción/secreción y del glicocálix purificado de Fasciola hepatica se determinó siguiendo el método de Lowry y cols. (45), empleando albúmina sérica bovina como patrón.

**ELISA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-Fasciola hepatica
EN SUERO DE CONEJO**

Para observar la fluctuación de anticuerpos específicos contra F. hepatica, se probó la actividad del suero de conejo contra un extracto crudo y contra productos de excreción/secreción del parásito adulto, por medio de un ELISA, según la técnica descrita por Engvall y Perlmann (23) y Voller y col. (74) con modificaciones en el origen del antígeno y en las concentraciones empleadas.

TECNICA:

a) Acoplamiento del antígeno a un soporte sólido. Se usaron placas para microtitulación de 96 pozos de fondo plano (Immulon I, Dynatech Labs. Inc.). Se colocó en cada pozo de la placa 100 μ l del antígeno de F. hepatica a una concentración de 5 μ l/ml para el antígeno somático y 10 μ l/ml para el antígeno de excreción/secretión en amortiguador de carbonatos (0.03 M Na₂CO₃, 0.069 M NaHCO₃), pH 9.6, se incubó durante toda la noche a 4 °C.

b) Lavado de la placa. Se lavaron los pozos tres veces con 200 μ l de SSAF adicionada con tween 20 al 0.05% (SSAF-T) durante cinco minutos en cada ocasión.

c) Adición del primer anticuerpo. Se prepararon diluciones 1:500 y 1:250 en SSAF-T de las diferentes muestras de suero para el antígeno somático y para el antígeno de excreción/secretión respectivamente, se adicionaron 100 μ l/pozo de cada dilución por duplicado y se incubaron durante dos horas a 37 °C.

d) Se repitió el paso del inciso b).

e) Adición del segundo anticuerpo. Se empleó como segundo anticuerpo el conjugado anti-IgG de conejo producido en cabra (Sigma, Chem. Co.), acoplado a fosfatasa alcalina. Se adicionó a cada pozo 100 μ l del conjugado diluido 1:500 en SSAF-T y se incubó por dos horas a 37 °C.

f) Se repitió el paso del inciso b).

g) Adición del sustrato. Como sustrato se empleó p-nitrofenil fosfato disódico (Sigma Chem. Co.); se disolvieron 10 mg del sustrato en 2.5 ml de agua y se aforó a 10 ml con amortiguador de

dietanolamina al 10%, pH 9.8, se adicionaron 100 μ l/pozo del sustrato y se incubó durante 15 minutos a 37 °C.

h) Se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro para ELISA (Bio-Rad, modelo 2550) con un filtro para 405 nm.

DETERMINACION DEL CRITERIO DE POSITIVIDAD EN LA PRUEBA DE ELISA

Una muestra individual se determinó positiva cuando su valor de absorbancia fue igual o mayor al punto de corte del ensayo. El punto de corte para cada ensayo se obtuvo al sumar la media mas tres veces la desviación estándar de los valores de absorbancia de los muestreos de suero previos a la infección; en el segundo ensayo también se emplearon la totalidad de los sueros del grupo control no infectado para calcular el punto de corte del último ensayo.

PRODUCCION DE METACERCARIAS

Para comprobar la posible protección conferida por el glicocálix contra la infección por *F. hepatica* en el modelo experimental, se produjeron metacercarias del parásito en condiciones de laboratorio (1).

TECNICA:

a) Obtención del hospedero intermediario. Se realizaron varias colectas de caracoles *Fossaria humilis* de canales de riego en el Estado de Morelos. El hospedero intermediario se mantuvo en

condiciones de laboratorio en un cultivo constituido por un soporte de tierra cubierto con alga Oscillatoria spp., (ambas, tierra y alga fueron colectadas en el estado de Morelos), dentro de cajas de petri y charolas metálicas. Los cultivos se cambiaron aproximadamente cada tercer día. Todos los días se revisaron en busca de masas ovíferas, asimismo se adicionaba agua para mantener la humedad necesaria y se ventilaban al menos por dos horas. Los caracoles provenientes de estas masas ovíferas al alcanzar la talla de 4 a 5 mm o al cumplir cuatro semanas de edad, se emplearon para infectarlos con miracidios de F. hepatica.

b) Obtención de miracidios. Para el ensayo exploratorio y para el primer ensayo, se realizaron varias colectas de vesículas biliares de hígados de bovinos decomisados por el Servicio de Inspección Sanitaria de la Secretaría de Salud en el Rastro Municipal de Toluca, Estado de México; para el segundo ensayo la bilis provino de ovinos infectados experimentalmente en el Centro Nacional de Parasitología Animal, SARH de Jiutepec, Morelos. La bilis se pasó a través de un tamiz y los huevos de F. hepatica contenidos en la bilis se concentraron por sedimentaciones y decantaciones sucesivas en el laboratorio, finalmente los huevos se incubaron en frascos con agua a 26 °C durante 14 días en obscuridad. La obtención de miracidios se realizó después de someter por cinco minutos a temperatura de refrigeración los huevos incubados de F. hepatica e inmediatamente exponerlos a una fuente luminosa continua de 100 w a 10 cm.

c) Obtención de metacercarias. Los caracoles de 4 semanas de edad se colocaron en placas de microtitulación de 96 pozos y se infectaron en forma individual, por cada caracol se pusieron de 2 a 4 miracidios, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 8 horas en la obscuridad. Después de la exposición los caracoles se regresaron a sus cajas de cultivo. A los 45 días de la exposición los caracoles se sometieron a un choque térmico, se mantuvieron de 3 a 5 minutos en congelación y posteriormente se expusieron a la iluminación constante de luz, 100 w a 10 cm, en un recipiente de vidrio forrado internamente con plástico. Las cercarias liberadas, fijadas en el plástico, se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su uso.

C) DISEÑO EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo representada por un conejo. Los lotes de conejos se dividieron con base en el sexo y se asignaron al azar a cada tratamiento de la siguiente forma. Ensayo exploratorio: seis tratamientos y seis repeticiones; primer ensayo: cuatro tratamientos y diez repeticiones; segundo ensayo: seis tratamientos y seis repeticiones.

D) ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en el número de fasciolas, longitud de fasciolas, diferencia de peso del conejo en pie, peso del hígado y absorbancia de los sueros, se organizaron y resumieron por medio de técnicas estadísticas descriptivas. Asimismo, se realizó el análisis de correlación para todas las variables y se compararon las medias por medio del análisis de varianza del número de fasciolas, de la longitud de fasciolas, de la diferencia de peso del conejo en pie y del peso del hígado ; cuando se encontraron diferencias significativas, $P < 0.05$, se compararon las medias de los grupos control de infección con la media de cada uno de los grupos experimentales mediante la prueba de Tukey de diferencia mínima significativa honesta (17).

La absorbancia de los grupos control de infección se compararon con la absorbancia obtenida en cada grupo experimental mediante el siguiente modelo de regresión múltiple:

Si se tienen dos rectas:

$$Y_1 = \beta_{01} + \beta_{11} X$$

Y

$$Y_2 = \beta_{02} + \beta_{12} X$$

entonces se pueden agrupar en:

Modelo Completo (c): $Y = X + Z + ZX$

$$\text{entonces } Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 Z_i + \beta_3 ZX_i$$

Modelo Reducido (1) : $Y = X$

$$\text{entonces } Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i$$

Donde Y_i es la absorbancia obtenida en cada uno de los dos grupos a comparar, X_i es la semana de colecta, Z_i es el dígito 1 o 0 que se le asigna a cada uno de las dos absorbancias a comparar y $Z X_i$ es la interacción entre Z_i y X_i .

La hipótesis nula es:

$$H_0 : \beta_{01} = \beta_{02} \quad , \quad \beta_{11} = \beta_{12}$$

La hipótesis alterna:

$$H_a : \text{al menos una es diferente}$$

La prueba de hipótesis:

$$F_c = \frac{SC_{(r)} - SC_{(c)} / GLE_{(r)} - GLE_{(c)}}{CME_{(c)}}$$

La $F_{\text{tablas}} = F (GLE_{(r)} - GLE_{(c)}, GLE_{(c)}, 0.05$

La regla de decisión será:

$$\text{Sí } F_c > F_{\text{tablas}}$$

entonces se rechazará H_0 .

CUADRO No. 1. DISEÑO DEL ENSAYO EXPLORATORIO
n = 6.

GRUPO	Tratamientos		Desafío 40 mc semana 1	Sacrificio después del desafío 9 semanas
	antes del desafío 4 semanas / 2 semanas			
I	a	a	X	+
II	b	b	X	+
III	b	c	X	+
IV	b	d	X	+
V	a	e	X	+
VI	a	f	X	+

n: número de repeticiones por grupo; mc: metacercarias
SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos
ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;
X: desafío; +: sacrificio;
a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;
c: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF+ 1 mg GLX;
d: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF + 2 mg GLX;
e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

CUADRO No. 2. DISEÑO DEL PRIMER ENSAYO
n = 10

GRUPO	Tratamientos antes del desafío		Desafío 40 mc semana 1	Sacrificio después del desafío 10 semanas
	4 semanas	/ 2 semanas		
I	a	a	X	+
II	b	b	X	+
III	b	e	X	+
IV	a	e	X	+

n: número de repeticiones por grupo; mc: metacercarias;
SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;
ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;
X: desafío; +: sacrificio;
a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;
e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX.

CUADRO No. 3. DISEÑO DEL SEGUNDO ENSAYO
 n* = 6; n+ = 4.

GRUPO	Tratamientos antes del desafío 3 semanas	Desafío 80 mc semana 1	Sacrificio después del desafío 15 semanas
I*	g	X	+
II*	h	X	+
III*	i	X	+
IV*	j	X	+
V*	k	X	+
VI*	l	X	+
0+	g	-	+

n: número de repeticiones por grupo; mc: metacercarias;
 SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;
 ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;
 X: desafío; -: no desafiado; +: sacrificio;
 0: grupo control no infectado;
 g: 1 ml de SSAF; h: 1 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 i: 0.5 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 j: 0.25 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 k: 0.13 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 l: 0.07 mg de GLX + 1 ml SSAF .

3. RESULTADOS

- A) MODELO EXPERIMENTAL
- B) NUMERO DE FASCIOLAS
- C) LONGITUD DE FASCIOLAS
- D) GANANCIA DE PESO EN EL CONEJO
- E) PESO DEL HIGADO
- F) ANTICUERPOS IgG
- G) CUADROS Y FIGURAS

A) MODELO EXPERIMENTAL

En el ensayo exploratorio la infección por Fasciola hepatica en los conejos duró nueve semanas, en el primer ensayo diez y en el segundo ensayo quince semanas. En el estudio del hígado postsacrificio se observaron huevos de Fasciola hepatica en la bilis de todos los conejos infectados con el parásito de los tres ensayos realizados.

B) NUMERO DE FASCIOLAS

Ensayo exploratorio. El promedio de fasciolas aisladas por grupo en los hígados de los conejos del ensayo exploratorio se muestran en el cuadro 4 y en la figura 1.

La implantación de la fasciolosis en el hígado de los conejos de los grupos I, II, III y IV fue del 100%, y la de los grupos V y

VI del 83.3%. La mortalidad de los conejos a las ocho semanas post-infección fue del 0% en la mayoría de los grupos, con excepción del grupo control de infección (I) que fue del 16.7%. La totalidad de los conejos de este ensayo se sacrificaron a las nueve semanas post-infección.

El mayor número de fasciolas recuperadas por animal fue de 16 y el menor número de 2. El grupo con el mayor promedio de fasciolas (10.5) por animal correspondió al tratamiento de 0.5 ml de ACF + 1 mg de GLX; el grupo control de infección fue el segundo grupo con mayor promedio de fasciolas (8.3); el promedio de fasciolas con respecto al grupo control de infección fue menor en los cuatro grupos restantes: 0.5 ml de ACF + 2 mg de GLX, 2 mg de GLX, 0.5 ml de ACF y 1 mg de GLX, este último tratamiento presentó el menor promedio (5.6) de parásitos. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias entre el grupo control de infección y los grupos experimentales en el número de fasciolas recuperadas por grupo ($P > 0.05$).

Primer ensayo. En este ensayo prácticamente se repitió la evaluación de cuatro de los grupos anteriores, la única modificación consistió en reducir a la mitad la cantidad de ACF administrado (0.25 ml) con respecto al ensayo anterior en el grupo III. El promedio de fasciolas recuperadas por grupo en los hígados de los conejos se muestran en el cuadro 5 y en la figura 2.

La implantación de la fasciolosis en el hígado de los conejos del grupo II fue del 100%, y la de los grupos I, III y IV del 90%. La mortalidad de los conejos a las siete semanas post-infección fue del 0% en los grupos III y IV, en cambio en los grupos I y II fue del 10%. La totalidad de los conejos de este ensayo se sacrificó a las diez semanas post-infección.

El mayor número de fasciolas recuperadas por animal fue de 16 y el menor número de 1. En el primer ensayo todos los tratamientos obtuvieron mayor promedio de fasciolas que el grupo control de infección. El tratamiento de 1 mg de GLX obtuvo el mayor promedio de fasciolas (10.2) por grupo recuperadas postsacrificio y el menor promedio (6.7) correspondió al grupo control de infección. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias entre el grupo control de infección y los grupos experimentales en el número de fasciolas recuperadas por grupo ($P > 0.05$).

Segundo ensayo. Con base en los resultados obtenidos en los dos ensayos precedentes, se evaluó el glicocálix a menores dosis. El número de fasciolas aisladas en el segundo ensayo se muestran en el cuadro 6 y en la figura 3.

La implantación de la fasciolosis en el hígado de los conejos de los grupos I, III, IV y V fue del 100%, y la de los grupos II y VI del 83.3%. Antes del desafío se dieron de baja dos animales por lesiones ajenas a la experimentación, uno del grupo II y otro del grupo IV. La mortalidad en los conejos a las 14 semanas post-

infección fue del 0% en la mayoría de los grupos, con excepción del grupo III que fue del 16.7%. La totalidad de los conejos de este ensayo se sacrificó a las 15 semanas post-infección.

El mayor número de fasciolas recuperadas por animal fue de 12 y el menor número de 1. En el segundo ensayo únicamente el grupo con el tratamiento de 0.07 mg de GLX obtuvo un menor promedio de fasciolas por animal (1.25), con respecto al grupo control de infección; éste constituyó el segundo grupo con menor promedio (3.5) de fasciolas. El mayor promedio de fasciolas (6.6) correspondió al tratamiento de 0.5 mg de GLX. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias entre el grupo control de infección y los grupo experimentales en el número de fasciolas recuperadas por grupo ($P > 0.05$).

C) LONGITUD DE FASCIOLAS

Ensayo exploratorio. La longitud de los parásitos colectados en este ensayo corresponden a una fasciola de nueve semanas de edad. Las dimensiones obtenidas se muestran en el cuadro 7 y en la figura 4.

La máxima longitud del parásito obtenida en este ensayo fue de 18.3 mm y la menor dimensión de 4 mm. La menor longitud promedio (8.3 mm) de las fasciolas recuperadas correspondió al grupo control de infección y al tratamiento de 1 mg de GLX, la mayor longitud

promedio se observó en el tratamiento con 2 mg de GLX (9.4 mm); cuatro tratamientos tuvieron una mayor longitud promedio que el grupo control de infección. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias entre el grupo control de infección y los grupos experimentales en la longitud de las fasciolas recuperadas por grupo ($P > 0.05$).

Primer ensayo. La longitud de las fasciolas recuperadas en el presente ensayo se muestran en el cuadro 8 y en la figura 5.

La máxima longitud obtenida para fasciolas de diez semanas de edad, en este ensayo, fue de 19 mm y la menor dimensión correspondió a 5 mm. La menor longitud promedio del parásito (9.9 mm) se observó en el grupo tratado con 1 mg de GLX; el grupo control de infección obtuvo el segundo menor promedio de longitud (10.1); la mayor longitud promedio (11.0) correspondió al tratamiento con 0.25 ml de ACF + 1 mg de GLX. Los dos tratamientos que emplearon ACF obtuvieron un mayor promedio en la longitud de las fasciolas. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias entre el grupo control de infección y los grupos experimentales en la longitud de las fasciolas recuperadas por grupo ($P > 0.05$).

