



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**“Efecto del glicocalix de Fasciola hepatica sobre la  
producción de anticuerpos anti-antígeno “H” de  
Salmonella tiphy en ratones de la cepa CDI.”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A N :  
**MARIA DEL CARMEN REYES AGUILAR**  
**MELITON LARA ROCHA**

ASESOR: MVZ. MC. FERNANDO ALBA HURTADO

COASESOR: OBP. ROSA MARIA SANCHEZ MANZANO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Efecto del glicocalix de Fasciola hepatica sobre la producción de anticuerpos anti-antígeno de Salmonella tiphys en ratones de la cepa CD-1"

que presenta el pasante: Melitón Lara Rocha  
con número de cuenta: 8758836-3 para obtener el TITULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con:  
María del Carmen Reyes Aguilar

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Agosto de 1994

PRESIDENTE MVZ. Juan Pablo Martínez Labat

VOCAL MVZ. José Antonio Licea Vega

SECRETARIO M.C. Fernando Alba Hurtado

PRIMER SUPLENTE MVZ. Marco Antonio Mandoza Saavedra

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez

*Juan Pablo Martínez Labat*  
*José Antonio Licea*  
*Fernando Alba Hurtado*  
*Marco Antonio Mandoza Saavedra*  
*Raúl Radillo Rodríguez*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
"Efecto del glicocalix de Fasciola hepatica sobre la producción de anticuerpos anti-antígeno de Salmonella tiphy en ratones de la cepa CD-1"

que presenta la pasante: María del Carmen Reyes Aguilar  
con número de cuentas: 8536210-7 para obtener el TITULO de:  
Médica Veterinaria Zootecnista ; en colaboración con :  
Melitón Lara Rocha

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Agosto de 1994

PRESIDENTE MVZ. Juan Pablo Martínez Labat

*Juan Pablo Martínez Labat*

VOCAL MVZ. José Antonio Licea Vega

*José Antonio Licea Vega*

SECRETARIO M.C. Fernando Alba Hurtado

*Fernando Alba Hurtado*

PRIMER SUPLENTE MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra

*Marco Antonio Mendoza Saavedra*

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez

*Raúl Radillo Rodríguez*

**A DIOS POR BRINDARME LO MAS PRECIADO....  
LA VIDA.**

CON MUCHO RESPETO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO QUIEN ME DIO LA OPORTUNIDAD  
DE SUPERARME PROFESIONALMENTE.

A MIS PADRES AIDA AGUILAR Y MANUEL REYES  
DEDICO ESTE TRABAJO FRUTO DE SACRIFICIOS A LO  
LARGO DE TANTOS AÑOS MUESTRA DE MI CARÍÑO Y  
DE QUE SUS ESFUERZOS, PARA LLEGAR A ESTE PUNTO  
DE MI VIDA, NO HA SIDO EN VANO.

A USTEDES MIL GRACIAS.

A MI HERMANA AIDA Y MI  
SOBRINO JESUS MANUEL QUIEN  
DESEO QUE SE SUPERE CADA DIA.

**UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL AL  
LIC. MANUEL OLVERA MAZARIEGOS POR  
HABERME DADO LA OPORTUNIDAD DE DAR  
MI PRIMER PASO COMO PROFESIONISTA.**

**A MELITON POR BRINDARME SU COLABORACION Y APOYO  
EN LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO Y POR LO QUE  
SIGNIFICA PARA MI.**

AGRADEZCO EL GRAN IMPULSO Y COLABORACION PARA LA  
REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.  
M.V.Z. LEON ALBARRAN RIVES  
M.V.Z. OSCAR SANCHEZ RAMIREZ  
M.V.Z. JUVENTINO SALDIVAR MONTALVO  
P.M.A.C. GUADALUPE MEJIA RIOS  
SRITA. ELIZABETH GALINDO CABRERA

A MIS ASESORES Q.B.P. ROSA MARIA SANCHEZ  
MANZANO Y M.V.Z. FERNANDO ALBA HURTADO  
POR LA PACIENCIA Y APOYO INCONDICIONAL PARA  
LA TERMINACION DE ESTA PARTE DE MI VIDA QUE  
ES TAN IMPORTANTE Y AL PROFESOR JUAN  
RAMON BAUTISTA DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS Y  
EN ESPECIAL A MAGDA GARCIA  
TRINIDAD Y LUZ MA. VARGAS  
GARCIA QUE ME BRINDARON SU  
APOYO Y AMISTAD.

**A MIS PADRES Y A DIOS POR EL SAGRADO DON  
DE LA VIDA Y POR HABERME DIRIGIDO A DONDE  
HE LLEGADO CON SU EDUCACION Y CONSEJOS.**

**A TODOS MIS HERMANOS POR SU  
APOYO E INTERES EN MI FORMACION  
PROFESIONAL A LO LARGO DE TODA  
MI VIDA.**

UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL A  
MI COMPAÑERA Y AMIGA MARIA DEL  
CARMEN REYES IMPULSO CONSTANTE E  
INCESANTE DE SUPERACION DURANTE  
TODA LA CARRERA Y PARA LA  
REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO E INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL Y A  
TODA SU DOCENCIA TODA MI GRATITUD Y EN  
ESPECIAL A LOS PROFESORES FERNANDO ALBA  
HURTADO, ROSA MARIA SANCHEZ MANZANO Y  
JUAN RAMON BAUTISTA.

EN EL PORVENIR ESPERA UN  
CONOCIMIENTO INMENSO Y EL  
TERMINAR LA CARRERA ES APENAS EL  
COMIENZO.....

## **INDICE**

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>Material</b>	<b>14</b>
<b>Métodos</b>	<b>17</b>
<b>Resultados</b>	<b>26</b>
<b>Discusión</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar el posible efecto inmunodepresor del glicocalix de Fasciola hepatica (G f h) sobre la producción de anticuerpos a un antígeno bacteriano, en comparación a aquel provocado por concanavalina A (ConA).

Se utilizaron 30 ratones hembras de 55 a 65 días de edad de la cepa singénica CD1. Los animales fueron divididos en 5 grupos de 6 animales cada uno e inoculados intraperitonealmente de la siguiente manera: El grupo I.- 0.1 ml. de solución salina fisiológica el 1er día del experimento. Grupo II.- 150 µg. de ConA el 1er. día del experimento. Grupo III.- 50 µg de Gfh dos días antes del experimento y 50µg el día uno. Grupo IV.- 50 µg de Gfh el primer día del experimento. Grupo V.- 150µg de Gfh el primer día del experimento. En todos los animales el día 3 del experimento se aplicó intraperitonealmente 0.2 ml. de un antígeno flagelar de Salmonella tiphy (antígeno "H"), los días 1, 4 y 8 se obtuvo sangre para realizar frotis y se hizo un conteo diferencial de leucocitos. El día 8 se obtuvo sangre por punción intracardiaca, se separó el suero y a este se le determinó el título de anticuerpos anti-antígeno "H" de Salmonella tiphy por una prueba de aglutinación.

