

14
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE Taenia solium
EN EL HAMSTER DORADO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARCELA ARACELI BENITEZ GUZMAN



MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

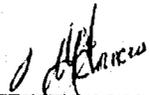
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

La presente tesis se realizó bajo la dirección y asesoría de la M. en C. Guillermina Avila Ramírez, en el laboratorio de la Dra. Ana Flisser Steinbruch, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por la Comisión de Comunidades Económicas Europeas, Contrato No. C11-CT94-0081 y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Proyecto No. IN209994.

Agradezco especialmente a la Técnico Académico Laura Aguilar por su colaboración en la realización de esta Tesis.



Tesisista:
OFB Marcela Araceli Benítez Guzmán



Asesora:
M en C. Guillermina Avila Ramirez

DEDICO ESTA TESIS A:

A mis padres, como muestra de la inmensa admiración y cariño que siento por ustedes, que me ha servido como ejemplo para ser mejor cada día y poder seguir adelante, porque me han dado lo más importante en la vida, su comprensión, cariño, apoyo y compañía.

A mis hermanos, por los intesos momentos que hemos compartido juntos, por que han hecho de mi vida algo muy divertido.

A mi "abue" por su constante apoyo y cariño.

AGRADEZCO ENORMEMENTE:

A la Dra. Ana Flisser, por permitirme ser parte de su hermoso equipo de trabajo, y porque con su constante esfuerzo y dedicación me ha mostrado el maravilloso mundo de la Ciencia y la Investigación, que recompensa con grandes satisfacciones la poca o mucha curiosidad que tengamos acerca del mundo que nos rodea.

A mi asesora, M. en C. Guillermina Avila, por dedicarme su tiempo, por su constante vigilancia que me ha permitido realizar satisfactoriamente esta tesis, así como compartir conmigo su amistad, conocimientos y experiencia.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad, ayuda y consejos desinteresados, por que ustedes le dan vida a este laboratorio:

Laura Aguilar

Javier Ambrosio

Agustín Plancarte

Irma López

Ma. Teresa Rabiela

Mayra Cruz

Pablo Maravilla

Rosa Rico

Lilia Valdez

Araceli Salgado

Laura González

Baldrá Oviedo

A mis amigas del CCH, por su amistad de toda la vida y los grandes momentos que hemos compartido juntas:

Angélica Martínez

Angélica Rodríguez

Claudia Rodríguez

Maricel campos

Beatriz Lara

A mis compañeros y amigos de Facultad que han compartido conmigo un poco más de cuatro años, tiempo en el cual han sido como una segunda familia, ustedes saben de quiénes hablo.

A mi gran Universidad, que me ha dado una formación como estudiante, joven mexicana, y ahora me da las armas suficientes para poder convertirme en una profesionalista, porque este sea un nuevo principio en mi alma mater.

A TODOS GRACIAS!!!!