Segundo ensayo. La longitud de los parásitos aislados en este ensayo correspondió a una fasciola de 15 semanas de edad, las dimensiones obtenidas se muestran en el cuadro 9 y en la figura 6.

La máxima longitud obtenida por el trematodo fue de 25.6 mm y la menor correspondió a 7.5 mm. En el segundo ensayo con excepción del grupo tratado con 0.07 mg de GLX, todos los tratamientos obtuvieron un mayor promedio en la longitud de las fasciolas recuperadas postsacrificio con respecto al grupo control de infección.

La longitud promedio de los parásitos en los tratamientos de los tres ensayos evaluados en el presente estudio, siempre fue mayor a la longitud promedio de las fasciolas del grupo control de infección, con excepción de los tratamientos con 1 mg y 0.07 mg de GLX, en los cuales la longitud fue igual o menor. En el primer ensayo, al administrar 1 mg de GLX, la longitud promedio de las fasciolas fue 0.02 mm menor que la longitud promedio de las fasciolas del grupo control de infección, sin embargo, en el ensayo exploratorio y en el segundo ensayo en el tratamiento con 1 mg de GLX, la longitud promedio de los parásitos fue igual o mayor al grupo control de infección. Ninguno de los promedios de longitud, en los tratamientos evaluados en el presente estudio, fue diferente ($P > 0.05$) al grupo control de infección.

En este último ensayo también se evaluó el ancho de las fasciolas medido en el extremo anterior mas ancho del parásito, las dimensiones obtenidas se muestran en el cuadro 10 y en la figura 7, en donde la máxima anchura obtenida por parásito fue de 11 mm y la menor de 1.8 mm. Todos los tratamientos comprendidos entre 1 mg y 0.07 mg de GLX mostraron una mayor anchura promedio del trematodo con respecto al grupo control de infección. En el análisis de varianza no se encontraron diferencia entre los grupos evaluados.

D) GANANCIA DE PESO EN EL CONEJO

Las ganancias de peso de los conejos en pie alcanzada durante el desarrollo del **ensayo exploratorio**, del **primer ensayo** y del **segundo ensayo** se muestran en los cuadros 11, 12, y 13, así como en las figuras 8, 9 y 10 respectivamente.

El peso promedio inicial de los conejos en el **ensayo exploratorio** fue de 1,933 g, con una desviación estándar (s) de \pm 320 g. Los dos grupos con mayor ganancia de peso correspondieron a los tratamientos con ACF + GLX (ACF + 2 mg GLX, 1,273 g; ACF + 1 mg de GLX 1,038 g), el tercer grupo con mayor ganancia lo ocupó el grupo control de infección (938 g) y la menor ganancia se observó en el tratamiento con 1 mg de GLX (887 g) (cuadro y figura). El análisis estadístico mostró la ausencia de correlación lineal entre el peso inicial y el peso final de los conejos en todos los tratamientos y del grupo control de infección.

El peso promedio inicial de los animales en el **primer ensayo** fue de 2,174 g ($s = \pm 281$ g). Después de 15 semanas de la primera aplicación de los tratamientos, la mayor ganancia de peso correspondió para los dos tratamientos de ACF (0.5 ml de ACF, 1,139 g; 0.25 ml de ACF + 1 mg de GLX, 1,079 g), el tercer tratamiento con mayor ganancia de peso se observó en el grupo control de infección (1,098 g) y la menor ganancia la ofreció el tratamiento con 1 mg de GLX. El análisis estadístico mostró una correlación positiva ($P < 0.05$) para el peso inicial y el peso final en el grupo control de infección ($r = 0.84$) y en el tratamiento con 0.5 ml de ACF ($r = 0.68$). Por medio del análisis de regresión se estableció, para los anteriores grupos de tratamientos el modelo lineal que relaciona el peso final con el peso inicial:

$$Pf = Po + m Pi$$

donde, Pf: es el peso final en kg esperado al concluir las 15 semanas que duró el experimento.

Po: es un peso constante en kg que corresponde a la ordenada al origen.

m: es la cantidad en kg que se espera ganar en 15 semanas, bajo las condiciones de cada experimento, por cada kg de peso inicial.

Pi: es el peso inicial al principio de cada experimento.

De esta manera, la ecuación para el peso final en el grupo control de infección se establece como sigue:

$$Pf = 1.54426 + 0.799783 Pi$$

$$\text{coeficiente de determinación} = 0.708$$

De esta manera, en los grupos control de infección, se espera por conejo una ganancia de peso de 0.8 kg por cada kg de peso inicial al final de 15 semanas, con las condiciones de experimentación del primer ensayo.

En el tratamiento con 0.5 ml de ACF no se propone el modelo lineal debido al bajo valor del coeficiente de determinación (0.47).

El peso promedio inicial de los animales en el **segundo ensayo** fue de 2,060 g ($s = \pm 469$ g). Después de 19 semanas de la administración de los tratamientos, la mayor ganancia de peso correspondió al tratamiento con mayor cantidad de GLX (1 mg de GLX, 1,540 g), la segunda mayor diferencia correspondió al grupo control de infección (1,412 g), el tercer lugar correspondió al grupo control no infectado, el tratamiento con menor cantidad de glicocálix (0.07 mg de GLX, 1,360 g) ocupó el cuarto lugar; en orden decreciente le siguieron los tratamientos de GLX: 0.25 mg, 0.13 mg y 0.5 mg, este último con 1,088 g de ganancia.

El análisis estadístico mostró una correlación positiva ($P < 0.05$) entre el peso inicial y el peso final en el grupo control

no infectado ($r = 0.94$), en el grupo control de infección ($r = 0.91$), y en el tratamiento con 0.07 mg de GLX ($r = 0.89$). Por medio del análisis de regresión se estableció, para los anteriores grupos de tratamientos, el modelo lineal que relaciona el peso final con el peso inicial:

Para el grupo control no infectado se establece como:

$$Pf = 1.71726 + 0.880222 Pi$$

$$\text{coeficiente de determinación} = 0.88$$

Para el grupo control de infección se establece como:

$$Pf = 2.09275 + 0.664217 Pi$$

$$\text{coeficiente de determinación} = 0.82$$

Para el grupo con el tratamiento 0.07 mg de GLX se establece como:

$$Pf = 2.67716 + 0.354841 Pi$$

$$\text{coeficiente de determinación} = 0.89$$

De esta manera en este **segundo ensayo** se cuenta con una estimación de la pérdida de peso debida a la infección durante el ensayo, ya que por cada kg inicial, el grupo no tratado gana hipotéticamente 0.88 kg al final de la evaluación; en contraste, el control de infección gana 0.66 kg y el grupo tratado con 0.07 mg de GLX: 0.35 kg.

No obstante que se observaron correlaciones positivas entre el peso inicial y el peso final, en el **primer y segundo ensayo**, en el presente estudio no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre los

incrementos de peso de los grupos control de infección y los grupos tratados en los tres ensayos evaluados.

E) PESO DEL HIGADO

El peso del hígado de los conejos después del sacrificio en el **ensayo exploratorio**, en el **primer ensayo** y en el **segundo ensayo** se muestran en los cuadros 14, 15 y 16 y en las figuras 11, 12 y 13 respectivamente.

En el **ensayo exploratorio** el peso promedio del hígado varió entre 78.3 g y 99 g; en todos los tratamientos en los que se aplicó el GLX se observó un mayor peso de hígado con respecto al grupo control de infección; el único grupo que presentó un menor peso del hígado fue el tratamiento con ACF.

En el **primer ensayo**, el peso promedio del hígado varió entre 65.9 g y 70.3 g, la menor magnitud correspondió al grupo control de infección y la mayor al tratamiento con 1 mg de GLX. El **segundo ensayo** mostró un menor promedio en el peso del hígado (88 g) del grupo tratado con 0.07 mg de GLX y el mayor correspondió al grupo tratado con 0.25 mg de GLX (100 g).

El análisis estadístico mostró una correlación positiva ($P < 0.05$) entre el número de fasciolas y el peso del hígado en todos los tratamientos con un nivel de 1 mg de GLX, ya sea administrado

solo o emulsionado con 0.25 y 0.5 ml de ACF, con excepción del grupo V del ensayo exploratorio; una correlación positiva similar se observó también en el grupo control de infección del primer ensayo:

Ensayo exploratorio.

Grupo III (0.5 ml de ACF + 1 mg de GLX)

$$r = 0.92$$

$$r^2 = 0.84$$

Primer ensayo.

Grupo I (control de infección)

$$r = 0.80$$

$$r^2 = 0.65$$

Grupo III (0.25 ml de ACF + 1 mg de GLX)

$$r = 0.79$$

$$r^2 = 0.63$$

Grupo IV (1 mg de GLX)

$$r = 0.78$$

$$r^2 = 0.60$$

Segundo ensayo.

Grupo II (1 mg de GLX)

$$r = 0.99$$

$$r^2 = 0.99$$

En el análisis de varianza no se encontraron diferencia ($P>0.05$) en el peso del hígado entre los grupos control de infección y los grupos tratados de los tres ensayos.

F) ANTICUERPOS IgG

Ensayo exploratorio. La fluctuación de anticuerpos IgG contra un extracto crudo de Fasciola hepatica se evaluó a través de tres muestreos alternos de suero efectuados en dos subgrupos (a), (b) de tres conejos. Los valores de absorbancia registrados en ambos subgrupos se muestran en el cuadro 17 y en las figuras 14, 15, 16 y 17.

El punto de corte en este ensayo se calculó con la totalidad de los sueros del primer muestreo de los seis grupos experimentales evaluados, tres semanas antes de la infección; la media fue 0.129 y la desviación estándar 0.069, de tal manera que el punto de corte para el **ensayo exploratorio** fue de 0.336.

Todos los conejos fasciolosos en el grupo control de infección y en los dos grupos tratados con GLX solo (1 y 2 mg) fueron positivos en el ELISA, contra un extracto somático del parásito adulto; a partir de la sexta semana postinfección todos los animales tuvieron valores de absorbancia superiores al punto de corte. En los tres tratamientos donde se administró ACF, solo o con GLX (1 Y 2 mg), la seropositividad se observó a la cuarta semana.

Los valores de absorbancia mostraron un incremento paulatino conforme transcurrieron los días postinfección, a partir de la segunda semana en los grupos tratados con ACF y desde la quinta semana en el control de infección y en los grupos tratados con GLX; este incremento fue continuo hasta el término del experimento en la octava semana.

En el análisis de las regresiones múltiples no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre la absorbancia del grupo control de infección y los grupos experimentales.

Primer ensayo. Los anticuerpos IgG específicos contra un extracto crudo de Fasciola hepática se evaluaron a través de seis muestreos de suero efectuados a lo largo de siete semanas de infección experimental. Los valores de absorbancia registrados se muestran en el cuadro 18 y en la figura 18.

La determinación de punto de corte se realizó con la totalidad de los sueros del primer muestreo de los cuatro grupos a evaluar, cinco semanas antes de la infección; la media fue 0.037 y la desviación estándar 0.028, de tal manera que el punto de corte para el **primer ensayo** fue de 0.121.

En este ensayo la detección de anticuerpos circulantes contra un antígeno somático fue similar para los cuatro grupos evaluados: control de infección, ACF, y 1 mg de GLX solo o con ACF. Todos los

conejos infectados fueron positivos a partir de la quinta semana postinfección y de la cuarta a la séptima semana, se incrementó el valor de la absorbancia.

En el análisis de las regresiones múltiples no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre la absorbancia del grupo control de infección y los grupos experimentales.

Segundo ensayo. Las inmunoglobulinas IgG específicas contra un extracto crudo de Fasciola hepatica así como contra productos de excreción y secreción del parásito adulto, se evaluaron a través de seis muestreos de suero efectuados a lo largo de 14 semanas de infección experimental. Los valores de absorbancia obtenidos para el antígeno somático se muestran en el cuadro 19 y en las figuras 19 y 20; a su vez los valores de absorbancia registrados para el antígeno de excreción y secreción se muestran en el cuadro 20, así como en las figuras 21 y 22; las absorbancias de los grupos control no infectados para el antígeno somático y para el antígeno de excreción/secreción se muestran en los cuadros 21 y 22 en forma respectiva.

La determinación de punto de corte para cada antígeno se realizó con la totalidad de los sueros del primer muestreo de los seis grupos a evaluar, cinco semanas antes de la infección, así como con todos los sueros del grupo control no infectado obtenidos a lo largo de 18 semanas; la media para el antígeno somático fue

0.054 y la desviación estándar 0.024; la media para el antígeno de excreción/secreción fue también de 0.054 y la desviación estándar de 0.032. Por consiguiente el punto de corte en el **segundo** ensayo fue de 0.122 y 0.153 para el extracto crudo y para los productos de excreción/secreción en forma respectiva.

La seropositividad contra un extracto crudo de Fasciola hepatica del grupo control de infección y la de los dos grupos con menor nivel de GLX, 0.07 mg y 0.13 mg, se manifestó a partir de la séptima semana postinfección; prácticamente todos los grupos tratados con mayor cantidad de GLX fueron positivos a partir de la cuarta semana, con excepción de algunos conejos del grupo tratado con 0.5 mg de GLX. El valor de la absorbancia en el grupo tratado con 1 mg se estabilizó en la décima semana y se mantuvo hasta la semana 14 cuando concluyeron las observaciones. Los demás grupos a partir de la tercera o quinta semana mostraron un incremento paulatino en el valor de la absorbancia, conforme transcurrieron los días postinfección, hasta el término del experimento en la semana 14.

La detección de anticuerpos circulantes contra productos de excreción/secreción de Fasciola hepatica mostró el siguiente patrón de actividad: los conejos del grupo control de infección y los que recibieron de 0.13 mg a 0.5 mg, fueron positivos al ELISA a partir de la séptima semana postinfección; en contraste, el grupo con mayor nivel de GLX (1 mg) mostró seropositividad desde la cuarta

semana y el grupo con 0.07 mg de GLX la manifestó hasta la décima semana. Dependiendo de la cantidad de GLX administrado, de la tercera a la sexta semana, se observó un incremento paulatino en el valor de la absorbancia, conforme transcurrieron los días postinfección, hasta el término del experimento en la semana 14. Asimismo, al emplear productos de excreción/secreción, el valor de la absorbancia en el grupo tratado con 1 mg se estabilizó en la décima semana y se mantuvo hasta la semana 14 cuando concluyeron las observaciones.

En el análisis de las regresiones múltiples se encontraron diferencias esperadas ($P < 0.005$) entre los grupos control de infección y el grupo control no infectado en ambos antígenos; además con el antígeno somático se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre el grupo control de infección y el grupo VI (0.07 mg de glicocálix); en los demás grupos, con ambos antígenos, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre la absorbancia del grupo control de infección y los grupos experimentales (cuadros 23, 24, 25 y 26).