En el grupo I los títulos de anticuerpos son estadísticamente mayores que en los otros cuatro grupos ( $P < 0.01$ ). Se presentaron ligeras alteraciones en el porcentaje de monocitos, linfocitos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos durante los tres muestreos.

Los resultados demuestran que tanto la ConA como Gfn provocaron inmunodepresión. Se propone que esta inmunodepresión puede ser utilizada por el parásito como un mecanismo de inmunoevasión.

## INTRODUCCION

La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a un gran número de especies animales, que actúan como hospedadores definitivos de Fasciola hepatica. Las especies económicamente importantes que son afectados por éste parásito son: los bovinos, ovinos y caprinos. Accidentalmente el hombre puede verse afectado cuando se alimenta de berros (Borchert, 1981; Nájera, 1986; Quiroz, 1984).

La fasciolosis es conocida por varios nombres en las diferentes regiones del país, entre otros se le conoce como distomatosis hepática, mal de botella y acuyachi y el parásito es llamado comunmente orejuela, sanguijuela, conchuela, palomilla, duela del hígado. Estos nombres describen la forma física del parásito o signos observados en el animal afectado (Borchert, 1981; Quiroz, 1984).

El cuerpo de Fasciola hepatica tiene la forma parecida a una hoja con el extremo anterior formando una prominencia cónica, detrás de la cual se ensancha, mide en la forma adulta aproximadamente 30mm de largo y 13mm de ancho, presenta dos ventosas: la oral localizada en la punta de la prominencia cónica y la ventral un poco por detrás y en la parte inferior del parásito. El tegumento está provisto de pequeñas y agudas espinas córneas en toda la superficie (Alba, 1994; Quiroz, 1984).

El ciclo de vida de Fasciola hepatica es de tipo indirecto ya que para su transmisión requiere de un hospedador intermediario que es el caracol del género Limnaea (Lapage, 1971; Bautista, 1986; Quiroz, 1984; Martínez, 1979; Soulsby, 1987).

El parásito adulto se localiza en los conductos biliares y produce alrededor de 100,000 huevos por día, el huevo madura en el agua y libera un estadio inicial llamado miracidio el cual es una larva ciliada de forma ovalada, más ancha en su parte anterior en donde presenta una papila, mide aproximadamente 130 micrómetros. Al salir del huevo nada activamente con fototropismo positivo y por quimiotaxis se dirige hacia los caracoles del género Limnaea. En México se han reportado las siguientes especies: Limnaea bullimoides, Limnaea cubensis, Limnaea humilis, aunque se sospecha de la intervención de otras especies (Bautista, 1986; Quiroz, 1984).

Al contacto con el molusco, el miracidio se adhiere a su superficie y retrae su papila anterior segregando una enzima muy eficaz que reblandece los tejidos del caracol, abriendo un orificio através del cual penetra el miracidio alojándose en su hepatopáncreas. Dentro del caracol el miracidio se transforma en esporoquiste, que da lugar a numerosas redias, si las condiciones del medio ambiente son favorables (suficiente humedad), se produce una segunda generación de redias, pero en ambos casos, con o sin una nueva generación de redias, surgen aproximadamente 20 cercarias de cada redia, una vez alcanzado su pleno desarrollo, las cercarias salen de las redias por el orificio oral y abandonan el caracol, nadan en el agua por 15 a 60 minutos, hasta alcanzar una superficie lisa, generalmente una planta, ahí pierden su cola y se enquistan transformándose en metacercarias. Las metacercarias no se multiplican mas, pero requieren de 2 a 3 días para madurar y pueden resistir dentro de su quiste por varios meses , soportando muy bien el frío pero poco el calor y la falta de humedad (Martínez, 1979; Quiroz, 1984; Soulsby, 1987).

La metacercaria es la forma infestante para el hospedador definitivo (herbívoros u omnívoro, incluyendo al hombre), este se infesta al ingerir el pasto o vegetales a los cuales están adheridos las metacercarias, que al ser ingeridas

resisten los jugos gástricos, pierden la pared quística por acción de los mismos y penetran la pared intestinal mediante secreciones especiales. Después de una hora, las fasciolas jóvenes ya se encuentran en la cavidad peritoneal y al cabo de 4 a 5 días llegan a la cápsula del hígado (Martínez, 1979; Quiroz, 1984; Soulsby, 1987).

Los parásitos atraviesan la cápsula hepática, éste estadio es conocido como fase juvenil, la cual es histófaga, se alimenta de tejido hepático, lo destruye. Crecen varias veces, desde el momento en que llegaron a la pared intestinal, hasta las ocho semanas que alcanzan la luz de los conductos biliares, con un incremento de 200 micrómetros a 7 milímetros de longitud (Borchert, 1981; Martínez, 1979).

En los conductos biliares la maduración se completa en cuatro semanas y comienza la ovoposición. La duración del ciclo de vida es variable, se requieren más o menos tres meses desde la expulsión del huevo hasta la formación de cercarias y las fasciolas adultas aparecen tres meses después de la ingestión de metacercarias. La duración promedio del ciclo de vida es por consiguiente de seis meses (Quiroz, 1984; Georgi, 1980; Flores, 1986)

En México la enfermedad ha sido reportada en algunos estados de la República como son: Chiapas, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco y Veracruz (Quiroz, 1984; Flores, 1986). La fasciolosis se presenta de forma aguda y crónica. La forma aguda se produce con más frecuencia en animales jóvenes, aunque también se han observado casos en ganado adulto con curso mortal. Esta forma comunmente se presenta después de la ingestión de gran cantidad de metacercarias y es debida a la invasión súbita del hígado por gran cantidad de fasciolas jóvenes, éstas pueden destruir suficiente parénquima para causar

insuficiencia hepática, a la cual pueden añadirse los efectos de la hemorragia en la cavidad peritoneal (Quiroz, 1984; Soulsby, 1987).

La fasciolosis aguda se presenta principalmente en ovinos, a menudo es un síndrome que produce la muerte sin presentar otras anomalías clínicas manifiestas. Suele ocurrir en verano y otoño, pero el momento de su aparición depende también de la liberación de cercarias en una zona determinada y de la cantidad de las mismas que llegue hasta el ovino, si se observa clínicamente la enfermedad en ovinos se caracteriza por embotamiento, debilidad, anorexia, palidez, edema de mucosas y dolor cuando se ejerce presión sobre el hipocondrio derecho (Quiroz, 1984; Flores, 1986, Pérez, 1987).

La evolución de la fasciolosis subaguda es más lenta, debido en parte a una infestación menor y a una mayor resistencia ligada a edad, reinfestación y estado nutricional. En este caso la anemia está presente, hay caquexia y presenta edema en las porciones bajas, edema submandibular. La muerte puede ocurrir entre 10 y 18 semanas; en caso contrario no ocurre y la enfermedad tiende a la cronicidad (Quiroz, 1984).

La forma crónica se debe a la presencia de formas adultas en conductos biliares, se caracteriza por hipoproteinemia variable, edema submandibular, ictericia y baja en la producción (Quiroz, 1984). En algunas ocasiones estos signos pueden ser enmascarados por una mayor ingestión de alimento (Martínez, 1993).