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta inmune humoral contra *T. solium* en el modelo experimental del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y establecer su papel en la expulsión del parásito. Con este propósito se infectaron dos grupos de hámsteres con cuatro cisticercos de *T. solium*, uno de los cuales fue inmunosuprimido con 2mg del esteroide acetato de metilprednisolona en el momento de la infección y posteriormente cada 14 días, se contó además con otro grupo de animales que no se infectó pero si se inmunosuprimió, este grupo a su vez se inmunizó con antígeno somático de *T. solium*. Semanalmente se colectaron muestras de suero y heces de cada animal, por medio del ELISA se determinaron coproantígenos y coproanticuerpos, así como antígenos y anticuerpos séricos, se buscaron además proglótidos de la *Taenia* en tamizados de heces. Durante el tiempo que duró el experimento se sacrificaron hámsteres para recuperar a los parásitos, analizar el grado de desarrollo alcanzado y para preparar extractos antigénicos de ES y somáticos. La taeniosis en los animales inmunosuprimidos se mantuvo hasta las 17 SPI y en los no inmunosuprimidos hasta la décima SPI; se obtuvieron ejemplares de *T. solium* sexualmente maduros con útero ramificado y huevos en proceso de formación en el grupo no inmunosuprimido, en los hámsteres tratados con esteroide el desarrollo de las taenias fue menor, aunque la carga parasitaria fue mayor. En los grupos de animales infectados los coproantígenos fueron positivos a partir de la primera SPI y se mantuvieron así mientras los animales permanecieron parasitados; se detectaron antígenos circulantes solamente en animales no inmunosuprimidos a partir de la tercera SPI y desaparecieron una semana antes que la *Taenia* fuera eliminada. Todos los animales presentaron anticuerpos séricos de clase IgG contra la *Taenia* a partir de la segunda SPI, los títulos disminuyeron cuando el parásito fue expulsado, aunque permanecieron por arriba del punto de corte. Los coproanticuerpos de clase IgG se detectaron en la tercera SPI en los animales no inmunosuprimidos y en los hámsteres tratados con esteroide fueron medibles cuando el inmunosupresor fue retirado, en ambos grupos se observaron incrementos de los anticuerpos IgG locales al momento que la *Taenia* fue expulsada, disminuyendo tiempo después sin alcanzar el punto de corte. En cuanto a la presencia de proglótidos en heces, sólo en los animales inmunosuprimidos se observaron a partir de la octava SPI hasta la eliminación completa del parásito. La presencia de anticuerpos IgG anti *T. solium* a nivel local y sistémico demuestra que el hámster desarrolla una respuesta inmune contra el parásito, los títulos altos de IgG en heces encontrados durante la expulsión de *T. solium* nos indica que esta respuesta participa de alguna manera en la eliminación de la *Taenia* por parte del huésped, sugiriendo además la presencia de un proceso inflamatorio local. Sin embargo la respuesta local se abate en los animales inmunosuprimidos permitiendo la implantación de *T. solium* durante más tiempo en el hámster.

INDICE

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
INDICE GENERAL	iv
I. INTRODUCCION	1
Justificación	1
Hipótesis	1
Objetivos generales	2
Objetivos particulares	2
II GENERALIDADES	4
1. Morfología	4
2. Ciclo de vida	7
3. Cuadro clínico	8
3.1 Cisticercosis	
3.2 Taeniosis	
4. Epidemiología	10
5. Diagnóstico	12
5.1 Cisticercosis	
5.2 Taeniosis	
6. Inmunología	16
6.1 Cisticercosis	
6.2 Taeniosis	
7. Antecedentes	19
7.1 Modelo experimental	
7.2 Respuesta inmune contra parásitos intestinales.	
7.3 Respuesta inmune en la mucosa intestinal.	
III. Metodología	29
1. Modelo Experimental de <i>Taenia solium</i> .	29
1.1 Obtención de cisticercos de <i>T. solium</i>	
1.2 Grupos experimentales y protocolo de infección	
1.3 Colección de muestras biológicas	
1.4 Obtención de estadio adulto	
1.5 ELISA para la detección de coproantígenos de <i>T. solium</i>	

1.6 Tamizados de heces para la obtención de proglótidos	
1.7 Tinción de parásitos	
2. Estudio de la respuesta inmune humoral en el modelo experimental	36
2.1 Obtención de sueros	
2.2 Obtención del antígeno de ES de <i>T. solium</i>	
2.3 Obtención del antígeno somático de <i>T. solium</i>	
2.4 Determinación de proteínas	
2.5 Estandarización del ELISA para anticuerpo séricos	
2.6 Estandarización del ELISA para coproanticuerpos	
2.7 Estandarización del ELISA para antígenos séricos	
3. Análisis estadístico	42
IV. Resultados	44
1. Modelo experimental de <i>T. solium</i> en el hámster dorado	44
1.1 Viabilidad de los cisticercos de <i>T. solium</i>	
1.2 Grupos experimentales y protocolo de infección	
1.3 Obtención del estado adulto	
1.4 ELISA para la detección de coproantígenos de <i>T. solium</i>	
1.5 Tamizados de heces	
2. Estudio de la respuesta inmune en el modelo experimental	59
2.1 Estandarización del ELISA para anticuerpos séricos	
2.2 Estandarización del ELISA para coproanticuerpos	
2.3 Estandarización del ELISA para antígenos séricos	
V. Discusión	82
VI. Conclusiones	99
VII. Bibliografía	101