G) CUADROS Y FIGURAS

CUADRO No. 4. NUMERO PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL ENSAYO EXPLORATORIO. n = 6

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x}	s
I	a / a	8.3	2.9
II	b / b	5.7	3.1
III	b / c	10.5	3.9
IV	b / d	7.0	3.4
V	a / e	5.6	3.3
VI	a / f	6.3	3.7

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío;
SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;
ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;
a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;
c: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF+ 1 mg GLX;
d: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF + 2 mg GLX;
e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 5. NUMERO PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL PRIMER ENSAYO. n = 10

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x}	s
I	a / a	6.7	6.4
II	b / b	9.3	7.2
III	b / e	9.5	5.8
IV	a / e	10.2	6.5

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix; a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF; e: 0.5 ml SSAF + 1 .mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 6. NUMERO PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL SEGUNDO ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	\bar{x}	s	n
I	SSAF	3.5	1.97	6
II	SSAF + 1 mg GLX	5.0	3.08	6
III	SSAF + 0.5 mg GLX	6.6	4.13	6
IV	SSAF + 0.25 mg GLX	3.8	2.58	6
V	SSAF + 0.13 mg GLX	3.8	2.13	6
VI	SSAF + 0.07 mg GLX	1.25	0.82	6
	CONTROL NO INFECTADO	-	-	4

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; n: número de repeticiones por grupo; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos (1 ml); GLX: glicocálix.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

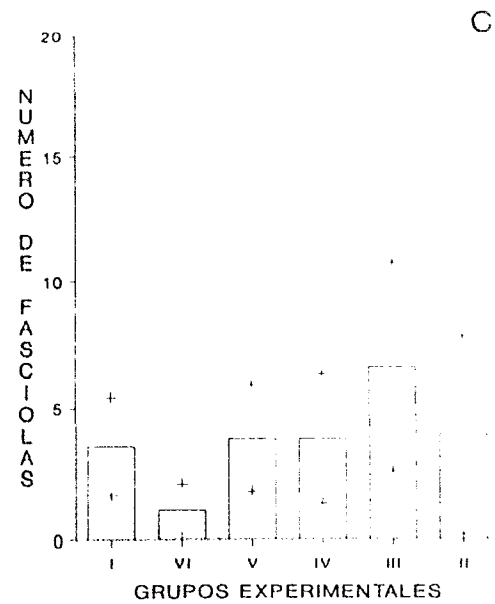
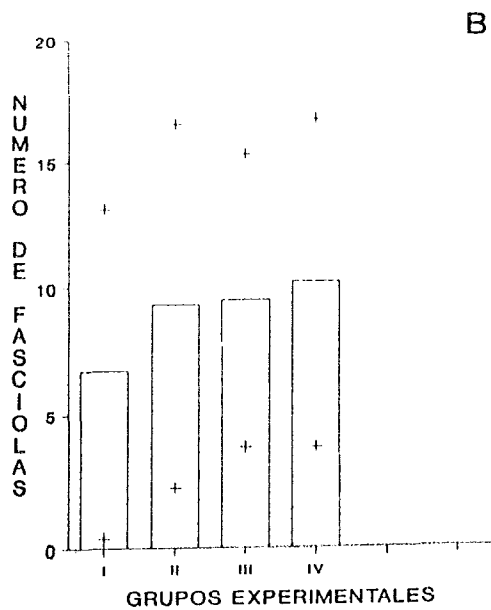
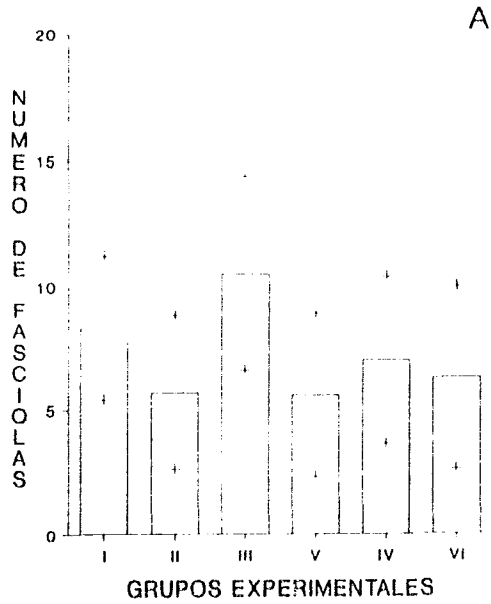


FIGURA 1. NUMERO PROMEDIO DE PARASITOS OBTENIDOS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS. CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES; A: ENSAYO EXPLORATORIO, n: 6; B: PRIMER ENSAYO, n: 10; C: SEGUNDO ENSAYO, n: 6. LA DESVIACION ESTANDAR SE REPRESENTA POR (+).

CUADRO No. 7. LONGITUD PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL ENSAYO EXPLORATORIO.

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x} (mm)	s (mm)	n
I	a / a	8.3	2.2	47
II	b / b	8.9	2.3	25
III	b / c	8.9	2.4	50
IV	b / d	8.8	2.6	40
V	a / e	8.3	1.9	29
VI	a / f	9.4	1.7	29

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; n: número de fasciolas medidas por grupo; sm ad.: semanas: antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;

a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;

c: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF+ 1 mg GLX;

d: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF + 2 mg GLX;

e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 8. LONGITUD PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL PRIMER ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x} (mm)	s (mm)	n
I	a / a	10.1	1.8	61
II	b / b	10.6	2.6	84
III	b / e	11.0	2.4	95
IV	a / e	9.9	2.3	102

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; n: número de fasciolas medidas por grupo; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix; a: 0.5 ml SSAF;
b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF; e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 9. LONGITUD PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL SEGUNDO ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	\bar{x} (mm)	s (mm)	n
I	SSAF	15.0	4.8	14
II	SSAF + 1 mg GLX	19.5	2.1	12
III	SSAF + 0.5 mg GLX	16.6	2.8	36
IV	SSAF + 0.25 mg GLX	18.0	4.1	19
V	SSAF + 0.13 mg GLX	16.1	3.2	23
VI	SSAF + 0.07 mg GLX	15.0	2.8	5

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; n: número de fasciolas medidas por grupo; sm ad.: semanas antes del desafío;
SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos (1 ml);
GLX: glicocálix.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

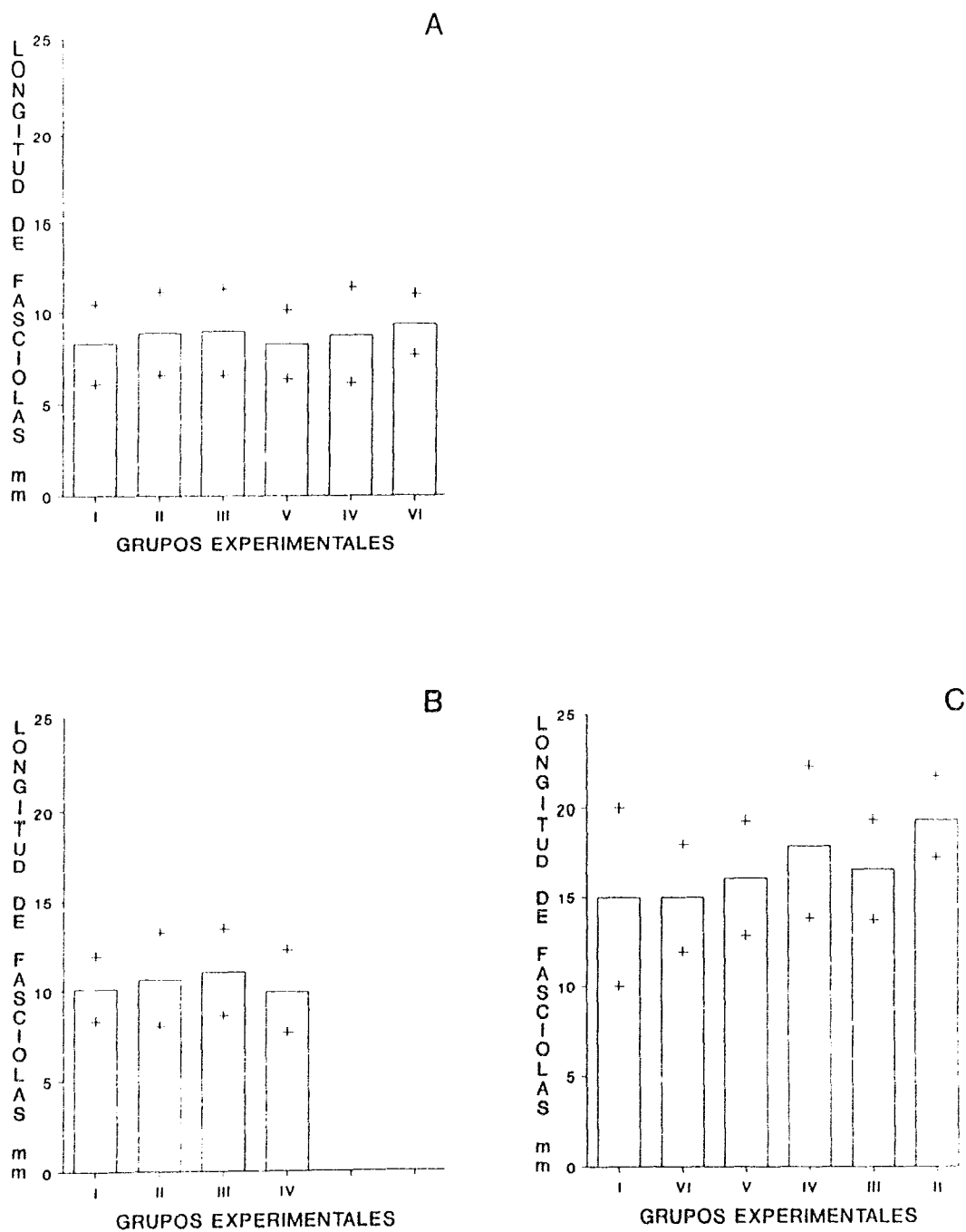


FIGURA No. 2. LONGITUD PROMEDIO DE PARASITOS OBTENIDOS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS. CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO DE n EJEMPLARES MEDIDOS; A: ENSAYO EXPLORATORIO, n : 25-50; B: PRIMER ENSAYO, n : 61-102; C: SEGUNDO ENSAYO, n : 5-36. LA DESVIACION ESTANDAR SE REPRESENTA POR (+).

CUADRO No. 10. ANCHO PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL SEGUNDO ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	\bar{x} (mm)	s (mm)	n
I	SSAF	5.98	1.46	14
II	SSAF + 1 mg GLX	7.54	0.87	12
III	SSAF + 0.5 mg GLX	7.34	1.59	36
IV	SSAF + 0.25 mg GLX	6.61	1.22	19
V	SSAF + 0.13 mg GLX	6.43	1.19	23
VI	SSAF + 0.07 mg GLX	6.22	1.12	5

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; n: número de fasciolas medidas por grupo; sm ad.: semanas antes del desafío;
SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos (1 ml);
GLX: glicocálix.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

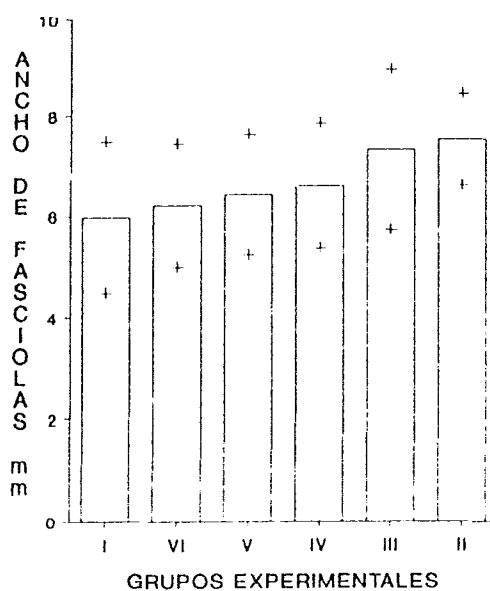


FIGURA No. 3. ANCHO PROMEDIO DE PARASITOS OBTENIDOS A LA NECROPSIA EN LOS CONEJOS DEL SEGUNDO ENSAYO. CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO ENTRE 5 Y 36 EJEMPLARES MEDIDOS, LA DESVIACION ESTANDAR SE REPRESENTA POR (+).

CUADRO No. 11. GANANCIA DE PESO PROMEDIO DE LOS CONEJOS DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO. n = 6

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x} (g)	s (g)
I	a / a	938	230
II	b / b	927	308
III	b / c	1,038	156
IV	b / d	1,273	217
V	a / e	887	282
VI	a / f	909	235

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío;

SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;

ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;

a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;

c: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF+ 1 mg GLX;

d: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF + 2 mg GLX;

e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 12. GANANCIA DE PESO PROMEDIO DE LOS CONEJOS DURANTE EL PRIMER ENSAYO. n = 10

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x} (g)	s (g)
I	a / a	1,098	185
II	b / b	1,139	234
III	b / e	1,079	290
IV	a / e	963	325

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix; a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF; e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 13. GANANCIA DE PESO PROMEDIO DE LOS CONEJOS DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	\bar{x} (g)	s (g)	n
I	SSAF	1,412	205	6
II	SSAF + 1 mg GLX	1,540	597	6
III	SSAF + 0.5 mg GLX	1,088	411	6
IV	SSAF + 0.25 mg GLX	1,302	435	6
V	SSAF + 0.13 mg GLX	1,277	438	6
VI	SSAF + 0.07 mg GLX	1,360	411	6
	CONTROL NO INFECTADO	1,375	135	4

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; n: número de repeticiones por grupo; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos (1 ml); GLX: glicocálix; .

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

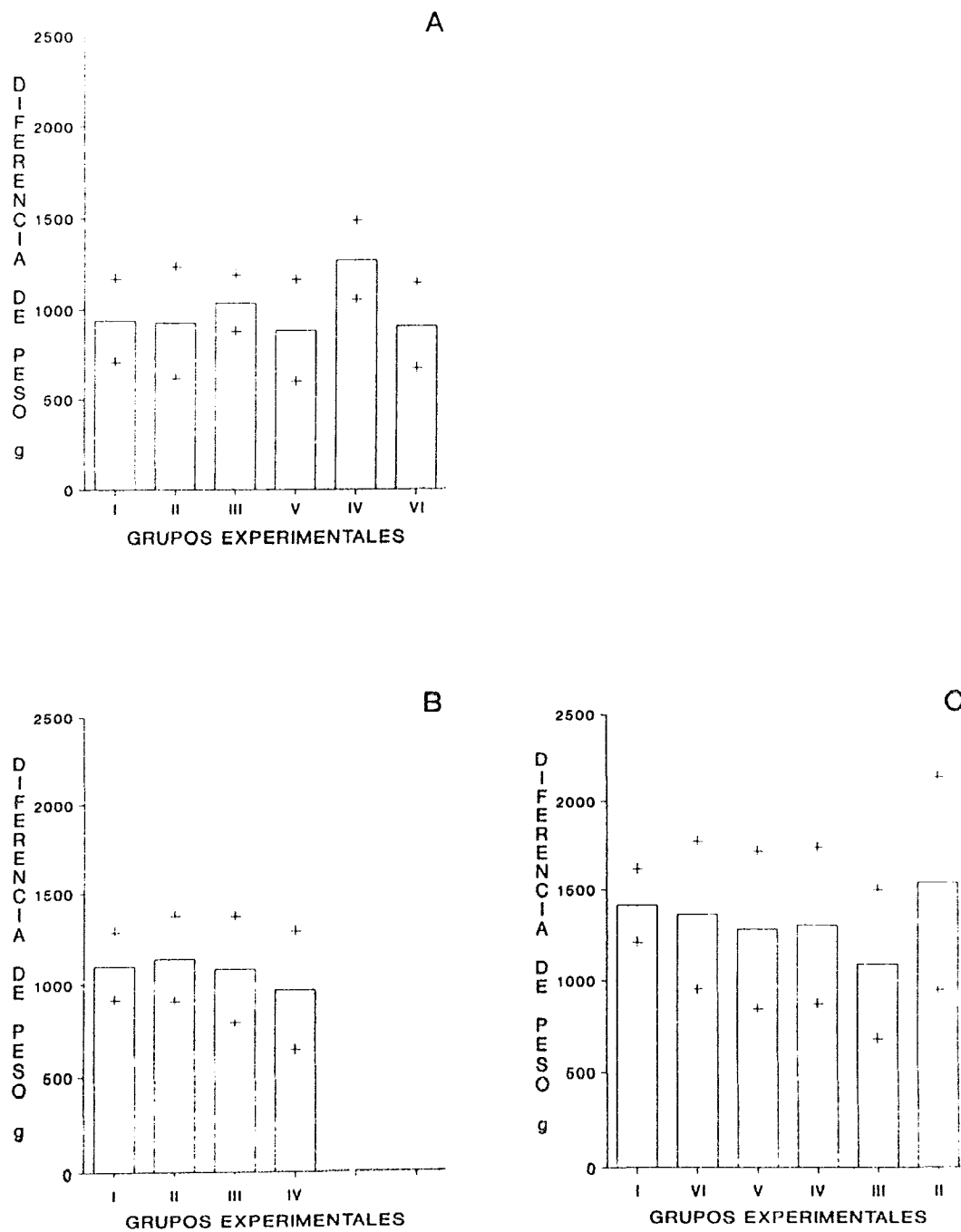


FIGURA No. 4. GANANCIA DE PESO PROMEDIO DE LOS CONEJOS. CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES. A: ENSAYO EXPLORATORIO, n : 6; B: PRIMER ENSAYO, n : 10; C: SEGUNDO ENSAYO, n : 6. LA DESVIACION ESTANDAR SE REPRESENTA POR (+).