El período de latencia de la fasciolosis es corto cuando la cantidad de metacercarias ingeridas es pequeña, ya que cuando son más abundantes la fibrosis hepática y la lesión subsiguiente retardan la migración. La cantidad de metacercarias ingeridas en cualquier momento quizá no sea el único factor que determine si ocurrirá fasciolosis aguda o crónica. La exposición previa a la

infección reduce al parecer las poblaciones de cercarias e inhibe la migración (Bautista, 1986).

El método tradicional para el diagnóstico coproparasitológico de fasciolosis es la prueba de sedimentación el cual consiste en muestrear un 10% de la población y observar al microscopio estereoscópico. Cuando resulta un caso positivo todo el hato se da como tal (Alba, 1994). Se puede utilizar un método diferencial de flotación que permite identificar hasta un 10% más de casos que el método tradicional de sedimentación, en este sistema se utilizan dos reactivos, los cuales son solución saturada de cloruro de sodio y sulfato de zinc con gravedad específica de 1.3 a 1.5 (Nájera, 1981; Quiroz, 1984).

Las pruebas serológicas han sido promisorias, la mejor para diagnóstico sistemático de fasciolosis en bovinos es la de valoración de inmunoabsorbencia ligada a enzimas (ELISA), que es más sensible que el examen de heces e incluso permite detectar anticuerpos en la leche, pudiéndose hacer el diagnóstico de un establo con sólo muestrear el tanque de leche (Nájera, 1981; Sinclair y Wassall, 1988 ).

La prueba de ELISA permite un diagnóstico serológico precoz de fasciolosis, ya que de dos a cuatro semanas después de la infestación detecta anticuerpos de Fasciola hepatica, mientras que la prueba de inmunolectroforesis sólo es positiva de seis a ocho semanas y el examen de huevos en heces es confiable de 6 a 10 semanas después de la infestación (Sinclair y Wassall, 1988).

Aunque se ha comprobado que ELISA puede ser negativo hasta en un 4% de casos coprológicamente positivos, esta técnica ha resultado muy satisfactoria en detectar anticuerpos aún después de que ha cesado la expulsión de huevos en las heces. Este método puede llevarse a cabo tanto para el diagnóstico de fasciolosis aguda como de fasciolosis crónica, aunque puede haber falsos positivos. Este tipo de técnicas u otras como la hemoaglutinación pueden ser

más confiables si se utilizan antígenos específicos en su realización (Levieux y col, 1992).

Está bien establecido que la presencia de la fase juvenil de la Fasciola hepatica engendra una respuesta inmunológica significativa en el hospedador (Martínez, 1979). En borregos, se ha observado que los anticuerpos antifasciola comienzan a detectarse desde las 2-3 semanas post-infección (p.i), alcanzando títulos máximos entre las semanas 6 y 15 p.i., cuando el parásito migra en el parénquima hepático, antes de entrar a los conductos biliares. Los títulos de anticuerpos comienzan a disminuir entre las semanas 12 y 16 p.i. cuando las fasciolas se establecen en los conductos biliares. Los anticuerpos IgG1 tienen predominio sobre los IgG2 e IgM (Sandeman y Howell; 1980, citado por Bautista, 1986).

Aparentemente la producción de anticuerpos tiene una pequeña protección en el hospedador. Al menos durante la infección primaria los parásitos pueden existir por largos periodos en los conductos biliares del hospedador natural. Durante la infección primaria Fasciola hepatica puede evadir la respuesta inmune del hospedador, posiblemente las fasciolas juveniles se esconden en el hígado en donde están en constante movimiento, fuera del alcance del mecanismo celular, mientras que los adultos se resguardan del ataque inmunológico una vez que entran a los conductos biliares. Las ovejas al parecer son incapaces de resistir infestaciones secundarias y subsecuentes por Fasciola hepatica, pero es claro que la infestación en ganado bovino, ratas y ratones puede ser menos severa (Anderson, 1978; Dargie, 1973; Dargie, 1974; Doyle, 1971; Bautista, 1986; Hanna, 1980).

La inhibición de macrófagos por acción de linfocitos demostró que la inmunidad celular inmediata contra Fasciola hepatica empieza a finales del período prepatente (previo a la existencia de huevos en heces), alcanza su

máximo al final de la fase patente y declina durante la fase clínica, ó sea cuando la mayoría de las fasciolas alcanzan los conductos biliares (Pomarski, 1980).

Información reciente sugiere que la destrucción inmune de algunos helmintos, tiene a los eosinófilos como células efectoras en el fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Hanna, 1980; Alvarez, 1989).

El cuerpo de Fasciola hepatica presenta una capa externa periférica y un parénquima central. La capa externa tiene una cubierta extramembranal denominada glicocalix, que significa cáscara dulce, esta incluye principalmente a glicolípidos y glicoproteínas. Esta capa sólo se pone de manifiesto por técnicas histoquímicas o citoquímicas de alta resolución. El glicocalix es considerado como sinónimo de cubierta extracelular y puede ser responsable o contribuyente de las propiedades de adsorción, transporte, características eléctricas, conducta inmunológica y naturaleza adhesiva de las células. Debe señalarse que la estructura y la función del glicocalix puede ser característica de cada especie y más aún, puede variar en la misma célula bajo diferentes condiciones fisiológicas por lo que este componente celular es dinámico y no estático en cuanto a su función, además se requiere de una síntesis continua del mismo, la que se realiza en el aparato de Golgi y se inserta por exocitosis en la membrana (Susumu 1969). El glicocalix de Fasciola hepatica, está constituido de aproximadamente por 28 % de proteínas y 72 % de azúcares, del 100 % de estos el 74.3 % fue glucosa, el 7.9 % fucosa, el 2.3% hexosaminas y 15.5 % de ácido urónico (Alva y col. 1989; Rivera, 1990; Alvarez, 1990). La superficie tegumental del parásito está continuamente expuesta al hospedador, así que es probable que un ataque inmunológico esté dirigido en contra de los componentes de su superficie. Efectivamente altos títulos de anticuerpos específicos para la superficie de las metacercarias de fasciola fueron detectados en vacas infectadas experimentalmente. Así que puede esperarse una respuesta

contra los componentes de su superficie y específicamente el glicocalix (Bautista, 1986).

Se han utilizado ensayos de proliferación linfocitaria para estudiar los sistemas inmunes de los rumiantes. Se ha observado que linfocitos periféricos de fetos, becerros y ganado adulto responden a mitógenos bajo diferentes condiciones experimentales. Distintas subpoblaciones de linfocitos de bovinos y ovinos pueden ser estimulados selectivamente por mitógenos específicos como la concanavalina A. Sin embargo, se ha demostrado que la concanavalina A inoculada in vivo produce una inmunodepresión a la respuesta de anticuerpos (Harwood y col. 1974). Lo anterior probablemente se deba a que induce la multiplicación de muchas clonas de linfocitos y distrae la multiplicación de clonas específicas de linfocitos.