I. INTRODUCCION

JUSTIFICACION

El ser humano es el único hospedero natural del parásito adulto *T. solium*, aunque el ciclo de vida de este céstodo se conoce por más de un siglo, no se ha avanzado en el estudio de la relación hospedero-parásito, esta falta de conocimiento se debe quizás a que la identificación del portador de *T. solium* es muy difícil. Una alternativa para poder estudiar las características de esta relación es el desarrollo de modelos experimentales para taeniosis. El modelo del hámster ha demostrado ser de gran utilidad, ya que las taenias pueden implantarse y desarrollarse en casi el 100% de los animales durante períodos cortos, puede lograrse un mayor tiempo de infección (hasta por cuatro meses) cuando los individuos son inmunosuprimidos; en los cuales se ha logrado la obtención de parásitos sexualmente desarrollados con huevos inmaduros, este modelo permite la obtención con cierta facilidad de una buena cantidad de taenias y antígenos del parásito.

Por otra parte, el hámster dorado ha sido usado como modelo experimental para los céstodos *T. crassiceps* y *Echinococcus multilocularis*, en el caso de *T. crassiceps* se ha logrado estudiar la respuesta inmune local y sistémica que ha permitido conocer algunos de los factores que provocan la eliminación de esta *Taenia* del intestino delgado del hámster inmuno y no inmunosuprimido. Debido a la relación filogenética que tienen *T. solium* y *T. crassiceps* y a su desarrollo en el mismo modelo experimental, es factible estudiar la respuesta inmune humoral en los hámsteres infectados con *T. solium* y poder establecer la participación de esta respuesta en la eliminación de la *Taenia*, en un modelo de infección que trata de simular a la infección natural existente en el ser humano.

HIPOTESIS

La respuesta inmune es un factor determinante para la expulsión de *T. solium* en el modelo experimental del hámster. En la respuesta inmune que se genera contra la *Taenia* van a participar los anticuerpos de la clase IgG, en el momento en que se elimine el parásito los niveles de anticuerpos y antígenos de la *Taenia* estarán a su máximo nivel; después de la expulsión de *T. solium* se mantendrán títulos altos de anticuerpos, mientras que las concentraciones de antígenos disminuirán hasta hacerse negativos en un tiempo corto.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta inmune humoral en el hámster infectado con *Taenia solium* mediante la determinación de anticuerpos específicos de la clase IgG en suero y en heces. Asimismo, realizar la cinética de detección de antígenos de *T. solium* en heces como medio para valorar la infección en el modelo experimental.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Infectar hámsteres con cisticercos de *T. solium*, manteniendo la infección en animales inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos.
2. Colectar muestras de suero y heces de cada animal semanalmente.
3. Realizar el ELISA para detección de coproantígenos de *T. solium* en los hámsteres para hacer el seguimiento de la taeniosis.
4. Obtener taenias de los modelos experimentales y producir antígeno somático y de

excreción-secreción.

5. Realizar tamizados de heces semanalmente en búsqueda de proglótidos de *T. solium*.
6. Estandarizar un ELISA para la detección de anticuerpos de clase IgG en suero de hámsteres infectados con *T. solium*.
7. Estandarizar un ELISA para la detección de anticuerpos de clase IgG en heces de hámsteres infectados con *T. solium*.
8. Estandarizar un ELISA para la detección de antígenos de *Taenia* circulantes en el suero de los hámsteres.
9. Realizar las cinéticas de detección de anticuerpos en heces y en suero en todos los animales.
10. Realizar la cinética de detección de antígenos circulantes de *Taenia* en el suero de los hámsteres.

II GENERALIDADES

Taenia solium es un céstodo hermafrodita que parasita tanto al ser humano como al cerdo, presentando además un estadio de vida libre. La clasificación zoológica de *T. solium* es la siguiente de acuerdo con Schmidt, 1986.

PHYLUM Platyhelminthes.

CLASE Cestoidea.