CUADRO No. 14. PESO PROMEDIO DEL HIGADO DE LOS CONEJOS A LA NECROPSIA DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO. n = 6

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x} (g)	s (g)
I	a / a	83.7	14.3
II	b / b	78.3	12.5
III	b / c	93.0	7.9
IV	b / d	99.2	10.6
V	a / e	97.9	15.3
VI	a / f	85.9	13.5

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío;

SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;

ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;

a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;

c: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF+ 1 mg GLX;

d: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF + 2 mg GLX;

e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 15. PESO PROMEDIO DEL HIGADO DE LOS CONEJOS A LA NECROPSIA DURANTE EL PRIMER ENSAYO. n = 10

GRUPO	TRATAMIENTO 4 / 2 sm ad.	\bar{x} (g)	s (g)
I	a / a	65.9	14.2
II	b / b	70.3	10.1
III	b / e	68.7	14.7
IV	a / e	65.7	15.2

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix; a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF; e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 16. PESO PROMEDIO DEL HIGADO DE LOS CONEJOS A LA NECROPSIA DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO. n = 6

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	\bar{x} (g)	s (g)
I	SSAF	96	15.2
II	SSAF + 1 mg GLX	90	21.6
III	SSAF + 0.5 mg GLX	97	9.6
IV	SSAF + 0.25 mg GLX	100	20.0
V	SSAF + 0.13 mg GLX	98	19.4
VI	SSAF + 0.07 mg GLX	88	7.5

n: número de repeticiones por grupo; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; sm ad.: semanas antes del desafío; SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos (1 ml); GLX: glicocálix.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

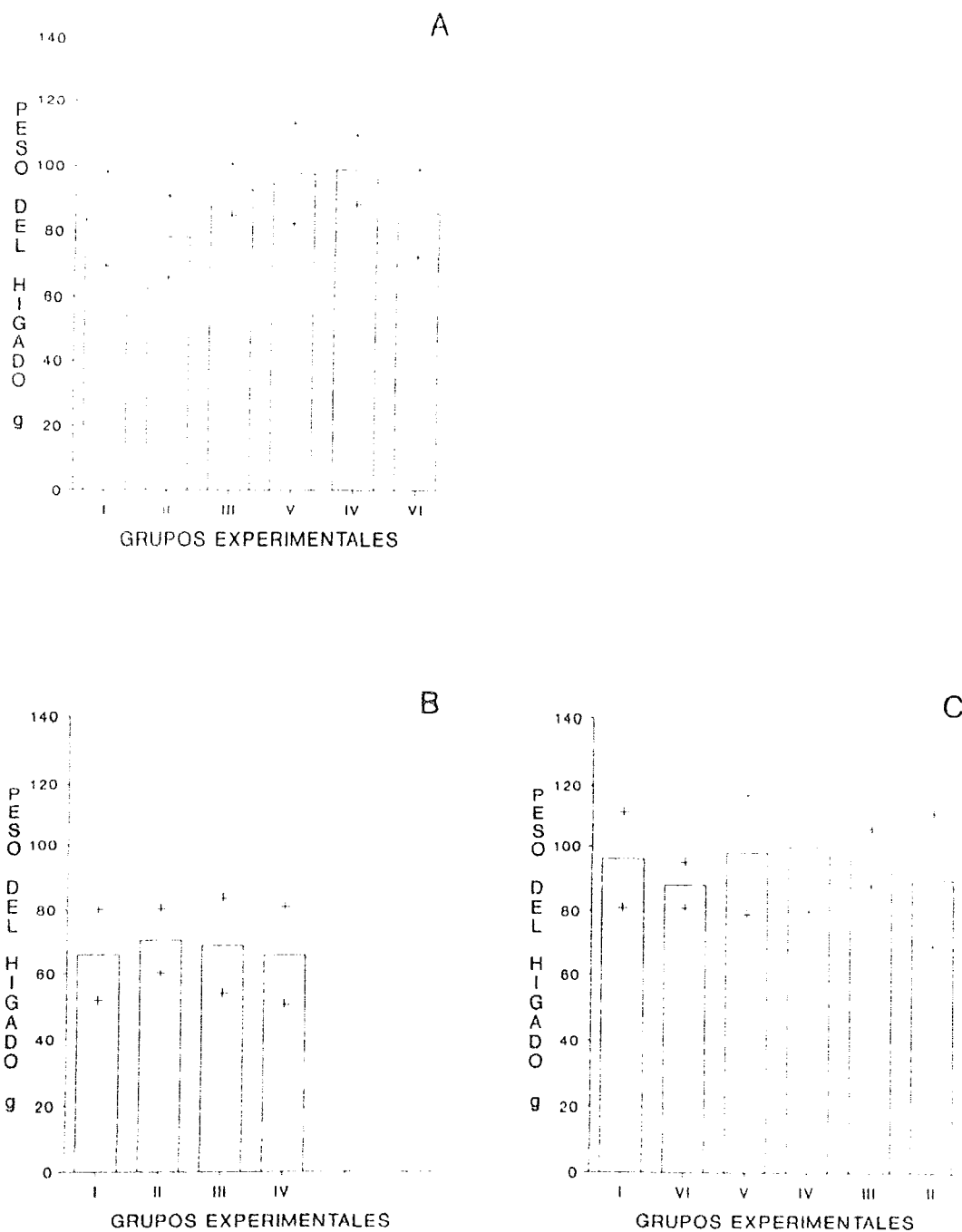


FIGURA No. 5. PESO PROMEDIO DEL HIGADO DE LOS CONEJOS A LA NECROPSIA. CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES. A: ENSAYO EXPLORATORIO, n : 6; B: PRIMER ENSAYO, n : 10; C: SEGUNDO ENSAYO, n : 6. LA DESVIACION ESTANDAR SE REPRESENTA POR (+).

CUADRO No. 17. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE F. hepatica DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO.

semanas post- infección	GRUPOS EXPERIMENTALES					
	I	II	III	IV	V	VI
-3 (a)	\bar{x} : 0.079	0.193	0.148	0.148	0.109	0.084
	s: 0.046	0.078	0.061	0.051	0.038	0.037
-1 (b)	\bar{x} : 0.170	0.214	0.201	0.153	0.155	0.158
	s: 0.110	0.109	0.096	0.043	0.064	0.113
4 (a)	\bar{x} : 0.223	0.517	0.646	0.546	0.235	0.356
	s: 0.018	0.130	0.0	0.0	0.108	0.143
6 (b)	\bar{x} : 0.681	0.757	0.733	0.765	0.738	0.626
	s: 0.050	0.102	0.140	0.176	0.097	0.142
7 (a)	\bar{x} : 0.894	0.977	0.770	1.017	1.146	1.188
	s: 0.057	0.282	0.087	0.075	0.133	0.129
8 (b)	\bar{x} : 0.744	0.754	0.832	0.784	0.905	0.692
	s: 0.075	0.187	0.165	0.095	0.010	0.035

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar;
(a), (b): subgrupos de tres conejos cada uno;
semanas negativas corresponden al período de preinfección;
GRUPOS / TRATAMIENTOS (ver CUADRO 1).
I: a/a; II: b/b; III: b/c; IV: b/d; V: a/e; VI: a/f;
a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;
c: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF+ 1 mg GLX;
d: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF + 2 mg GLX;
e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

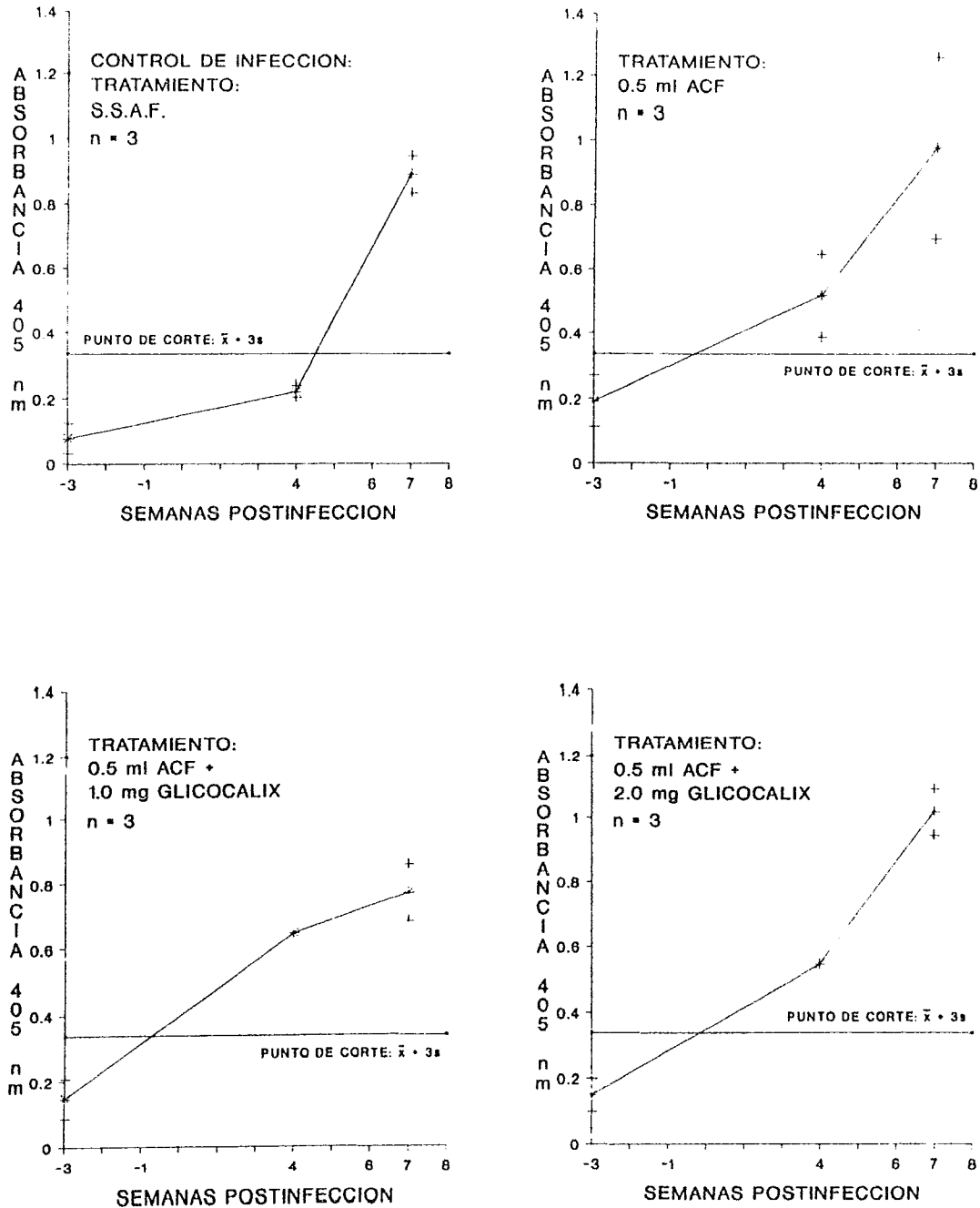


FIGURA No. 6. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO, SUBGRUPO a. EN LAS SEMANAS 4 Y 2 ANTES DE LA INFECCION SE APLICO EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 40 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

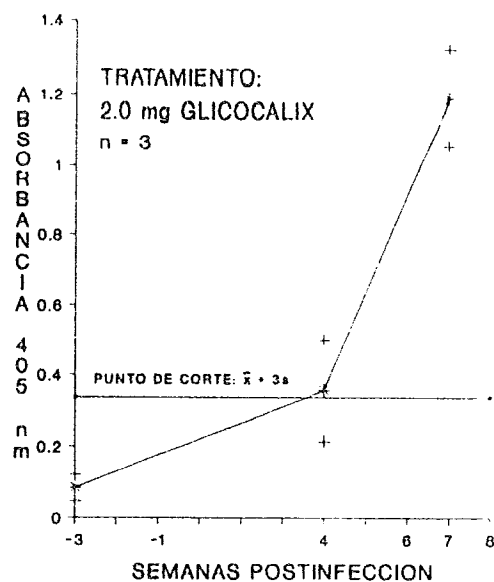
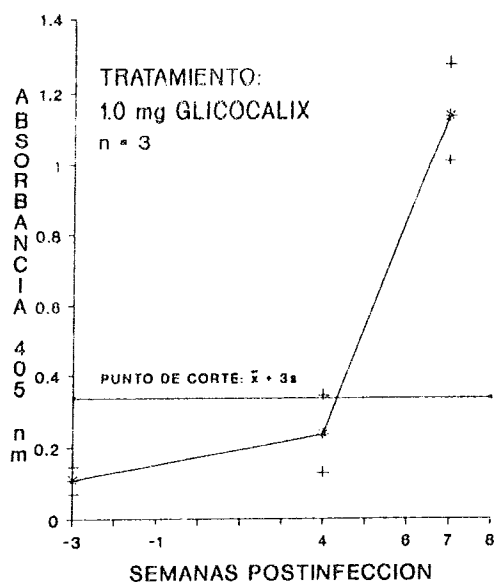
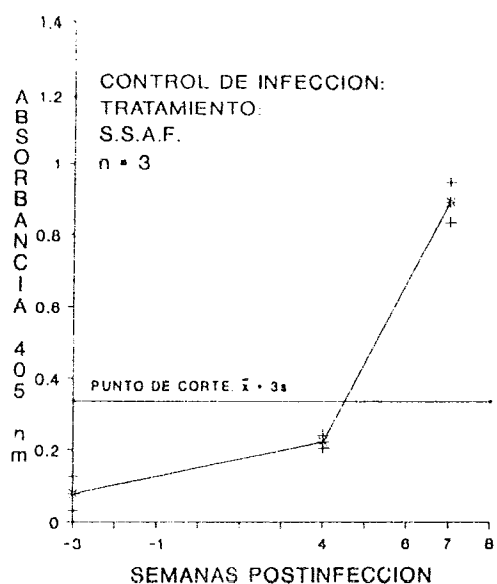


FIGURA No. 7. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO, SUBGRUPO a. EN LAS SEMANAS 4 Y 2 ANTES DE LA INFECCION SE APLICÓ EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 40 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VÍA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