Se han postulado hipótesis en la cuales se menciona que el glicocalix de Fasciola hepatica induce inmunosupresión a antígenos heterólogos timo dependientes; por lo cual este material puede ser utilizado por el parásito para evitar que monte una respuesta inmune contra él (Pomarski, 1980). Por lo anterior en este trabajo, nos propusimos evaluar si el glicocalix de Fasciola hepatica es capaz por si solo de suprimir una respuesta de anticuerpos contra un antígeno bacteriano (antígeno "H" de Salmonella typhi).

## OBJETIVOS

- 1) Evaluar la aplicación de una dosis única de glicocalix de Fasciola hepatica por vía intraperitoneal en ratones de la cepa CD1 sobre la respuesta de anticuerpos a un antígeno flagelar "H" de Salmonella tiphy.
- 2) Evaluar la aplicación de dosis diferidas de glicocalix de Fasciola hepatica por vía intraperitoneal en ratones (cepa CD1), sobre la respuesta a un antígeno flagelar "H" de Salmonella tiphy.
- 3) Determinar el efecto del glicocalix de Fasciola hepatica inoculado por vía intraperitoneal en dosis única o a dosis diferida sobre la composición de leucocitos de sangre periférica (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos) en ratones cepa CD1.
- 4) Comparar el efecto sobre la producción de anticuerpos anti-antígeno flagelar "H" de Salmonella tiphy en ratones inoculados con concanavalina A.

## MATERIAL

### MATERIAL DE LABORATORIO

- Cajas de Petri
- Vasos de precipitado, capacidad 100 ml. y 500 ml.
- Matraz Erlenmeyer, capacidad 125 ml. y 500 ml.
- Tubos de ensayo de capacidad 10 x 75 mm. y de 18 x 25 mm.
- Pipetas Pasteur de cuello largo
- Pipetas para microaglutinación
- Probetas graduadas, capacidad 100 ml.
- Embudos de vidrio
- Agitadores de vidrio
- Portaobjetos
- Gradilla metálica y de madera
- Soporte universal
- Anillo metálico
- Jaulas para ratones
- Jeringas insulínicas
- Tubos de centrifuga
- Rollo de bolsa de colodión para diálisis
- Centrifuga de cabezal fijo Sorvall
- Balanza analítica

- Agitador magnético
- Liofilizadora
- Centrifuga clínica
- Contador para cuenta diferencial de leucocitos

#### EQUIPO PARA LA TECNICA DE AGLUTINACION EN PLACA

- Placa de vidrio cuadrículada
- Aglutinoscopio

#### REACTIVOS

- Antígeno " H" de Salmonella typhi producido en México por Bigaux Diagnóstica.
- Concanavalina A producida en Estados Unidos por laboratorios SIGMA.
- Solución salina isotónica estéril 0.85%
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH = 7.2
- Agua destilada
- (Hidroximetilo) aminometano (tris) 0.005 M
- Diyodo salicilato de litio (L Y S) 0.005 M
- Fenol
- Colorante de Giemsa-Wright
- Glicocalix, se obtuvo modificando una técnica descrita por Marchesi y Andrews 1971.

los títulos de anticuerpos anti-antígeno "H" de Salmonella typhi por una prueba de aglutinación, que a continuación se describe:

1. Antes de iniciar la prueba se retiró el suero y el antígeno del refrigerador y se expusieron a temperatura ambiente durante algunos minutos.
2. Se realizaron diluciones desde 1:2 hasta 1:512.
3. Con la micropipeta se extrajeron 50 microlitros del suero problema del tubo.
4. Manteniendo la pipeta en un ángulo de 45° y la punta de la misma tocando la placa de aglutinación se depositó el contenido en el primer cuadro de la placa y así sucesivamente.
5. Posteriormente se deposita una gota del antígeno sobre cada una de las cantidades del suero.
6. Con el removedor de madera se agitan las mezclas en forma rotatoria.
7. Al cabo de unos minutos se procede a leer las reacciones, utilizando la iluminación indirecta.

Los títulos de anticuerpos se analizaron estadísticamente por la técnica de Kruskal Wallis (Wayne, 1987) y los leucocitos por la técnica de ANOVA (Hurley, 1981).

## OBTENCION DEL GLICOCALIX DE Fasciola hepatica

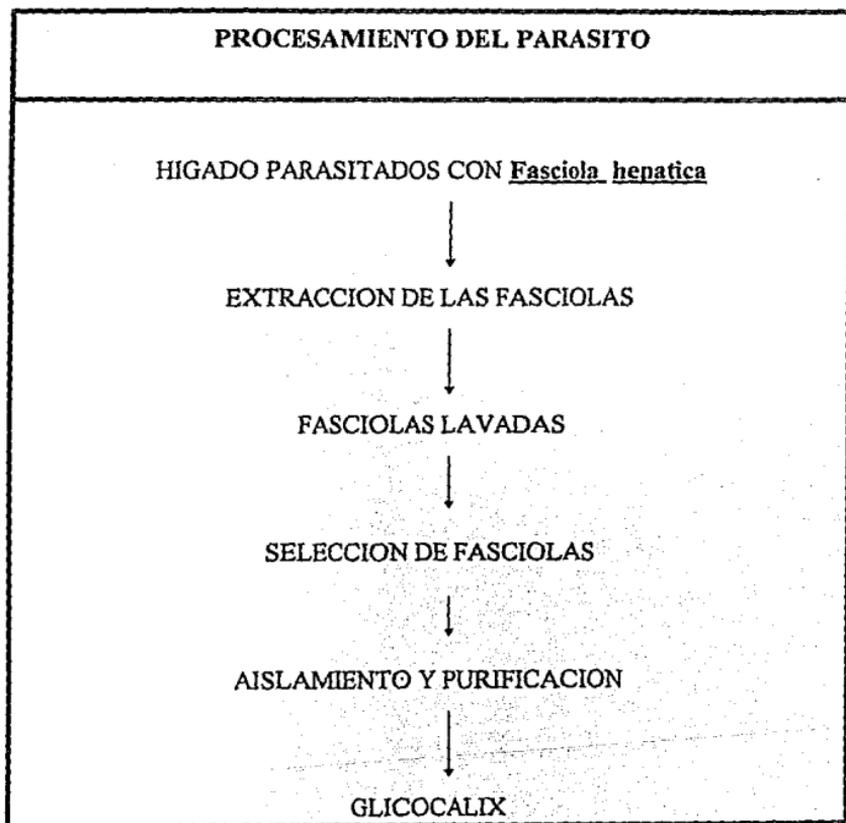
Se utilizó hígados frescos de bovinos parasitados con Fasciola hepatica decomisados en diferentes rastros del área metropolitana.

Las fasciolas fueron obtenidas de los conductos biliares, posteriormente se colocaron en cajas de Petri conteniendo solución salina isotónica estéril al 0.85%, se lavaron por suspensión y decantación de 4 a 5 veces con intercambio de la solución salina, con la finalidad de eliminar restos tisulares.

Una vez lavadas las fasciolas fueron seleccionadas sólo las que estuvieran íntegras estructuralmente y libres de desechos intestinales. Las fasciolas seleccionadas se utilizaron posteriormente para aislar el glicocalix.

En un cuadro anexo se resumen los pasos anteriores.