SUBCLASE Eucestoda.

ORDEN Cyclophyllidae.

FAMILIA Taeniidae.

GENERO *Taenia*.

ESPECIE *Taenia solium* (Linnaeus, 1758).

La cisticercosis es la enfermedad parasitaria causada por el establecimiento del estadio larvario o metacéstodo de *T. solium* en los hospederos intermediarios, el ser humano y el cerdo.

La taeniosis es una parasitosis causada por el establecimiento del estadio adulto del género *Taenia* en el intestino delgado del ser humano. *T. solium* y *T. saginata* son las dos especies de *Taenia* que pueden provocar la taeniosis en el hombre, sus ciclos de vida son dependientes de la relación hombre-bovino en *T. saginata* y hombre-porcino para *T. solium* (Filisser, 1995).

1. MORFOLOGIA

T. solium es un parásito aplanado dorsoventralmente que tiene forma de cinta, es de color blanco; el cuerpo de la *Taenia* se divide en tres porciones: el escólex, el cuello y el

estróbilo. El escólex contiene la principal concentración de elementos neurales, secretores, así como estructuras especializadas (ganchos y ventosas) para el ataque a la mucosa intestinal del hospedero. El escólex mide alrededor de 1mm de diámetro, está provisto de cuatro ventosas musculares y un rostelo armado con una doble corona de ganchos en número de 22 a 28. Los ganchos grandes que conforman la corona interna miden 0.13 a 0.16mm, la corona externa está integrada por los ganchos cortos y miden 0.1 a 0.12mm (Craig, C.F. y Faust, E.C., 1970). Estas estructuras sirven como órgano de fijación del parásito en la mucosa intestinal, le permite vivir y soportar los movimientos peristálticos del intestino, así como el pasaje del alimento parcialmente digerido (Smyth, J.D. and Mcmanus, D.P., 1989).

T. solium carece de un aparato digestivo propio, todos los materiales nutritivos y de desecho deben pasar a través de la superficie total del cuerpo. La estructura básica de absorción puede ser comparada con la superficie intestinal, en el parásito se conoce como tegumento, éste contiene sistemas específicos de transporte molecular y iónico de numerosos nutrientes. El sistema excretor o sistema protonefridial consiste en una amplia red de canales tubulares los cuales se extienden a lo largo de todo el parásito, alcanzando el exterior en la sección posterior de los últimos proglótidos; otras estructuras son las llamadas células flama las cuales están esparcidas a través del escólex y el estróbilo, que posiblemente actúan como "filtros" del fluido extracelular, ambas estructuras, túbulos y células flama se encuentran conectadas entre sí integrando todo el sistema (Lumsden, R.D. and Hildreth, M.B., 1983). El sistema nervioso de *T. solium* es rudimentario, concentrado principalmente en el ganglio del escólex y tracto nervioso principal, los cuales están mejor estudiados en el metacéstodo.

La región del cuello es una porción poco diferenciada, contiene una masa central de células embrionarias activas mitoticamente (Lumsden, R.D. and Hildreth, M.B., 1983); el cuello da origen a la tercera región o estróbilo.

El estróbilo de *T. solium* es de dimensiones variables, puede alcanzar una longitud de 2 a 7 metros y está dividido en unidades reproductoras independientes llamadas proglótidos, los cuales según su desarrollo sexual se clasifican en inmaduros, maduros o grávidos. Los proglótidos inmaduros son los más cercanos al cuello, no tienen órganos sexuales diferenciados; son seguidos por los proglótidos maduros, en los cuales se encuentran los órganos sexuales diferenciados, son de forma cuadrangular, contienen de 150 a 200 testículos y puede observarse la presencia del útero parcialmente ramificado en algunos de ellos (Lamoth, R., et al, 1985). Finalmente se encuentran los proglótidos grávidos, son de forma rectangular, miden 8 a 16mm de ancho y 6 a 10mm de largo y están llenos de huevos, el útero ocupa casi toda la superficie del proglótido, *T. solium* presenta como rasgo característico de 7 a 13 ramas uterinas. En cada proglótido grávido se encuentran alrededor de 60 000 huevos, en diferente grado de madurez (Lamoth, R., et al, 1985).