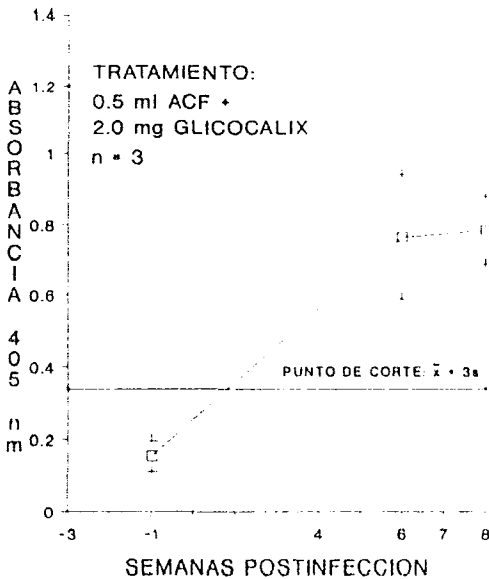
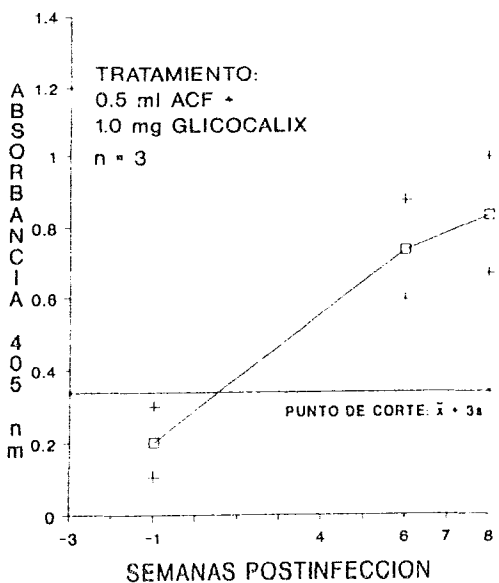
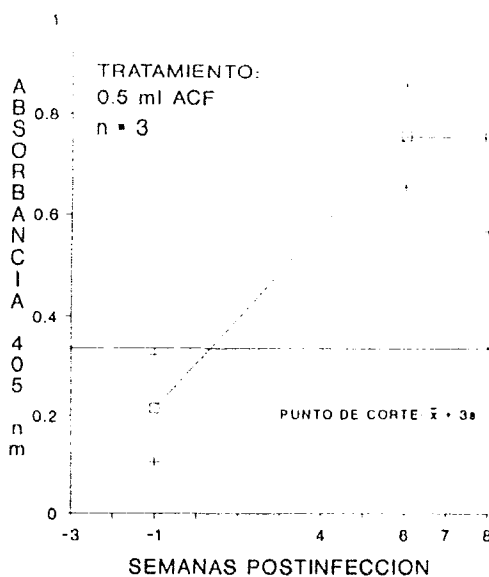
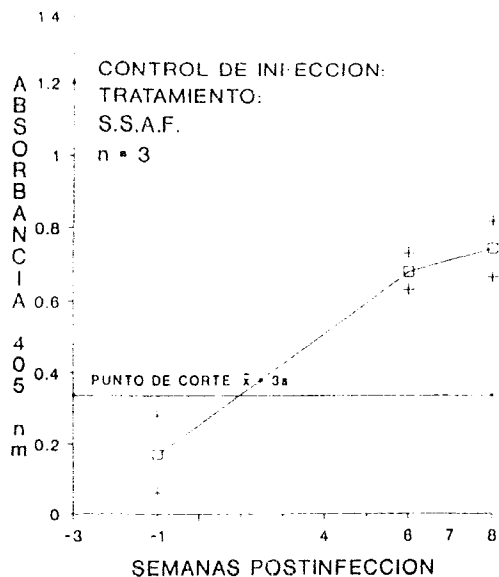


FIGURA No. 8. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO, SUBGRUPO b. EN LAS SEMANAS 4 Y 2 ANTES DE LA INFECCION SE APLICO EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 40 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

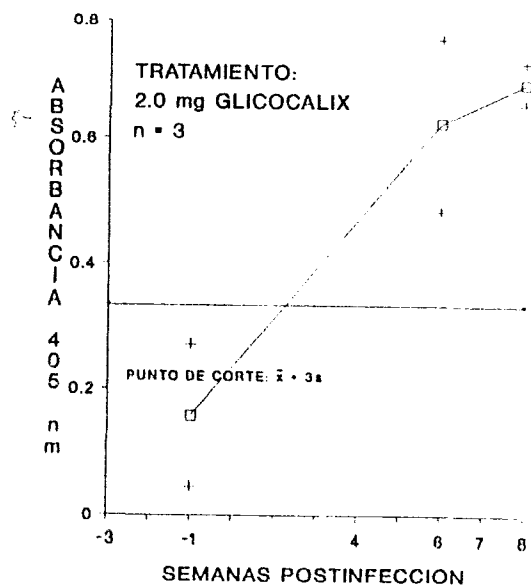
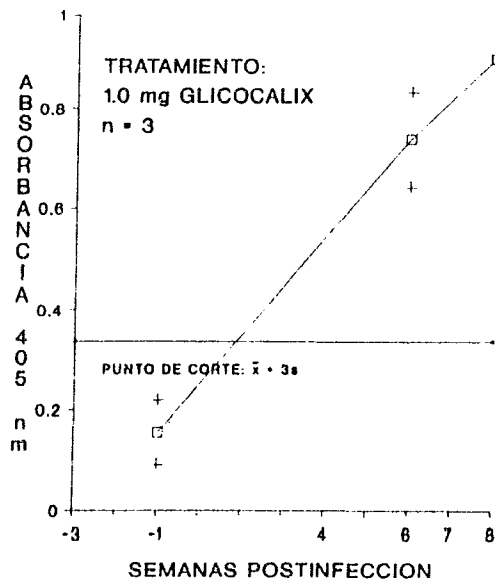
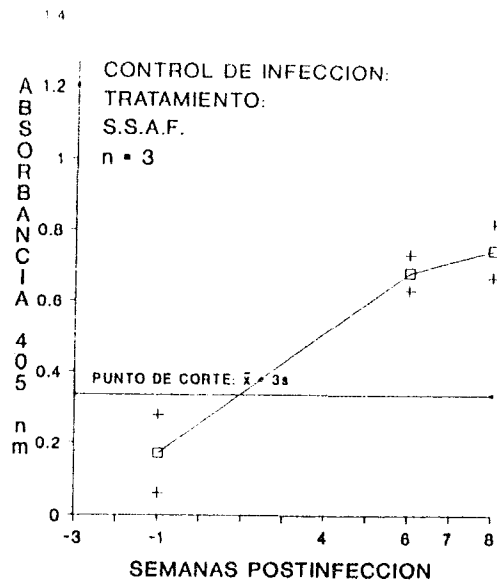


FIGURA No. 9. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO, SUBGRUPO b. EN LAS SEMANAS 4 Y 2 ANTES DE LA INFECCION SE APLICÓ EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 40 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

CUADRO No. 18. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE F. hepatica DURANTE EL PRIMER ENSAYO.

semanas post- infección	GRUPOS EXPERIMENTALES				
	I	II	III	IV	
-5	\bar{x} :	0.035	0.040	0.030	0.027
	s:	0.012	0.017	0.022	0.010
-2	\bar{x} :	0.023	0.020	0.015	0.014
	s:	0.016	0.024	0.019	0.021
1	\bar{x} :	0.035	0.052	0.041	0.029
	s:	0.024	0.028	0.022	0.016
3	\bar{x} :	0.044	0.085	0.078	0.064
	s:	0.045	0.044	0.062	0.068
5	\bar{x} :	0.455	0.464	0.513	0.500
	s:	0.067	0.170	0.197	0.211
7	\bar{x} :	1.024	0.822	0.983	0.897
	s:	0.245	0.125	0.212	0.324

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; número de repeticiones: 10; semanas negativas corresponden al período de preinfección.
 GRUPOS / TRATAMIENTOS (ver CUADRO 2).
 I: a/a; II: b/b; III: b/e; IV: a/e;
 a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;
 e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX.

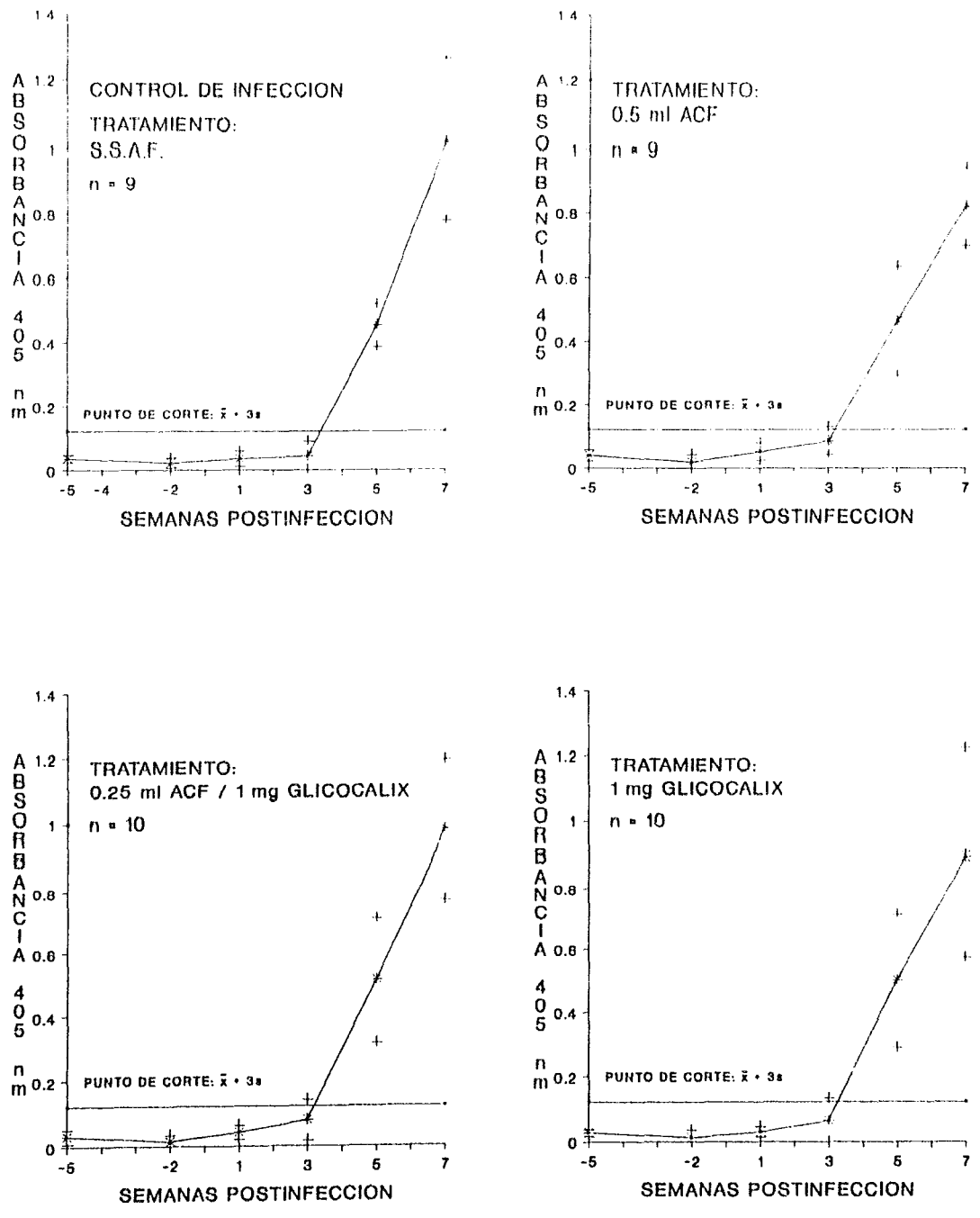


FIGURA No. 10. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL PRIMER ENSAYO. EN LAS SEMANAS 4 Y 2 ANTES DE LA INFECCION SE APLICO EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 40 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (s).

CUADRO No. 19. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE F. hepatica DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

semanas post- infección	GRUPOS EXPERIMENTALES					
	I	II	III	IV	V	VI
0	\bar{x} : 0.042	0.046	0.051	0.050	0.052	0.044
	s: 0.011	0.022	0.024	0.014	0.015	0.005
2	\bar{x} : 0.053	0.094	0.103	0.084	0.091	0.067
	s: 0.019	0.032	0.026	0.056	0.055	0.024
4	\bar{x} : 0.099	0.274	0.269	0.215	0.127	0.157
	s: 0.195	0.098	0.218	0.082	0.058	
0.053						
7	\bar{x} : 0.435	0.464	0.448	0.525	0.360	
	s: 0.586	0.134	0.158	0.138	0.217	0.134
0.266						
10	\bar{x} : 0.488	0.503	0.541	0.554	0.465	0.403
	s: 0.145	0.164	0.268	0.235	0.133	0.083
14	\bar{x} : 0.641	0.520	0.578	0.693	0.516	0.516
	s: 0.135	0.062	0.373	0.196	0.164	
0.125						

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; número de repeticiones: 6; semanas negativas corresponden al período de preinfección;

GRUPOS / TRATAMIENTOS (ver CUADRO 3).

I: g; II: h; III: i; IV: j; V: k; VI: l; 0: g;

g: 1 ml de SSAF; h: 1 mg de GLX + 1 ml de SSAF;

i: 0.5 mg de GLX + 1 ml de SSAF;

j: 0.25 mg de GLX + 1 ml de SSAF;

k: 0.13 mg de GLX + 1 ml de SSAF;

l: 0.07 mg de GLX + 1 ml SSAF .

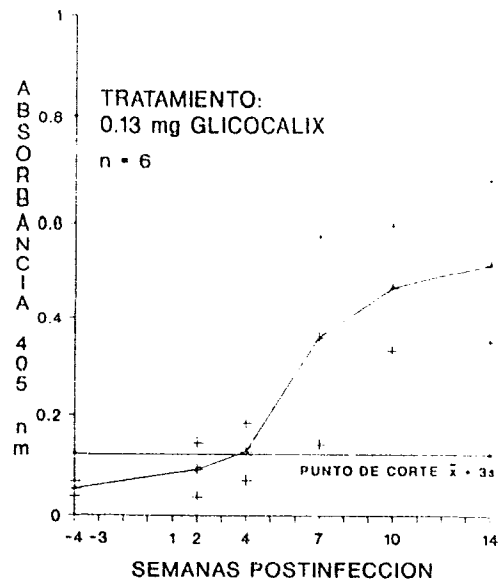
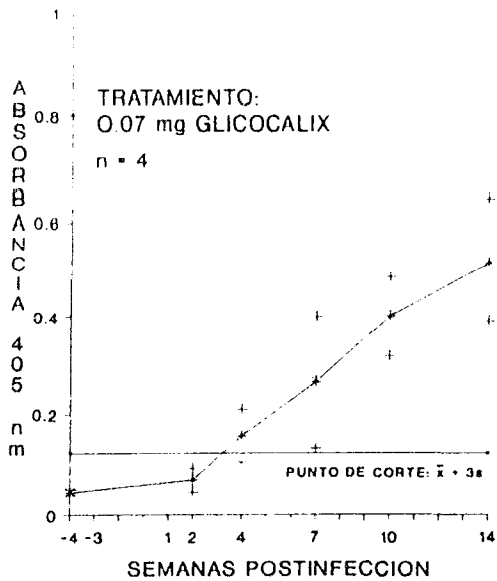
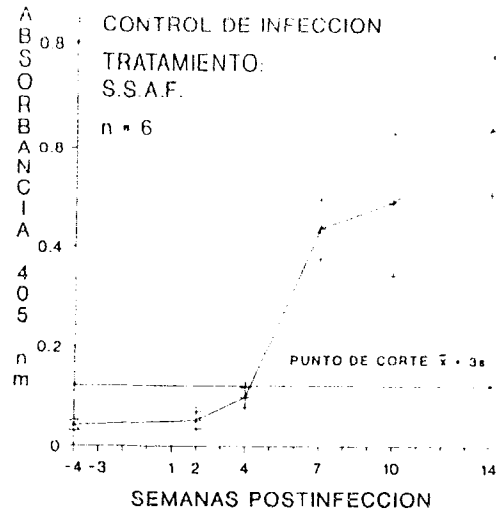
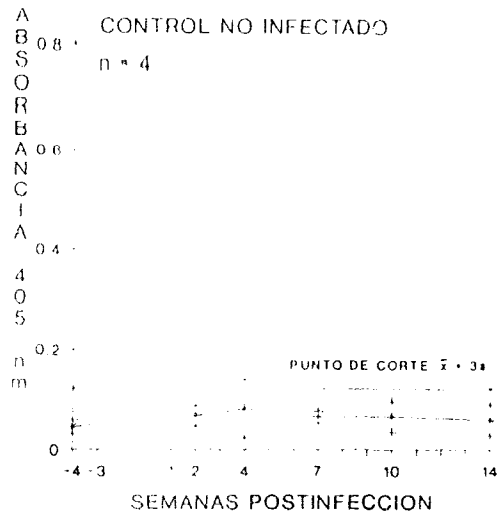