Cuadro 1



## METODO PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL GLICOCALIX

El glicocalix se obtuvo mediante una técnica descrita por Marchesi y Andrews (1971).

### FUNDAMENTO:

La utilización del diyodosalicilato de litio, que actúa como detergente permite:

La liberación de algunas proteínas membranales, entre ellas las glicoproteínas.

La separación de las glicoproteínas membranales mediante fraccionamiento con solventes (fenol-agua).

La eliminación de fenol y detergente de la fase acuosa por medio de diálisis.

La concentración del glicocalix por liofilización (Alva, 1989).

Las fasciolas completas se llevaron a un 75% del volumen en seco, con una mezcla de amortiguador de Tris 0.005 M y L Y S 0.005 M, ajustando la mezcla a un pH de 7.2.

Se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. con agitación constante.

Se adicionaron dos volúmenes de agua destilada helada y se incubó a 4°C durante 45 min. con agitación constante.

Se separó el sobrenadante por decantación. A éste se le añadió un volumen igual de fenol al 60%, para extraer proteínas.

Se centrifugó a 4000 g durante 60 min. La fase fenólica se desechó, mientras que la fase acuosa fue recolectada para llevar a cabo la eliminación de fenol mediante diálisis.

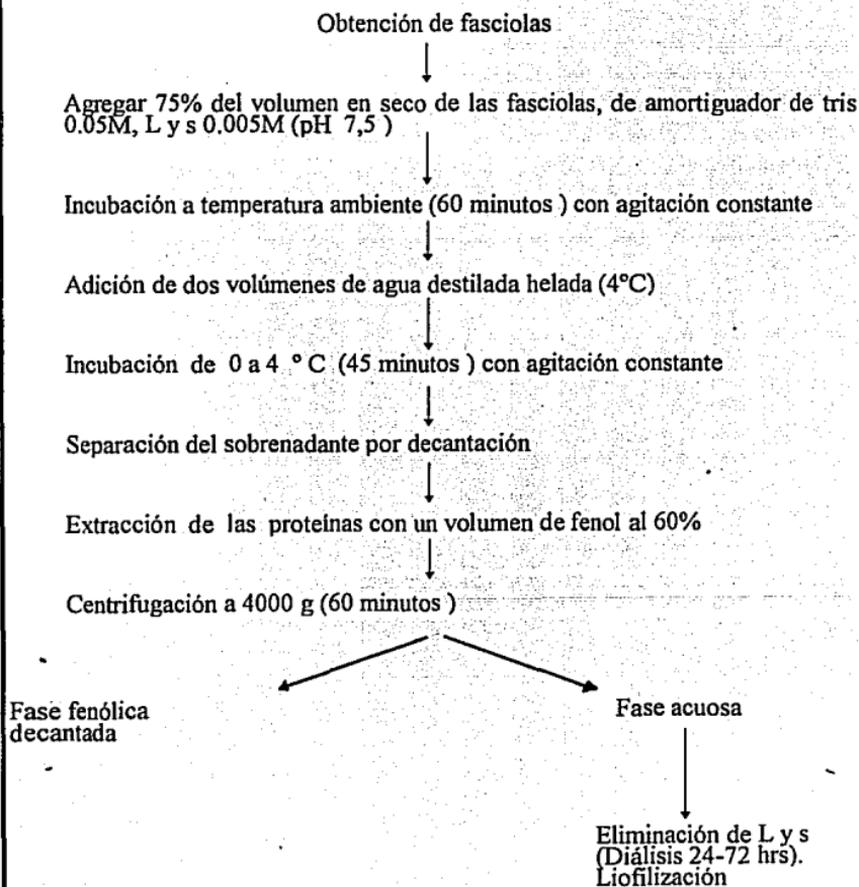
Se dializó contra agua destilada durante 72 horas a 4°C con agitación constante, para eliminar residuos de fenol.

La solución libre de fenol se liofilizó.

Finalmente el liofilizado del glicocalix, se resuspendió en agua destilada estéril y sin ningún otro tratamiento se utilizó para la inmunización en ratones.

En un diagrama anexo se resumen los pasos seguidos.

## AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL GLICOCALIX



## CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

### FUNDAMENTO:

La morfología de los leucocitos es diferente según su función, así encontramos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos.

### REACTIVOS:

Colorante de Wright	9.0 g
Colorante de Giemsa	1.0 g
Glicerina	90 ml.
Metanol	2910.0 ml.

En un mortero se colocaron el colorante de Wright y el colorante de Giemsa, ya disueltos se agregó poco a poco la glicerina y el metanol, triturando con la mano del mortero, hasta agotar la glicerina y casi consumir todo el material. Se vació al frasco ambar el remanente de colorantes no disueltos en el mortero, enjuagandolo con metanol.

Dejar madurar el colorante dos a tres semanas, agitando diariamente.

### Solución Buffer para tinción de Wright-Giemsa

Fosfato Disódico Anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	9.47 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	9.08 g
Agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (añorar a)	100.00 ml.

Se conservó a temperatura ambiente.

## **MATERIAL:**

Tijeras

Alcohol

Microscopio óptico

Puente de coloración

El método utilizado se realizó de la siguiente manera:

Se extrajo la sangre por un corte en la punta de la cola del ratón y se colocó una pequeña gota en el portaobjetos, haciéndose una extensión delgada.

Se secó al aire y se colocó en el puente de coloración.

Se cubrió el extendido con el colorante, dejándolo 5 minutos.

Se agregó buffer, sin tirar el colorante, se soplo sobre la mezcla para homogeneizarla dejandola 7 minutos.

Se eliminó la mezcla agregando agua corriente.

Se dejó secar a temperatura ambiente.

Se observó al microscopio revisandose el extendido y se fueron anotando los diferentes leucocitos, agrupandolos en base a su morfología por separado hasta completar un total de 100 células.

## RESULTADOS

En el cuadro 3 se muestran los títulos de anticuerpos anti-salmonella en los diferentes grupos. En el grupo uno los títulos de anticuerpos son estadísticamente mayores ( $P < 0.01$ ) que en los otros cuatro grupos. Los títulos de anticuerpos son estadísticamente mayores ( $P < 0.01$ ) en el grupo III que los grupos II y IV pero no con el grupo V. Los grupos II, IV y V son estadísticamente iguales ( $P < 0.01$ ).

En el cuadro 4 y figura 1 se muestra el conteo diferencial de leucocitos en ratones del grupo 1 (Solo retados con antígeno "H" de Salmonella tiphy), no se presentaron alteraciones en el porcentaje de monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos durante los tres muestreos. Solo aumentaron en el segundo muestreo (4o. día del experimento) los neutrófilos, pero el tercer muestreo no fue diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) al primero.

No se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ), en el porcentaje de leucocitos entre los 3 muestreos de los animales del grupo II (inoculados con 150  $\mu\text{g}$  de concanavalina A el día 1 y retados con antígeno de "H" de S. Tiphy el día 3 del experimento). Tampoco se presentaron diferencias entre los tres muestreos de los animales del grupo IV (inoculados con 50  $\mu\text{g}$  de glicocalix de F. hepatica el día 1 y retados con antígeno "H" de S. tiphy el día 3 del experimento) para ningún tipo de célula (cuadro 5 y 7, figs. 2 y 4).