Los huevos de *T. solium* son esféricos y tienen una apariencia radial cuando son observadas al microscopio de luz, miden aproximadamente de 30 a 40 μ m de diámetro. La capa más externa que rodea al huevo es el vitelo, generalmente está ausente en huevos aislados de la materia fecal; enseguida se encuentra la membrana embriofórica, que tiene la apariencia de un cráter y rodea al embrióforo; el cual tiene una apariencia poligonal irregular, es la envoltura más prominente y es sintetizada por las células embriofóricas internas (Laclett, J.P., et al, 1982). El embrióforo en los huevos maduros

aparece como una estructura rígida que protege al embrión del ambiente externo, está formado por bloques de proteína unidos en forma contigua por una sustancia cementante. Los bloques embriofóricos están compuestos por una proteína parecida a la queratina, la cual resiste a los jugos digestivos artificiales y naturales; en contraste, la sustancia cementante es susceptible a la digestión enzimática (Trejo, V., 1986). La capa más interna del huevo es la membrana oncosferal, es impermeable a las condiciones ambientales externas pero llega a ser permeable cuando se pone en contacto con pancreatina y permite al embrión hexacanto u oncosfera activarse para continuar su desarrollo (Flisser, A., 1994).

El metacéstodo o estado larvario de *T. solium* es de forma ovoide mide de 5 a 10mm de diámetro, aunque su tamaño varía grandemente de acuerdo a su "edad" (Yoshino, 1930), lo componen una membrana vesicular translúcida, un escólex invaginado con cuatro ventosas musculares y una doble corona de ganchos idénticos al estadio adulto, además le acompaña un líquido vesicular que los rodea. El cisticerco tiene su cuello doblado en un receptáculo formando un espiral, los dobleces del cuello contenidos en el receptáculo forman septos que se considera constituyen el canal espiral. La superficie externa de la vesícula está rodeada por microvellosidades limitadas por una membrana plasmática, la cual está cubierta por una capa no delimitada de glicocalix, esta pared vesicular también contiene una red de estructuras excretoras y neurales similares a la del parásito adulto (Flisser, A., 1994).

2. CICLO DE VIDA

La taeniosis por *T. solium* se adquiere por la ingestión de carne de cerdo mal cocida o

cruda que contenga cisticercos vivos, en el intestino delgado las sales biliares y las enzimas digestivas hacen que evagine el escólex y se fije a la mucosa intestinal mediante sus ganchos y ventosas. Una vez establecida la *Taenia* en el primer tercio del intestino delgado, esta inicia su crecimiento; se ha observado que el tiempo en el cual el parásito adulto alcanza su madurez sexual es de 3 a 4 meses (Gemmell, M., et. al, 1983), a partir del cual comienza la liberación de proglótidos grávidos y huevos a través de las heces del hospedero, se considera en general que de dos a tres segmentos son liberados semanalmente (Flisser, A., 1994).

El ciclo de vida del parásito se cierra cuando el ser humano o el cerdo ingieren los huevos o embriones hexacantos, éstos sufren cambios fisiológicos una vez que son activados en presencia de las enzimas digestivas, que se manifiestan por el movimiento de los ganchos, secreción de enzimas, las cuales permiten a la oncosfera escapar de la membrana oncosférica y atacar el epitelio intestinal del hospedero hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos por cuya corriente son transportados a cualquier tejido del organismo. En el hombre y el cerdo la oncosfera se aloja principalmente en cerebro, músculos, corazón, lengua y ojos.