FIGURA No. 11. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO. TRES SEMANAS ANTES DE LA INFECCION SE APLICO EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 80 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

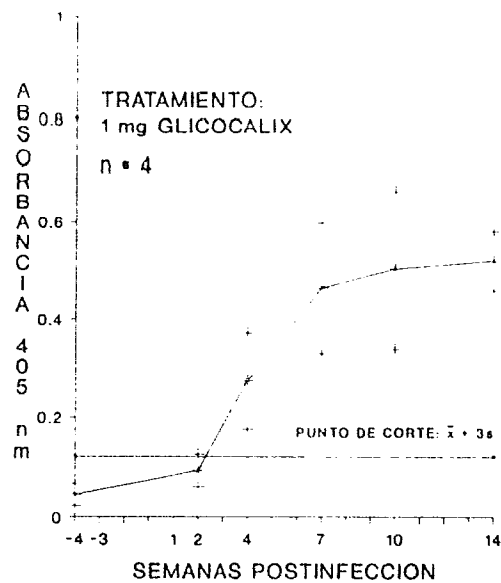
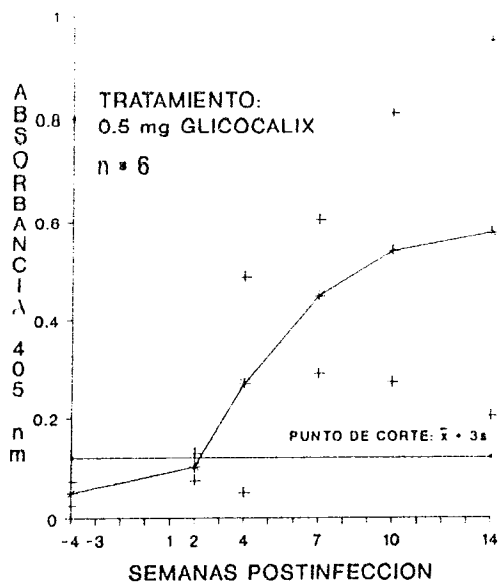
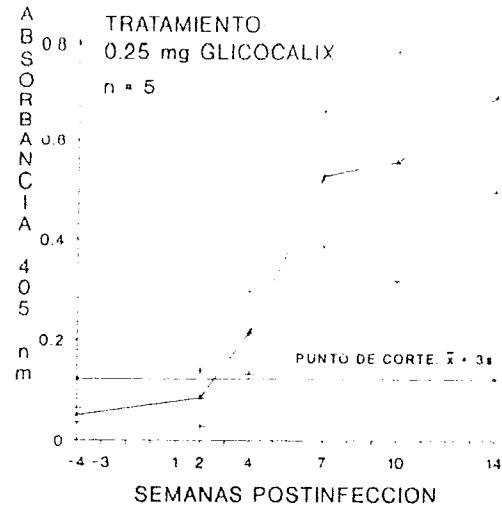
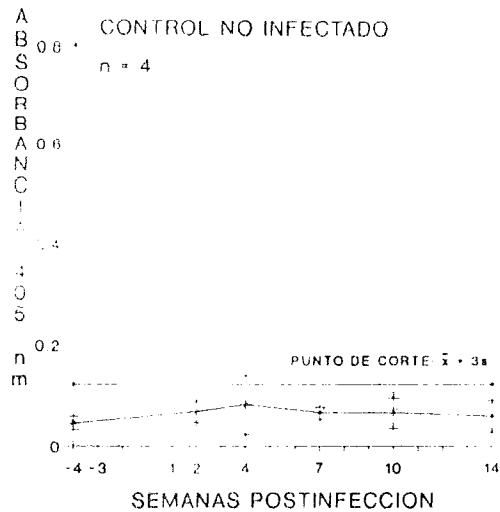


FIGURA No. 12. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO. TRES SEMANAS ANTES DE LA INFECCION SE APLICÓ EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 80 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

CUADRO No. 20. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA PRODUCTOS DE EXCRECION/SECRECION DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

semanas post- infección	GRUPOS EXPERIMENTALES					
	I	II	III	IV	V	VI
-4	\bar{x} : 0.049	0.048	0.078	0.078	0.056	0.039
	s: 0.020	0.029	0.051	0.027	0.020	0.007
0	\bar{x} : 0.040	0.137	0.084	0.074	0.072	0.081
	s: 0.015	0.050	0.028	0.020	0.027	0.029
4	\bar{x} : 0.074	0.247	0.188	0.145	0.128	0.079
	s: 0.023	0.065	0.050	0.078	0.103	
0.017						
7	\bar{x} : 0.230	0.708	0.449	0.440	0.391	
0.253	s: 0.073	0.403	0.215	0.103	0.163	0.172
10	\bar{x} : 0.733	0.786	0.630	0.573	0.612	0.533
	s: 0.153	0.322	0.124	0.118	0.175	0.288
14	\bar{x} : 0.865	0.816	0.763	0.793	0.727	0.653
	s: 0.246	0.125	0.085	0.253	0.112	
0.252						

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; número de repeticiones: 6; semanas negativas corresponden al período de preinfección; GRUPOS / TRATAMIENTOS (ver CUADRO 3).

I: g; II: h; III: i; IV: j; V: k; VI: l; 0: g;
 g: 1 ml de SSAF; h: 1 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 i: 0.5 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 j: 0.25 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 k: 0.13 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 l: 0.07 mg de GLX + 1 ml SSAF .

CUADRO No. 21. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE F. hepatica DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

Grupo control no infectado. n = 4 semanas postinfección	\bar{x}	s
-4 preinfección	0.046	0.014
2	0.068	0.021
4	0.082	0.059
7	0.066	0.011
10	0.066	0.031
14	0.059	0.032

n: número de repeticiones; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar.

CUADRO No. 22. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA PRODUCTOS DE EXCRECION/SECRECION DE F. hepatica DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

Grupo control no infectado. n = 4 semanas postinfección	\bar{x}	s
-4 preinfección	0.064	0.011
2	0.056	0.013
4	0.056	0.065
7	0.034	0.012
10	0.030	0.013
14	0.018	0.005

n: número de repeticiones; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar.

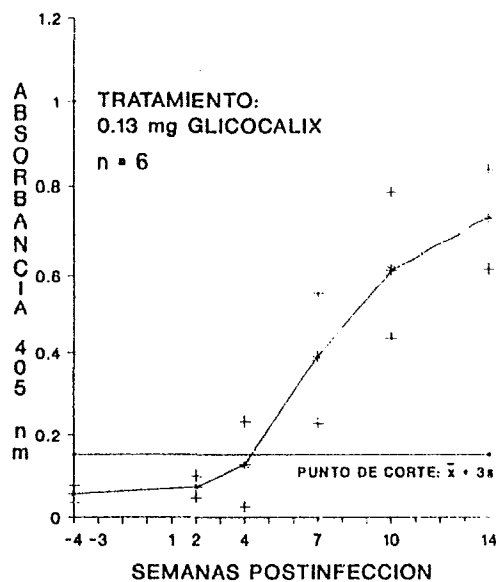
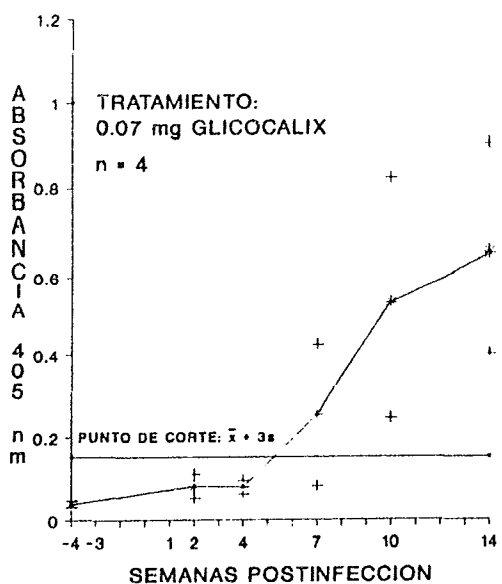
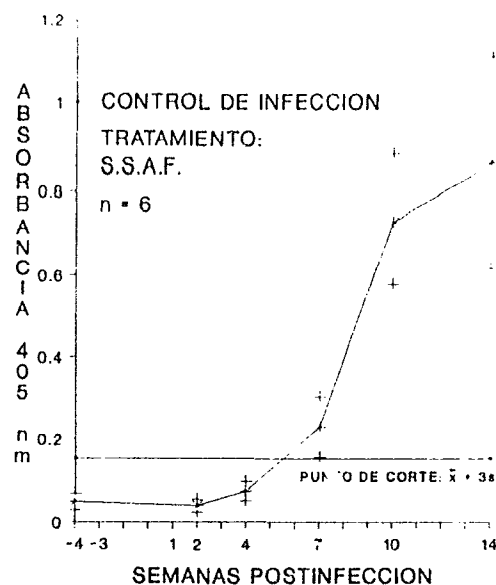
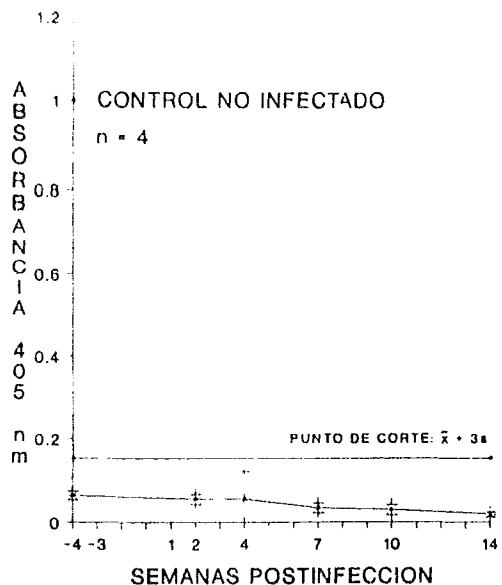


FIGURA No. 13. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA PRODUCTOS DE EXCRECION/SECRECION DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO. TRES SEMANAS ANTES DE LA INFECCION SE APLICO EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 80 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

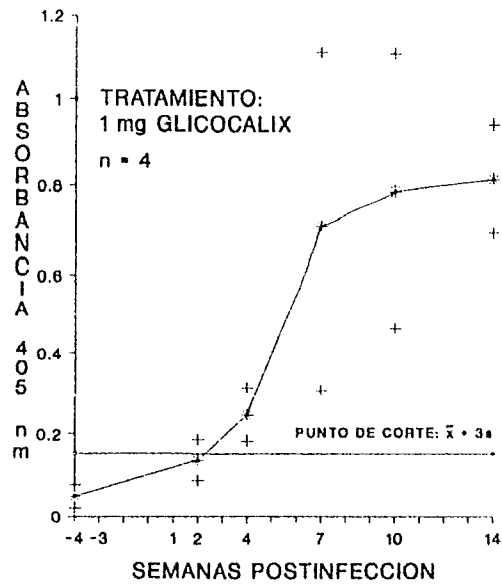
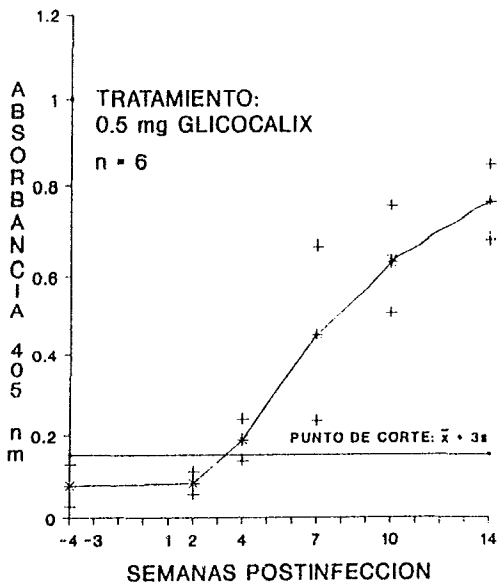
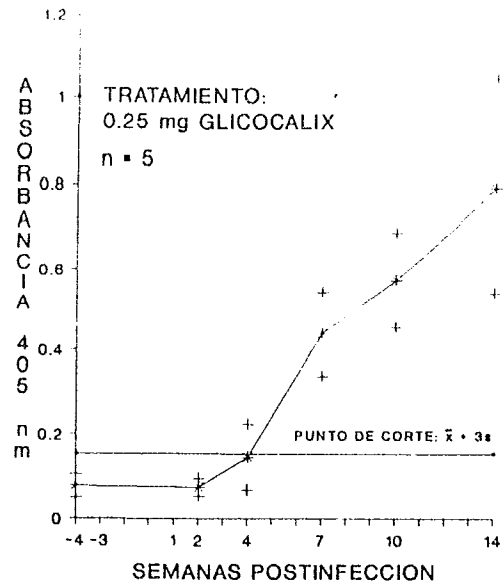
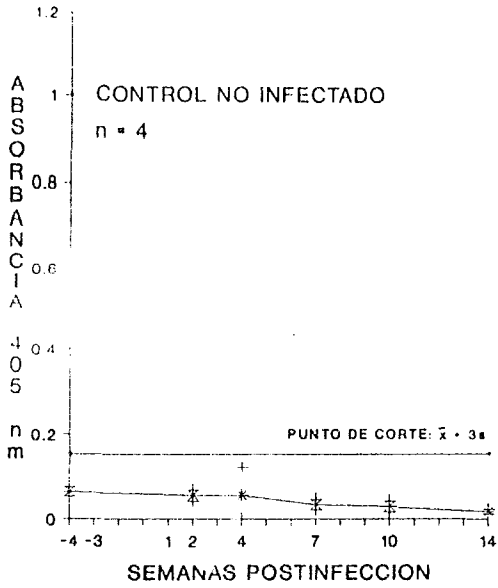


FIGURA No. 14. VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA PRODUCTOS DE EXCRECION/SECRECION DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO. TRES SEMANAS ANTES DE LA INFECCION SE APLICO EL TRATAMIENTO INDICADO; EN LA SEMANA 1 SE ADMINISTRARON 80 METACERCARIAS DE *F. hepatica* POR VIA ORAL. CADA PUNTO (*) REPRESENTA EL PROMEDIO DE n ANIMALES, LA DESVIACION ESTANDAR (s) ESTA REPRESENTADA POR (+).

CUADRO No. 23. EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LOS VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL ENSAYO EXPLORATORIO.

VI *a / f* $F = P_{0a} + P_{0b} X + P_{0c} Y + P_{0d} XY$

sm ad.: semanas antes del desafío;
 SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;
 ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocalix;
 c: 0,25 ml SSAF + 0,25 ml ACF + 1 mg GLX;
 d: 0,25 ml SSAF + 0,25 ml ACF + 2 mg GLX;
 e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX; f: 0.5 ml SSAF + 2 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 24. EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LOS VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL PRIMER ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO	ECUACION DE REGRESION LINEAL
I	a / a	$Y_i = \beta_{01} + \beta_{11} X_i + \beta_{21} Z_i + \beta_{31} ZX_i$
II	b / b	$Y_i = \beta_{02} + \beta_{12} X_i + \beta_{22} Z_i + \beta_{32} ZX_i$
III	b / e	$Y_i = \beta_{03} + \beta_{13} X_i + \beta_{23} Z_i + \beta_{33} ZX_i$
IV	a / e	$Y_i = \beta_{04} + \beta_{14} X_i + \beta_{24} Z_i + \beta_{34} ZX_i$

sm ad.: semanas antes del desafío;

SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos;

ACF: adyuvante completo de Freund; GLX: glicocálix;

a: 0.5 ml SSAF; b: 0,25 ml SSAF + 0.25 ml ACF;

e: 0.5 ml SSAF + 1 mg GLX.

No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre grupos.