En el cuadro 6 y fig.3 se muestran los resultados del conteo diferencial de leucocitos del grupo III (inoculados con 50  $\mu\text{g}$  de glicocalix de F. hepatica los días -2 y el 1 y retados con antígeno "H" de S. Tiphy el día 3 del experimento). No se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre el porcentaje de

monocitos, linfocitos, neutrófilos y basófilos. Se presentó una disminución estadística en el porcentaje de eosinófilos en los muestreos 2 y 3 de este grupo.

El cuadro 8 y fig. 5 muestra los porcentajes de leucocitos de ratones inoculados con 150  $\mu\text{g}$  de glicocalix de E. hepatica el día 1 del experimento y retados con antígeno "H" de S. tiphy (grupo V). El porcentaje de monocitos en el primer muestreo es estadísticamente mayor ( $P < 0.05$ ) que en los muestreos 2 y 3. Los porcentajes del segundo muestreo de basófilos están estadísticamente ( $P < 0.05$ ) aumentados en comparación al muestreo 1 y 3.

Cuadro 3.- Títulos de anticuerpos anti-antígeno flagelar de Salmonella tify en grupos de ratones tratados con diferentes cantidades de concanavalina A y glicocalix de Fasciola hepatica.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
1:512	1:4	1:8	1:4	1:8
1:64	1:4	1:8	1:4	1:8
1:128	1:8	1:32	1:4	1:16
1:256	1:8	1:32	1:8	1:16
1:256	1:4	1:64	1:4	1:32
1:128	1:8	1:16	1:8	1:32

- Grupo I.- Se inocularon intraperitonealmente 0.1 ml. de solución salina fisiológica el primer día del experimento.
- Grupo II.- Se inocularon 150 µg de concanavalina A, el primer día del experimento.
- Grupo III.- Se inocularon 50 µg de glicocalix dos días antes del experimento y 50 µg el día uno.
- Grupo IV.- Se inocularon 50 µg de glicocalix el primer día del experimento.
- Grupo V.- Se inocularon 150 µg de glicocalix el primer día del experimento.

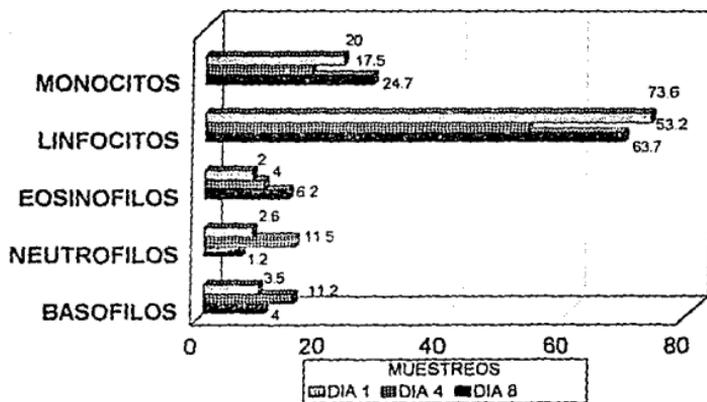
Cuadro 4.- Conteo diferencial de leucocitos de sangre periférica en ratones de la cepa CD1 inoculados una vez con Ag. "H" de Salmonella tiphy por vía intraperitoneal el día uno del experimento.

Grupo I

	Monoc.	Linf.	Eosinof.	Neutrof.	Basof.
Muestreo 1 día 1	20	73.6	2	2.6	3.5
Muestreo 2 día 4	17.5	53.2	4	11.5	11.2
Muestreo 3 día 8	24.7	63.7	6.2	1.2	4

\* Datos expresados en porcentaje y tomada su media aritmética

**FIG. 1.- GRAFICA COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS EVENTOS DEL EXPERIMENTO.**



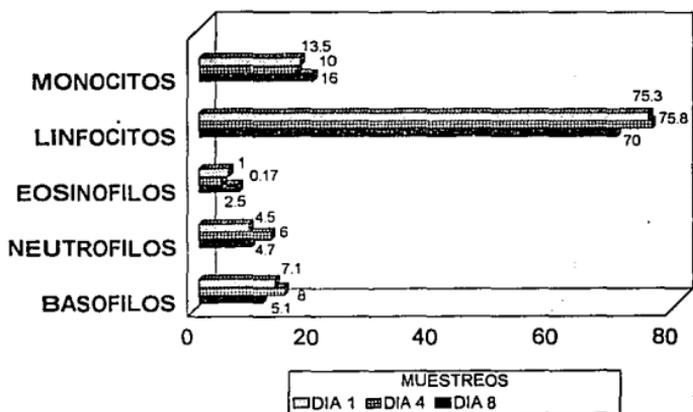
Cuadro 5.- Conteo diferencial de leucocitos de sangre periférica en ratones de la cepa CD1 inoculados una vez con 150 microgramos de concanavalina A por vía intraperitoneal el primer día del experimento.

Grupo II

	Monoc.	Linf.	Eosinof.	Neutrof.	Basof.
Muestreo 1 día 1	13.5	75.3	1	4.5	7.1
Muestreo 2 día 4	10	75.8	0.17	6	8
Muestreo 3 día 8	16	70	2.5	4.7	5.1

\* Datos expresados en porcentaje y tomada su media aritmética

**FIG. 2.- GRAFICA COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS EVENTOS DEL EXPERIMENTO.**



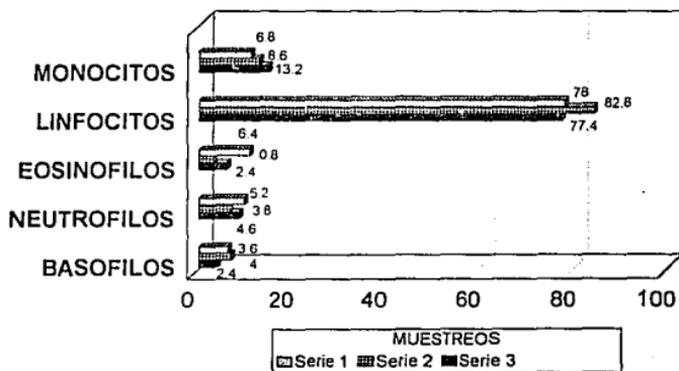
Cuadro 6.-Cuento diferencial de leucocitos de sangre periférica en ratones de la cepa CD1 inoculados con 50 microgramos de glicocalix dos días antes del experimento y 50 microgramos el día 1 por vía intraperitoneal.