3. CUADRO CLINICO

3.1 Cisticercosis humana

Las manifestaciones clínicas de la cisticercosis dependen del número, localización, y tipo de parásitos que se encuentren en el SNC y las meninges cerebrales. así como de la respuesta inflamatoria del hospedero. Existen dos tipos de cisticercos que pueden

parasitar al hombre, el cisticerco celuloso y el cisticerco racemoso, que es una vesícula de forma irregular que mide de 10 a 20cm de diámetro, que tiene forma de racimo de uvas, no presenta escólex, y pueden contener hasta 60ml de fluido (Berman, J.D., et al, 1981). Los cisticercos de tipo celuloso están restringidos a espacios subaracnoideos o en tejido cerebral, mientras el racemoso está localizado en cavidades ventriculares y cisternas meníngeas basales, probablemente por su localización en espacios relativamente grandes, los cisticercos son estimulados a crecer y transformarse en racemosos, éstos por su tamaño y localización suelen ser mortales en los pacientes que los presentan (Flisser, A., 1994).

En América Latina se reporta una mayor frecuencia de casos de neurocisticercosis, mientras que en Asia la cisticercosis muscular o subcutánea es la más frecuente (Schenone, H., et al, 1982; Flisser, A., 1994). En la neurocisticercosis se presenta una gran variedad de signos y síntomas, entre los que se encuentran: dolor de cabeza, hipertensión endocraniana, alteraciones mentales, convulsiones, alteraciones vestibulo-cerebrales, parálisis de miembros, calcificaciones intracraniales, etc (Flisser, A., 1988). Aunque también la neurocisticercosis puede cursar en forma asintomática y sólo puede ser detectada en autopsia por fallecimientos ajenos a esta parasitosis.

En la cisticercosis ocular el cisticerco se alberga dentro del globo ocular y debajo de la retina, le sigue en frecuencia a la neurocisticercosis (Flisser, A., 1988). La localización del parásito dentro del globo ocular genera una reacción inflamatoria que conlleva a la disminución de la agudeza visual o la ceguera.

La cisticercosis muscular o subcutánea generalmente es asintomática o es bien tolerada por el paciente, probablemente por la baja carga parasitaria que se suele tener (Dixon,

H.B.F., et al, 1961), sin embargo, existen casos reportados de pseudohipertrofia muscular debida a cisticercosis, en los cuales se han encontrado gran cantidad de parásitos (Rim, H.J., 1989).

3.2 Taeniosis

El estadio adulto de *T. solium* generalmente no causa problemas serios o es asintomático, aunque puede presentarse dolor abdominal, sensación de hambre, indigestión, debilidad y diarrea (Pawlosky, 1990). En general se considera que la patología y sintomatología de la taeniosis por *T. solium* es menos obvia que la ocasionada por *T. saginata*, debido a que *T. solium* es más pequeña y menos activa y por eso pasa inadvertida en los portadores (Yoshino, K., 1934; Gemmell, et al, 1983; Shantz, P., 1989; Pawlowsky, Z.S., 1990).

4. EPIDEMIOLOGIA

Taenia solium está ampliamente distribuida en todo el mundo y es común en los países en desarrollo, se ha relacionado estrechamente con la pobreza, desigualdad social, deficiencias sanitarias, y prácticas primitivas de control porcino (Schenone, H., 1982; Damonte, L.J., 1983; Sarti, E.J., et al, 1988).

En México la neurocisticercosis tiene un impacto importante en los servicios de salud y en la economía nacional, ya que el 75% de los pacientes con neurocisticercosis están en edades productivas, además los costos de un paciente con esta enfermedad se calcularon en 2,173 dólares y la erogación anual ascendía a 255 millones de dólares (Velasco, M. et al., 1982). Por otra parte el decomiso de las canales de cerdo con cisticercosis también

causan pérdidas económicas (Acevedo-Hernández, A., 1982).

En Latinoamérica, Asia y África se ha reportado que la prevalencia de neurocisticercosis en las autopsias oscila de 0.4 a 3.2% (Gammel, H., 1983). En México, la incidencia de casos clínicos de neurocisticercosis es del 7% (Flisser, A., 1988). En autopsias con neurocisticercosis los parásitos causaron la muerte en el 13% de los casos, mientras que el 40 a 80% fueron encuentros casuales (Briceño, C.E., 1961; Rabiela, M.T., et al, 1972; Rabiela, M.T., 1982.), el 11% de los casos neurológicos en hospitales son por cisticercosis (Velasco, M., et al, 1982).