CUADRO No. 25. EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LOS VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA UN EXTRACTO CRUDO DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	ECUACION DE REGRESION LINEAL
I	g	(a) $Y_i = \beta_{01} + \beta_{11} X_i + \beta_{21} Z_i + \beta_{31} ZX_i$
II	h	(a) $Y_i = \beta_{02} + \beta_{12} X_i + \beta_{22} Z_i + \beta_{32} ZX_i$
III	i	(a) $Y_i = \beta_{03} + \beta_{13} X_i + \beta_{23} Z_i + \beta_{33} ZX_i$
IV	j	(a) $Y_i = \beta_{04} + \beta_{14} X_i + \beta_{24} Z_i + \beta_{34} ZX_i$
V	k	(a) $Y_i = \beta_{05} + \beta_{15} X_i + \beta_{25} Z_i + \beta_{35} ZX_i$
VI	l	(b) $Y_i = \beta_{06} + \beta_{16} X_i + \beta_{26} Z_i + \beta_{36} ZX_i$
0	g	(c) $Y_i = \beta_{06} + \beta_{16} X_i + \beta_{26} Z_i + \beta_{36} ZX_i$

sm ad.: semanas antes del desafío;
 SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; GLX: glicocálix;
 I: grupo control de infección; 0: grupo control no infectado;
 g: 1 ml de SSAF; h: 1 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 i: 0.5 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 j: 0.25 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 k: 0.13 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
 l: 0.07 mg de GLX + 1 ml SSAF .

Tratamientos con distinta letra son distintos al grupo control de infección, (b): (P<0.05); (c): (P<0.005).

CUADRO No. 26. EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LOS VALORES DE ABSORBANCIA A 405 nm OBTENIDOS EN EL ELISA PARA ANTICUERPOS IgG DE CONEJO CONTRA PRODUCTOS DE EXCRECION/SECRECION DE *F. hepatica* DURANTE EL SEGUNDO ENSAYO.

GRUPO	TRATAMIENTO 3 sm ad.	ECUACION DE REGRESION LINEAL
I	g	(a) $Y_i = \beta_{01} + \beta_{11} X_i + \beta_{21} Z_i + \beta_{31} ZX_i$
II	h	(a) $Y_i = \beta_{02} + \beta_{12} X_i + \beta_{22} Z_i + \beta_{32} ZX_i$
III	i	(a) $Y_i = \beta_{03} + \beta_{13} X_i + \beta_{23} Z_i + \beta_{33} ZX_i$
IV	j	(a) $Y_i = \beta_{04} + \beta_{14} X_i + \beta_{24} Z_i + \beta_{34} ZX_i$
V	k	(a) $Y_i = \beta_{05} + \beta_{15} X_i + \beta_{25} Z_i + \beta_{35} ZX_i$
VI	l	(a) $Y_i = \beta_{06} + \beta_{16} X_i + \beta_{26} Z_i + \beta_{36} ZX_i$
0	g	(c) $Y_i = \beta_{06} + \beta_{16} X_i + \beta_{26} Z_i + \beta_{36} ZX_i$

sm ad.: semanas antes del desafío;
SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos; GLX: glicocálix;
I: grupo control de infección; 0: grupo control no infectado;
g: 1 ml de SSAF; h: 1 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
i: 0.5 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
j: 0.25 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
k: 0.13 mg de GLX + 1 ml de SSAF;
l: 0.07 mg de GLX + 1 ml SSAF .

Tratamientos con distinta letra son distintos al grupo control de infección, (c): ($P < 0.005$).

4. DISCUSION

- A) NUMERO PROMEDIO DE FASCIOLAS
- B) LONGITUD PROMEDIO DE FASCIOLAS
- C) GANANCIA DE PESO EN EL CONEJO
- D) PESO DEL HIGADO
- E) ANTICUERPOS IgG
- F) GLICOCALIX COMO INMUNOGENO

A) NUMERO PROMEDIO DE FASCIOLAS

Kendall y col. (40) al estudiar la respuesta inmune en una primera infección de Fasciola hepatica en el conejo, observaron que, al administrar una dosis de 10 a 30 metacercarias en animales con una edad entre 10 a 22 semanas en el momento de la infección, varió el porcentaje de fasciolas recuperadas del hígado entre $16.3\% \pm 1.9\%$ y $56.0\% \pm 3.4\%$ después de un intervalo de 8 a 20 semanas postinfección. En el presente estudio, la edad aproximada de los conejos en el momento de la infección osciló entre 16 y 20 semanas; al administrar 40 metacercarias en una sola dosis, el porcentaje de fasciolas recuperadas, después de una infección de 9 y 10 semanas, en los grupos control de infección varió entre $16.75\% \pm 16.0\%$ y $20.75\% \pm 7.25\%$; similarmente el porcentaje de parásitos hallados en los grupos tratados en los dos primeros ensayos varió entre $14.0\% \pm 8.25\%$ y $26.25\% \pm 9.75\%$. Al duplicar la dosis a 80 metacercarias el porcentaje de parásitos hallados en el hígado fue de $4.38\% \pm$

2.46% en el grupo control de infección, a su vez, en los grupos tratados con GLX se observó que el porcentaje de fasciolas recuperadas varió entre $1.56\% \pm 1.03\%$ y $8.25\% \pm 5.16\%$ después de una infección de 15 semanas.

En los tres ensayos realizados en el presente estudio, en ninguno de los tratamientos se observaron diferencias ($P > 0.05$) en el número de fasciolas recuperadas postsacrificio con respecto a los correspondientes grupos control de infección de cada ensayo. De esta manera no se observó efecto alguno de la administración del GLX en el número de fasciolas halladas en los conejos después de infecciones comprendidas entre 15 y 20 semanas.

Santiago (63) al estudiar la fasciolosis en conejos, en función de los huevos de Fasciola hepatica que dieron origen a las metacercarias del parásito, observó la implantación en el hígado de 37.5 ± 8.7 fasciolas al administrar 100 metacercarias de "origen bovino"; a la misma dosis de infección, observó la implantación de 13.5 ± 3.7 cuando las metacercarias fueron de "origen conejo" y de 7.8 ± 4.5 fasciolas con metacercarias de "origen ovino". En el presente estudio, en el ensayo exploratorio y en el primer ensayo, se emplearon 40 metacercarias de "origen bovino" y en el segundo ensayo 80 metacercarias de "origen ovino"; el menor número de fasciolas recuperadas en el segundo ensayo, con respecto a los dos ensayos precedentes es posible explicarse en parte por la mayor

infectividad de las metacercarias de origen "bovino" con respecto a las de origen "ovino" en el conejo.

Bautista y col. (8) en la evaluación del ACF sobre la infección experimental de F. hepatica en ovinos, encontraron diferencias ($P < 0.05$) en el número de fasciolas recuperadas postsacrificio al administrar 2 ml de ACF por vía intraperitoneal repartidos en dos dosis, cuatro y dos semanas antes del desafío. García (26) similarmente, al administrar 1 ml de ACF por vía intraperitoneal en una dosis en ovinos, obtuvo diferencias ($P < 0.05$) entre el tratamiento con ACF administrado siete días antes de la infección y el grupo control de infección; esta diferencia no se observó en los tratamientos cuando el adyuvante se administró 14 días antes de la infección, el día de la infección, así como 7 y 14 días después de la confrontación con metacercarias de F. hepatica. En el presente ensayo, al administrar una emulsión de 0.5 ml de ACF, emulsificado con SSAF o adicionado con 1 o 2 mg GLX, así como una emulsión de 0.25 ml de ACF con 1 mg de GLX, repartida en dos dosis, cuatro y dos semanas antes de la infección, no fue posible observar una reducción ($P > 0.05$) en el número de fasciolas con respecto al grupo control de infección en el conejo. Con base en lo anterior, no se observó efecto alguno del ACF en el número de fasciolas halladas entre los grupos tratados y los grupos control de infección.

B) LONGITUD PROMEDIO DE FASCIOLAS

Kendall y col. (40) observaron, en infecciones experimentales de Fasciola hepatica en el conejo, un desarrollo variable en la longitud promedio del parásito a las ocho semanas de infección que comprendió entre 1.09 cm \pm 0.03 cm y 1.19 cm \pm 0.03 cm; a las 12 semanas registraron un aumento del parásito de 1.47 cm \pm 0.14 cm y a las 20 semanas la longitud promedio del trematodo varió entre 1.70 cm \pm 0.041 cm y 2.27 cm \pm 0.05 cm. En el presente estudio la mayor longitud alcanzada a las nueve semanas de infección fue de 0.94 cm \pm 0.17 cm, a las diez semanas de 1.1 cm \pm 0.24 cm y a las 15 semanas postinfección la mayor longitud promedio observada fue de 1.95 cm \pm 0.21 cm. En todos los tratamientos del presente estudio no se observó diferencia ($P > 0.05$) en la longitud del parásito con respecto al grupo control de infección, lo cual indica que ninguno de los tratamientos afectó el tamaño del parásito.

C) GANANCIA DE PESO EN EL CONEJO

En ovinos se estima que una dosis de 10,000 metacercarias de Fasciola hepatica compromete la salud de los ovinos (70). Debido a esto García (26) al estudiar la fasciolosis experimental producto de la inoculación de 250 metacercarias, no encontró variaciones importantes entre el peso corporal de los ovinos con tratamientos de ACF y los ovinos del grupo control de infección.

Por su parte Santiago (63) al administrar 100 metacercarias de Fasciola hepatica en el conejo, no comprometió la salud del animal. En el presente estudio las dosis empleadas (40 y 80 metacercarias) y las fasciolas recuperadas postsacrificio no constituyeron una cantidad que pusiera en peligro la salud de los animales; así lo demuestra el análisis estadístico en el cual no se encontraron diferencias entre los grupos control de infección y los grupos tratados; sin embargo, llama la atención que se encuentre alterada la correlación positiva entre el peso de los conejos al inicio del experimento y el peso al final del mismo. El grupo control no infectado en el último ensayo y los grupos control de infección en los dos últimos ensayos mantienen una correlación positiva ($p < 0.05$) entre el peso inicial del conejo y el peso final del mismo. De todos los tratamientos solo los tratamientos con 0.07 mg de GLX y con 0.5 ml de ACF, conservaron esta correlación. Prácticamente todos los tratamientos en donde participa el GLX, con excepción de la menor dosis, se pierde la correlación de peso. Esta alteración de la normalidad del desarrollo del conejo sugiere un efecto protector parcial de los tratamientos en que se utilizaron ya sea 0.07 mg de GLX ó 0.5 ml de ACF.

D) PESO DEL HIGADO

García (26) al evaluar el ACF en la fasciolosis ovina, no observó diferencias entre los pesos promedio del hígado de los diferentes tratamientos y el grupo control de infección; asimismo

notificó la correlación positiva ($P < 0.05$) entre el peso del hígado y el número de fasciolas ($r = 0.61$). En el presente estudio tampoco se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre los pesos promedios del hígado. En forma análoga se observó correlación positiva ($P < 0.05$) entre el peso del hígado y el número de fasciolas recuperadas postsacrificio ($r: 0.78 - 0.99$) cuya magnitud fue mayor a la notificada por García (26). Sin embargo, solo se observó en los tratamientos en que se usaron 1 mg de GLX solo o emulsionado con ACF, así como en el grupo control de infección del primer ensayo; la correlación no se observó ($P > 0.05$) en los tratamientos con ACF solo, así como a menores y mayores dosis de GLX y en dos de los grupos control de infección. De ésta manera, en los tratamientos con 1 mg de GLX la variación en el peso de los hígados es explicado en proporción importante por el número de parásitos ($r : 0.6 - 0.98$). Si partimos del hecho de que a dosis bajas de infección (< 100 metacercarias) el hígado normal de un conejo soporta una infección por *E. hepatica* sin necesidad de presentar una hiperplasia, como lo demuestra la ausencia de correlación entre el peso del hígado y el número de fasciolas en los grupos control de infección; entonces la correlación observada entre estos parámetros a 1 mg de GLX sugiere que, en estos tratamientos, el hígado puede hallarse alterado funcionalmente y por lo tanto requiere incrementar su peso para normalizarse.

E) ANTICUERPOS IgG

La cinética de detección de anticuerpos IgG circulantes en el presente estudio siguió un patrón similar al notificado por otros autores (26, 41, 50, 63). Las diferencias principalmente radican en el tiempo en que se manifiesta la seropositividad de los sueros, el intervalo de incremento y el intervalo de estabilidad de esta positividad; en gran parte, las diferencias se explican por el método y los antígenos empleados.

En el presente estudio en los tres ensayos evaluados prácticamente no se detectaron diferencias ($P > 0.05$) en la detección de anticuerpos circulantes IgG entre los grupos control de infección y los grupos tratados; la única excepción fue la diferencia ($P < 0.05$) observada entre el tratamiento de 0.07 mg de GLX y el grupo control de infección al emplear un extracto somático en el ELISA, así como la diferencia obvia entre el grupo control de infección y el grupo control no infectado ($P < 0.005$) del segundo ensayo en ambos antígenos empleados. Las principales modificaciones en la cinética de detección de anticuerpos en el presente estudio giraron en torno al inicio de la seropositividad. De esta manera, en el ensayo exploratorio se observó la anticipación de la detección de anticuerpos circulantes IgG al administrar al conejo ACF, con respecto al grupo control de infección y a los grupos tratados con GLX; sin embargo, esta diferencia no se presentó en el primer ensayo; la respuesta temprana de IgG al administrar ACF

comprueba la estimulación de los adyuvantes a la respuesta inmune. En el segundo ensayo, al modificar la cantidad de GLX, se observó un cambio en el tiempo de detección de seropositividad, a mayor cantidad de GLX, se detecta más temprano la respuesta y a menor cantidad, la respuesta es más tardía en un lapso de dos a siete semanas, dependiendo de la fuente de antígeno empleada en el ELISA. Llama la atención que el único tratamiento diferente al grupo control de infección en la fluctuación de IgG haya sido el tratamiento con menor cantidad de GLX (0.07 mg).

F) GLICOCALIX COMO INMUNOGENO

En el presente estudio, no se observaron diferencias importantes en el curso de la infección de la fasciolosis en conejos, cuando se administraron de 2 mg a 0.07 mg por vía intraperitoneal, con respecto a los controles de infección. Sin embargo, es interesante observar las variaciones en las respuestas obtenidas con respecto al grupo control de infección: en general el número de fasciolas fue mayor en los grupos tratados con cantidades de GLX que oscilaron entre 0.013 mg y 1 mg. En contraste, la cantidad de parásitos fue menor en los grupos con 2 mg y 0.07 mg de GLX. La longitud de las fasciolas en general también fue mayor en los grupos tratados. Las ganancias de peso fueron mayores para los grupos tratados con 1 y 2 mg de GLX, en cambio los grupos tratados con dosis menores a 1 mg, así como el grupo control no infectado, mostraron ganancias de peso menores que el grupo control de infección. El peso del hígado solo mostró ligeras variaciones. La

detección de anticuerpos mostró un patrón similar en el estudio, el cual solo fue diferente en el grupo tratado con 0.07 mg de GLX.

La inmunosupresión ocasionada por la administración del glicocálix ha sido registrada recientemente. Martínez (48) notificó la inmunosupresión total del ratón al administrar una dosis de 150 μ g por vía intraperitoneal 48 horas antes de la inoculación de eritrocitos de borrego; en forma similar, observó una menor respuesta a la inoculación de eritrocitos al obtener menores títulos de anticuerpos en la dosis de 50 μ g con respecto al grupo control. En otros modelos parasitarios, se ha observado que ciertos antígenos del metacestodo de Taenia crassiceps pueden producir, en el cerdo, desde la facilitación en la instalación y crecimiento parasitario, hasta la protección contra el cisticerco de Taenia solium dependiendo al menos de la dosis de la vacuna empleada y probablemente de un grupo de factores más extenso aún no identificado (64). Estas observaciones concuerdan con los hallazgos obtenidos en el presente estudio y los de Martínez (48) en el sentido de que dosis altas de GLX pueden ocasionar una inmunosupresión y dosis bajas del mismo material podrían inducir una respuesta protectora.