Grupo III

	Monoc.	Linf.	Eosinof.	Neutrof.	Basof.
Muestreo 1 día 1	6.8	78	6.4	5.2	3.6
Muestreo 2 día 4	8.6	82.8	0.8	3.8	4
Muestreo 3 día 8	13.2	77.4	2.4	4.6	2.4

\* Datos expresados en porcentaje y tomada su media aritmética

**FIG. 3.- GRAFICA COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS EVENTOS DEL EXPERIMENTO.**



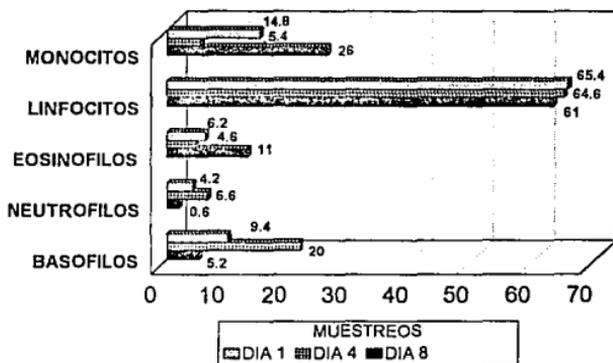
Cuadro 7.- Conteo diferencial de leucocitos de sangre periférica en ratones de la cepa CD1 inoculados con 50 microgramos de glicocalix el primer día del experimento por vía intraperitoneal.

Grupo IV

	Monoc.	Linf.	Eosinof.	Neutrof.	Basof.
Muestreo 1 día 1	14.8	65.4	6.2	4.2	9.4
Muestreo 2 día 4	5.4	64.6	4.6	6.6	20
Muestreo 3 día 8	26	61	11	0.6	5.2

\* Datos expresados en porcentaje y tomada su media aritmética

**FIG. 4.- GRAFICA COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS EVENTOS DEL EXPERIMENTO.**



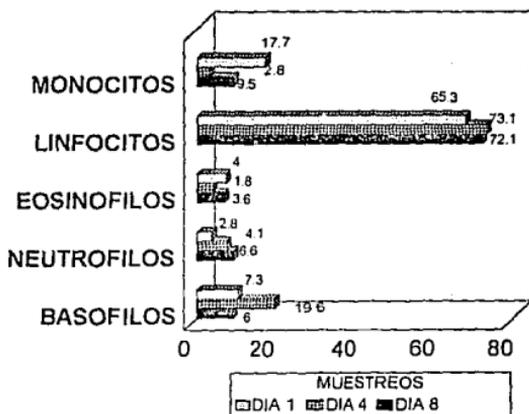
Cuadro 8.- Cuento diferencial de leucocitos de sangre periférica en ratones de la cepa CD1 inoculados con 150 microgramos de glicocalix el primer día del experimento por vía intraperitoneal.

Grupo V

	Monoc.	Linf.	Eosinof.	Neutrof.	Basof.
Muestreo 1 Día 1	17.7	65.3	4	2.8	7.3
Muestreo 2 día 4	2.8	73.1	1.8	4.1	19.6
Muestreo 3 día 8	9.5	72.1	3.6	6.6	6

\* Datos expresados en porcentaje y tomada su media aritmética

**FIG. 5.- GRAFICA COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS EVENTOS DEL EXPERIMENTO.**



## DISCUSION

En la relación hospedador-parásito las superficies que están en contacto entre los dos organismos son de gran relevancia ya que en ella se llevan a cabo modificaciones importantes de las que depende que se elimine al parásito o que el parásito sobreviva, e incluso que muera el hospedador ( Lumsden, 1975; Threadgold, 1976). Cada una de estas posibilidades esta íntimamente relacionada con la eficacia de los mecanismos de defensa del hospedador, con la evasión de la respuesta inmune y con la agresión del parásito (Bloom, 1979; Ogilvie y Wilson, 1976).

Por su trascendencia en la relación hospedador parásito se realizan numerosas investigaciones (Battaglia y col., 1983; Lumsden, 1975; Payares y Simpson, 1985; Sosa y col, 1977) para conocer mas acerca de las membranas superficiales de diferentes parásitos y en especial de su cubierta extramembranal, que esta formada principalmente por glicoproteínas y glicolípidos (glicoconjugados), y a la que se ha denominado glicocalix (Susumo, 1969). Al parecer, en distintos parásitos, el glicocalix puede desempeñar funciones diversas y contrastantes; por ejemplo, en muchos parásitos impide que se establezca una relación íntima con el hospedador, evadiendo de esta manera el sistema inmunitario, mientras que en otros parásitos, como los del género Plasmodium, es imprescindible que se establezca un contacto íntimo y específico en el glicocalix del merozoíto y del eritrocito, para que el parásito pueda invadirlo (Schrevel y col., 1986).

Por lo anterior, resulta importante estudiar las características y funciones de los diferentes tipos de glicocalix. El objetivo de este trabajo fué evaluar el efecto

del glicocalix de Fasciola hepatica sobre la producción de anticuerpos, se utilizó para medir este efecto un antígeno flagelar de S. tify por ser altamente antigénico y fácil de medir los títulos de anticuerpos producidos.

La concanavalina A induce inmunodepresión en animales de experimentación. Por ejemplo, esta inhibe la hipersensibilidad retardada en cobayos (León y Schwartz, 1969) y suprime la respuesta de anticuerpos a eritrocitos de carnero en algunos animales (Harwood y col., 1974). Por esto, se utilizó la concanavalina A como un control positivo de inmunodepresión para el antígeno inoculado.

Al comparar los títulos de anticuerpos anti Salmonella tify entre los grupos testigo positivo y testigo negativo se comprueba que la concanavalina A produce la inmunodepresión in vivo para la producción de anticuerpos, resultados similares fueron encontrados por Harwood y col en 1974. También se presentaron diferencias entre los títulos de los animales del grupo I (testigo) con los títulos de los ratones de los grupos inoculados con diferentes cantidades de glicocalix, con esto demostramos que el glicocalix induce inmunodepresión en la producción de anticuerpos contra Salmonella tify.

Lo anterior, puede complementar los trabajos de Martínez y col (1990) que encontraron deprimida la respuesta a eritrocitos de carnero en animales inoculados con glicocalix de Fasciola hepatica.

La técnica inmunológica utilizada no tiene gran sensibilidad, sin embargo, se pueden observar diferencias entre los grupos, lo que confirma la inmunodepresión. Usar técnicas de mayor sensibilidad y especificidad probablemente harán más confiables los resultados obtenidos.

Las variaciones en el conteo diferencial de leucocitos pudieron verse afectados debido a posibles fallas en la técnica de frotis utilizada, tinción de los mismos y errores al momento de realizar la lectura.

Futuros trabajos sobre este tema probablemente diluciden cual es el mecanismo efector de la inmunodepresión producida por el glicocalix de Fasciola hepatica.

## CONCLUSIONES:

- 1) La concanavalina A produce inmunodepresión sobre la producción de anticuerpos anti-antígeno flagelar "H" de Salmonella tify en ratones de la cepa CD1.
- 2) La inoculación de dosis únicas de glicocalix de Fasciola hepática induce la disminución en la producción de anticuerpos contra un antígeno flagelar de Salmonella tify.
- 3) La inoculación de dosis diferidas de glicocalix de Fasciola hepática induce disminución en la producción de anticuerpos contra un antígeno flagelar de Salmonella tify.
- 4) No se presentaron diferencias estadísticas entre la inmunodepresión provocada por la inoculación de concanavalina A y la provocada por el glicocalix de Fasciola hepática.
- 5) La inoculación de glicocalix de Fasciola hepática, a dosis única o dosis diferida produjeron ligeras alteraciones sobre la composición de leucocitos de sangre periférica.
- 6) El glicocalix de Fasciola hepática, probablemente es utilizado por el parásito para deprimir la respuesta inmune humoral del hospedero.

## BIBLIOGRAFIA

Alba, H. F.: Manual de laboratorio de parasitología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán/UNAM. Edo. de México., 1994.

Alvarez, R.E.: El glicocalix en la relación huésped parásito. Tesis de licenciatura. Escuela Nac. de Ciencias Biol. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., 1990.

Alva, E.S., Martínez, J.G., Sánchez, M. R., Sosa, R.A.: Estudio comparativo del glicocalix de diferentes parásitos. Rev. Lat. Microbiol., 31: 31-34 (1989).

Anderson, P., Berret, S., and Patterson, D.S.P.: Resistance to Fasciola hepatica in cattle. II Biochemical and morphological observations. J. Comp. Parth. 88: 245 (1978).

Battaglia, P.A., Zani, B., Blue, M., Ponzi, M. and Birago, C.: The glycoproteins of the complex surface coat of Trypanosoma lewisi. Cell Biol. Int. Rep., 7: 755-762 (1983).

Bautista, G.C.: Fasciolosis. Respuesta Inmune, INIFAP, Sector Pecuario, Palo Alto, D.F. 197-233, 1986.

Bautista, G.C., García, V.S., Alva, E.S., Sánchez, M.R., Ibarra, V.F.: Evaluación del glicocalix de Fasciola adultas como inmunógenos contra la infección por Fasciola hepatica en ovinos. Avances de investigación CENID-Microbiología. En INIFAP (1990).

Bloom, B.: Games parasites: how parasites evade immune surveillance. Nature., 279: 21-26 (1979).

Borchert, A.: Parasitología Veterinaria, 3a. ed., España, Acribia, 1987.

Calderón, R. A., Córdoba, F.: Immunosuppressive activity of Phaseolus coccineus and Phaseolus vulgaris extracts in mice. J. Immunol. 6: 522-525 (1976).

Dargie, J.D., Fascioliasis. Immunity, en: Urquhart, G.M. y J. Armour (editores), Helminth diseases of cattle, sheep and horses in Europe. R. Maclehorse and Co., Glasgow, 1973.

Dargie, J.D., Armour, J., Murray, M.: Immune mechanism and hepatic fibrosis in fascioliasis. En: E.J.L. Soulsby (ed.). Parasitic zoonoses. Academic Press, New York, 1974.

- Doyle, J.J.: Acquired immunity to experimental infection with Fasciola hepatica in cattle. Res. Vet. Sci., 12: 527 1971.
- Flores, C.R. : Fasciolosis , INIFAP , Sector Pecuuario, Palo Alto , D.F. 234-239, 1986.
- Georgi, J.R.: Parasitology for Veterinarians, 1a. ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1980.
- Hanna R. E. B.: Glycocalyx replacement juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. Exp. Parasitol., 50: 103-114 (1980).
- Harwood, E. S., Reeder, W. J., Ekstedt, R. D.: Effect of concanavalin A in vivo in suppressing the antibody response in mice. J. Immunol., 112: 63-69 (1974).
- Hurley, D., Aguilar, A., Garibay J., Landeros, J.: Técnicas de diseño experimental. Centro de investigación y de Estudios Avanzados. En CINVESTAV (1981).
- Lapage, G.: Parasitología Veterinaria, 4a. ed., Compañía edit. Continental, España, 1971.
- León, M. A., Schwartz, H. J.: Inhibition of delayed hypersensitivity to Tuberculin by concanavalin A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131: 735-736 (1969).
- Levieux, D., Levieux, A., Venien, A.: An improved passive hemagglutination test for the serological diagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2. Vet. Parasitol., 42: 53-66 (1992).
- Lumsden, R.D.: Parasitological Review: Surface ultrastructure and citochemistry of parasitic helminths. Exp. Parasitol., 37: 267-339 (1975).
- Marchesi, V.T. and Andrews, E.P., Glucoproteins: Isolation from cell membrane with lithium diyodosalicilate. Science; 171: : 1247 (1971).
- Martínez, A. A., La Fasciolosis en México. Edición Exclusiva para Merck - Sharp Dome de México. 1979.
- Martínez, C.M., Bautista, G.C.R., Córdova, A.F., Sánchez, M.R.: Depresión de la respuesta inmune humoral a eritrocitos de borrego en ratones CDI tratados con glicocalix de Fasciola hepatica. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, CENID-Parasitología. En INIPAP y SARH (1990).

Martínez, L. P., Lucas T. J.: Análisis de comportamiento de la fasciolosis ovina en rebaños transhumantes en Xalatlaco, Edo. Mex. 3er. Congreso Nacional de Parasitología. Mérida, Yuc. (1993.).

Morilla, G. A., Bautista, G.C. Manual de Inmunología, 1a ed., Diana, México, 1986.

Nájera, F. Clases de inmunoglobulinas en ovinos infectados con *Fasciola hepatica*. Memorias de la XV Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, (1981).

Ogilvie, B. M., Wilson, R. J. M.: Evasion of the immune response by parasites. B. R. Med. Bull., 32: 177-181 (1976).

Payares, G., Simpson, A. J. G.: *Schistosoma mansoni* surface glycoproteins. Analysis of their expression and antigenicity. Eur. J. Biochem., 153: 195-201 (1985).

Pérez, H.J.M.: Pérdidas económicas por decomiso de hígados parasitados con *Fasciola hepatica* de bovinos sacrificados en el rastro municipal de Huimanguillo, Tab. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Edo. Mex., 1987.

Pomarski, Z. J. H., Development of the cellular immune reaction in the course of experimental or natural *Fasciola hepatica* (trematoda) infection in cattle. Ac. Parasitol. Pol., 27: 517-540 (1980).

Quiroz, R. E.: Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos, 1a. ed., Limusa, México, 1984.

Rivera, P. L., López, S. G.: Análisis comparativo del glicocalix de diferentes parásitos. Tesis de Licenciatura. Esc. Nac. de Ciencias Biol. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., 1990.

Schrevel, J. M., Philippe, F., Monsigny, M.: Surface Plasmodium sugar-binding components evidenced by fluorescent neoglycoproteins. Biol. cell., 56: 49-55 (1986).

Sinclair, I. J., Wassall, D. A.: Sero-Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. Vet. Parasitol., 27: 283-290 (1988).

Sosa, A., Giron, M., Calzada, L.: Presence and nature of a glyco-calix-like coat on the external vesicular membrane of *Cysticercus cellulosae*. A high resolution histochemical study. Life Sciences., 21: 1021-1032 (1977).

Soulsby, S.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos, 3a. ed., Interamericana, México, 1987.

Susumu, I., : Structure and function of the glycocalyx. Federation proceedings., 28: 12-15 (1969).

Threadgold, L. T.: Fasciola hepatica; ultrastructure and histochemistry of the glycocalix of the tegument. Exp. Parasitol. 39: 119-134 (1976).

Wayne, W. D.: Bioestadística, 1a. ed. Limusa, México, 1987.