5. CONCLUSIONES

En general no se observó una protección satisfactoria al administrar cantidades de glicocálix (GLX) comprendidas entre 0.13 mg y 2 mg; de esta manera, no hubo un efecto del GLX en el número y longitud de fasciolas recuperadas después de infecciones de 15 a 20 semanas y tampoco se observó efecto del GLX en la ganancia de peso del conejo. Se apreció una correlación positiva entre el peso inicial y el peso final de los animales en el tratamiento con 0.07 mg, en los tratamientos con ACF y en los grupos control de infección. No hubo efecto del GLX en el peso del hígado del conejo, asimismo se observó una correlación positiva entre el número de fasciolas y el peso del hígado en todos los tratamientos con 1 mg de GLX. Finalmente, se observó efecto del GLX a 0.07 mg en la cinética de anticuerpos. El presente estudio sugiere que el administrar cantidades comprendidas entre 0.13 y 1 mg de GLX por vía intraperitoneal, en el conejo, da por resultado una inmunosupresión parcial y, la valoración del GLX a dosis menores de 0.07 mg, podría reportar beneficios contra la infección del trematodo; por lo cual, sería apropiado llevar a cabo estudios en donde se analice con mayor precisión la estructura química de este material, así como los efectos biológicos de sus fracciones en animales de laboratorio.

1. Agricultural Development and Advisory Service: Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Second Edition. Technical Bulletin no. 18. London (1977).
2. Alvarez Ch., R; García R., J.J.; de la Cruz O., M.C.; Wong Ch., M.; Cabrera B., M.; Gómez G., J.V. y Gámez A., V.: Fasciolosis en los niños. Estudio de 10 casos. Bol. Med. Hosp. Infant. de Méx. 49 (6): 365-371 (1992).
3. Armour, J. and Dargie, J.D.: Immunity to Fasciola hepatica in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. Ex. Parasitol., 35: 381 (1974).
4. Balawy, S.S.: Studies on immune mechanism of Fasciola gigantica infection in rabbits. Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr., 23: 99 (1975).
5. Bautista G., C.R.: Respuesta Inmune. Inmunización Artificial. En: Fasciolosis, Flores C., R.; Quiroz R., H. e Ibarra V., F. (editores): 197-234, México (1986).
6. Bautista G., C.R.: Inmunología de la fasciolosis. En: Inmunología Veterinaria, Morilla G., A., Diana, México, D.F.: 242-260 (1989).
7. Bautista G., C.R. y García O., M.A.: Fasciolosis en Rumiantes. Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria, Inst. Nal. de Invest. Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agr. y Recursos Hidráulicos. Folleto Divulgativo núm. 1, julio. Hidráulicos. Jiutepec, Morelos (1993).
8. Bautista G., C.R.; Gómez A., A.; Morilla G., A.; Vera M., Y. e Ibarra V., F.: Inducción de resistencia inespecífica contra la infección por Fasciola hepatica en ovinos con adyuvante completo de Freund. Revista Mexicana de Parasitología 3(1): 22-24 (1992).
9. Bitakaramire, P. K.: Preliminary studies on the immunization of cattle against fasciolosis using gamma-irradiated metacercarias of Fasciola gigantica. Isotopes and Radiation in parasitology III. International Atomic Energy Agency, Vienna, 23 (1973).
10. Campbell, N. J.; Kelly, J.D.; Townsed, R.B. and Dineen, J.K.: The stimulation of resistance in sheep to Fasciola hepatica by infection with Cysticercus tenuicollis. Int. J. Parasitol. 7: 347 (1977).

11. Castellanos H., A.A.; Escutia S., I. y Quiroz R., H.: Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas Tipo Inspección Federal en México de los años 1979-1987. Veterinaria México XXIII (4): 339-342 (1992).
12. Corba, J.; Armour J.; Roberts G., R.J. and Urquhart, M.: Transfer of immunity to Fasciola hepatica infection. Res. Vet. Sci., 12: 292 (1971).
13. Cheng, T.C.: Parasitología General. Editorial A.C., España (1981).
14. Christensen, N.O.; Nansen, P.; Frandsen, F.; Bjerneboe, A. and Monrad, J.: Schistosoma mansoni: cross resistance in mice. Ex. Parasitol., 46: 113 (1978).
15. Dalton J. P. and Loice P.: Characterization of surface glycoproteins and proteins of different developmental stages of Fasciola hepatica by surface radiolabeling. Journal of Parasitology, 73 (6): 1281-1284 (1987).
16. Dalton J. P.; Tom T. D. and Strand M.: Fasciola hepatica: comparison of immature and mature immunoreactive glycoproteins. Parasite Immunology, 7(6): 643-657 (1985).
17. Daniel, W. W.: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa, 3ª edición. México (1987).
18. Delegación Mexicana: Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bulletin Office International des Epizooties, 93 (5-6): 903-915 (1981).
19. Dineen, J.K.; Kelly, J.D. and Campbell N.J.: Further observations on the nature and characteristics of cross protection against Fasciola hepatica produced in sheep by infection with Cysticercus tenuicollis. Int. J. Parasitol. 8: 173 (1973).
20. Doy, T. G. and Hughes, D. L. : Fasciola hepatica: site of resistance to reinfection in cattle. Experimental Parasitology, 57 (3): 274-278 (1984).
21. Doy, T.G.; Hughes, D.L. and Harness E.: The heterologous protection of rats against a challenge with Fasciola hepatica by prior infection with the nematode Nippostrongylus brasiliensis. Parasitol. Immunol., 3: 171 (1981).
22. Dunne, D. W.: Schistosome Carbohydrates. Parasitology Today, 6 (2): 45-48 (1990).

23. Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J. Immunol. 109: 129-135 (1972).
24. Eriksen, L. and Flagstad T.: Fasciola hepatica: influence of extrahepatic adult flukes on infections and immunity in rats. Ex. Parasitol., 35: 411 (1974)
25. Espinoza, B.; Flisser, A. and Plancarte, A.: Immunodiagnosis of human cysticercosis: ELISA and Immuno-electrophoresis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F.. Academic Press. New York: 163-170 (1982).
26. García C., L.: Efecto del adyuvante completo de Freund sobre la infección experimental con F. hepatica en ovinos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (1992).
27. García O., M.A.: Helmintos más comunes en rumiantes. Cestodos, Fasciola y Nematodos del Tracto Respiratorio. Principios de Helmintología Veterinaria. Rumiante y Cerdos. Editor García O., M.A. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos: 51-57. Morelia, Michoacán (1992).
28. García O., M.A.; Delarue H., A.; Herrera R., D.; Vásquez P., C. y Rosales O., C.: Fasciolosis bovina en los Municipios de Morelia y Tarímbaro, Michoacán. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C., VI Reunión Anual: 44, Morelia, Michoacán (1985).
29. Harness, E.; Hughes, D. L. and Doy T. G.: The demonstration of pre-hepatic immune response to Fasciola hepatica in the mouse. Int. J. Parasitol., 6: 15 (1976).
30. Hanna R. E.; Anderson A. and Trudgett A. G.: Fasciola hepatica studies on vaccination of rats and mice with a surface antigen prepared from fluke homogenate by means of monoclonal antibody. Research Veterinary Sciences, 44 (2): 237-241 (1988).
31. Haroun, E. M.; Hammond, J. A. and Sewell, M. M. H.: Resistance to Fasciola hepatica in rats and rabbits following sensitising infection and treatment. Res. Vet. Sci., 28: 377 (1980 a).
32. Haroun, E. M.; Hammond, J. A. and Sewell, M. M. H.: Resistance to Fasciola hepatica in rats and rabbits following implantation of adult flukes contained in diffusion chambers. Res. Vet. Sci., 29: 310 (1980 b).

33. Nayer, F.D.; Bailey J. and Mitrovic M.: Immunity in rats to superinfection with Fasciola hepatica. J. Parasitol., 58: 1103-1105 (1972).
34. Hillyer, G. V.; García R.; Alicea, H. and Hernández, A.: Successful vaccination against murine Schistosoma mansoni infection with a purified 12 kd Fasciola hepatica cross reactive antigen. Am. J. Trop. Med. and Hyg., 38 (1): 103-110 (1988).
35. Hillyer G. V.; Haroun E. T.; Hernández A. and de-Galanes M. S.: Acquired resistance to Fasciola hepatica in cattle using a purified adult worm antigen. American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 37 (2): 363-369 (1987).
36. Hillyer G. V. and Serrano A. E.: Fractionation of Fasciola hepatica tegument antigens and their application to the serodiagnosis of experimental fascioliasis by the enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Helminthology, 60 (3): 173-178 (1986).
37. Hughes, D.L.: Trematodes, excluding schistosomes with special emphasis on Fasciola. Current Topics in Microbiology and Immunology, 120: 241-260 (1985).
38. Ito, S.: Structure and function of the glycocalix. Fed. Proc. 28: 12-25 (1969). cit. por Toledo R., E. L.: Aislamiento, purificación y caracterización del glicocálix de Fasciola hepatica. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (1985).
39. Jubb, K.U.F.; Kennedy, P.C. and Palmer N.: Pathology of Domestic Animals, vol. 2, 3ª ed., Academic Press. U.S.A. (1985).
40. Kendall, S.B.; Hebert, N.; Parfitt, J.W. and Peirce, M.A.: Resistance to reinfection with Fasciola hepatica in rabbits. Experimental Parasitology, 20 (2): 242-247 (1967).
41. Kendall, S.B. and Sinclair, I.J.: Barriers to reinfection with Fasciola hepatica in the rabbit. Res. Vet. Sci., 12 (74): 74-79 (1971).
42. Ko A. I. and Harn D. A.: Characterization of protective and non-protective surface membrane carbohydrate epitopes of Schistosoma mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82 Suppl. 4: 115-119 (1987).
43. Lang, B.Z.: Host-parasite relationships of Fasciola hepatica in the mouse. VII. Effects of anti-worm incubate sera on transferred worms and successful vaccination with a crude incubate antigen. J. Parasitol., 62: 232 (1976).

44. Levine, N.D.: Tratado de Parasitología Veterinaria. Acribia, España (1983).
45. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall R. J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275 (1951).
46. Mac Gregor, A. N. and Kusel, J. R.: Isolation and characterization of a surface membrane glycoprotein from adult Schistosoma mansoni. Molecular Biochemistry Parasitology, 34 (3): 237-244 (1989).
47. Marchesi, V.T. and Andrews, E.P.: Glycoproteins: Isolation from cell membrane with lithium diisosalicylate. Science 174: 1247 (1971).
48. Martínez C., M.A.: Comparación de los efectos biológicos de los productos de parásitos con los de algunas lectinas vegetales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (1991).
49. Milian S., F.: Pronóstico Médico y Económico. En: Fasciolosis, Flores C., R.; Quiroz R., H. e Ibarra V., F. (editores): 310-334, México (1986).
50. Miranda M., E.: Caracterización inmunoquímica de antígenos de Fasciola hepatica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (1988).
51. Mitchell, G.B.B.; Armour, J.; Ross, J.G. and Halliday, W.G.: Successful transfer of resistance to Fasciola hepatica infection in rats by immune serum and transfer factor. Res. Vet. Sci., 30: 246 (1981).
52. Monrad, J.; Christensen, N. O.; Nansen, P. and Frandsen, F.: Resistance to Fasciola hepatica in sheep harbouring primary Schistosoma bovis infections. J. Helminthol., 55: 261 (1981).
53. Morilla G., A. y Bautista G., R.: Manual de Inmunología. Diana, México, D.F.: 37 -46 (1986).
54. Muro A.; Rodríguez M., J.R. and Hillyer G.V.: Sequence analysis of Fasciola hepatica glutathione S-transferase cDNA clone. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48(3): 457-463 (1993).
55. Nansen, P.: Resistance in cattle to Fasciola hepatica induced by ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. Res. Vet. Sci., 19: 278 (1975).

56. Ouellet A. L. P.; Smithers S. R.; Blackie Q.; Phillips S. M.; Harn D. and Simpson A. J.: Analysis of the anti-Schistosoma mansoni surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. Journal of Immunology, 140 (1): 258-264 (1988).

57. Playfair, J. H. L.: Effective and ineffective immune responses to parasites. Evidence from experimental models. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 80: 37 (1978).

58. Quiroz R., H.: Epidemiología. En: Fasciolosis, Flores C., R.; Quiroz R., H. e Ibarra V., E. (editores): 335-403, México, D.F. (1986).

59. Quiroz R., H.: Epidemiología, control y prevención de la fasciolosis en rumiantes. Principios de Helmintología Veterinaria. Rumiantes y Cerdos. Editor García O., M.A. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos: 79-88. Morelia, Michoacán (1992).

60. Reddington J. J.; Leid R. W. and Wescott R. B.: A review of the antigens of Fasciola hepatica. Veterinary Parasitology, 14 (3-4): 209-229 (1984).

61. Roberts S. M.; Boot C. and Wilson R. A.: Antibody responses of rodents to a tegument membrane preparation from adult Schistosoma mansoni. Parasitology, 97: 425-435 (1988).

62. Rodríguez O., M.; Gómez G., V.; Rojas G., J.; Ramajo M., V.; Manga G., M.Y. and González L., C.: Resistance to Schistosoma bovis in sheep induced by an experimental Fasciola hepatica infection. J. Parasitol 79 (2): 223-225 (1993).

63. Santiago V, C.: Análisis inmunológico de Fasciola hepatica obtenida de tres diferentes hospederos definitivos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (1993).

64. Sciutto, E.; Aluja, A.; Fragoso, G.; Rodarte, L.; Hernández M.; Padilla, A.; Kleibach, N; Baca, M.; Govezensky, T.; Villalobos, N.; Níaz N. y Larralde, C.: Vacunación de cerdos contra la cisticercosis porcina empleando antígenos de Taenia crassiceps. X Congreso Nacional de Inmunología Guerrero, Méx.: 42 (1993).

65. Simpson A. J.; Payares G.; Walker T.; Knigh M. and Smithers S. R.: The modulation of expression of polypeptide surface antigens on developing schistosomula of Schistosoma mansoni. Journal of Immunology, 133 (5): 2725-2730 (1984).

66. Sinclair, K.B.: Resistance to Fasciola hepatica in sheep. Attempts to transfer resistance with lymph node and spleen homogenates. Br. Vet. J., 127: 408 (1971)
67. Sirag, S.B.; Christensen, N. O.; Nansen, P.; Monrad, J. and Frandsen, F.: Resistance to Fasciola hepatica in calves harbouring primary patent Schistosoma bovis infections. J. Helminthol., 55: 63 (1981).
68. Smithers S. R.; Hackett F.; Omer A. P. and Simpson A. J.: Protective immunization of mice against Schistosoma mansoni with purified adult worm surface membranes. Parasite Immunology, 11 (4): 301-318 (1989).
69. Solorio R., J.L.: Patogénesis de las helmintiasis de rumiantes y cerdos. Principios de Helmintología Veterinaria. Rumiantes y Cerdos. Editor García O., M.A. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos: 133-138. Morelia, Michoacán (1992).
70. Soulsby, E.J.L.: Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Interamericana, 7ª edición (1987).
71. Tahir, El; Haroun, M., and Hillyer, G.V.: Resistance to fasciolosis - A review. Veterinary Parasitology, 20: 63-93 (1986).
72. Tizard I.: Inmunología Veterinaria. Interamericana, 2ª edición, México (1984).
73. Ulloa S.,E.; Moreno P.,J.L.; Escobedo C.,R.; García O., M.A.; Espinoza C.,P. y Avila R.,G.: Estudio retrospectivo de la fasciolosis (Fasciola hepatica) en el rastro de Morelia, Michoacán. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, SARH, U.N.A.M., C.P., U.A.CH.: 321, noviembre (1992).
74. Voller, A.; Bidwell, D. E. and Bartlett, A.: Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organization, 53: 55-66 (1976).
75. Wedrychowics H.; Turner K.; Pfister K.; Holmes P. H. and Armour J.: Local antibody responses in the bile and feces of sheep infected with Fasciola hepatica. Research Veterinary Science, 37 (1): 44-51 (1984).