En estudios epidemiológicos hechos recientemente se ha demostrado una asociación estrecha entre los portadores de *Taenia* y las personas con cuadros epilépticos o seropositividad a la cisticercosis y con cerdos infectados. Los factores de riesgo asociados con la seropositividad a cisticercosis incluyeron una historia clínica de haber expulsado proglótidos de *Taenia sp.* por parte del paciente o de algún conviviente intradomiciliario, consumo frecuente de carne de puerco así como deficiente higiene personal del paciente. La cisticercosis porcina fué asociada con el mal control que se tenía de los cerdos, al permitirles el acceso a las heces de humanos posiblemente contaminadas con huevos de *Taenia* (Díaz-Camacho, S., et al, 1990; Díaz-Camacho, S., et al, 1991). La conclusión más importante que han arrojado estos estudios epidemiológicos es que el principal factor de riesgo para adquirir la cisticercosis es la presencia del portador de la *Taenia* en el núcleo familiar (Sarti, E.J., et al, 1988; Keilbach, N.M., et al, 1989; Díaz-Camacho, S., et al, 1990; Díaz-Camacho, S., et al, 1991). Por otro lado, la respuesta inmune de anticuerpos anti cisticerco ha resultado ser un indicador sensible para la identificación de focos de

infección en la taeniosis y la cisticercosis por *T. solium* (Shantz, P.M., et al, 1989; Lara-Aguilera, R., et al, 1992; Sarti, E.J., et al 1994).

La taeniosis por *T. solium* tiene una prevalencia variable en diferentes regiones del mundo. En México se ha estimado una prevalencia del 1 al 2% para taeniosis, sin embargo, este porcentaje puede estar debajo de la cifra real, debido a los problemas de diagnóstico de esta parasitosis y a la falta de notificación de los casos registrados.

5. DIAGNOSTICO

5.1 Cisticercosis humana.

En la última década el diagnóstico de referencia para la neurocisticercosis se hace por las técnicas de imagen como la tomografía axial computada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (Rodríguez-Carbajal, J., et al, 1982; Minguetti, G., et al, 1983; Almeida-Pinto, J., 1988; Jena, A., et al, 1988) y como procedimientos alternativos se han usado los ensayos inmunológicos, donde se detectan anticuerpos anti cisticerco en suero o líquido cefalorraquídeo (LCR). Las técnicas inmunoenzimáticas del tipo ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) y de inmunoelectrotransferencia (Western Blot) son usados frecuentemente como apoyo al diagnóstico clínico de pacientes sintomáticos en varios países. (Gottstein, B., et al, 1986; Plancarte, A., et al, 1987; Tsang, V.C.W., et al, 1989; Baveja, V.K., et al, 1990; Wilson, M., et al, 1991).

Tanto la TAC como la resonancia son útiles para confirmar la etiología de la enfermedad, pero también para definir el número, estadio, localización y extensión de las lesiones. Estos exámenes son seguros y precisos; sin embargo, tienen la desventaja de ser muy

costosos, poco accesibles y no pueden ser utilizados en estudios epidemiológicos; en contraste, las técnicas inmunodiagnósticas pueden aplicarse en estudios epidemiológicos donde se analizan miles de muestras y su costo es menor.

El diagnóstico inmunológico de la cisticercosis por medio de la detección de anticuerpos se hizo en un principio con la técnica de fijación de complemento (Moses, A., 1911), las técnicas de inmunoprecipitación, como la doble difusión radial también fueron aplicadas, posteriormente se desarrolló la hemaglutinación pasiva (Machnicka, et al, 1974), inmunofluorescencia indirecta (Flentje, B. and Padelt., H., 1981) y la inmunolectroforesis (Flisser, A., et al, 1975), éstos métodos eran poco sensibles y presentaban reactividad cruzada con otras parasitosis (Flisser, A., et al, 1994).

En los años ochenta se estandarizó el ELISA para detección de anticuerpos (Espinoza, B., 1986; Flisser, A., et al 1990), en donde se empleó como fuente de antígeno el extracto total del cisticerco o un antígeno semipurificado (antígeno B), con estos antígenos se detectaron anticuerpos contra el cisticerco tanto en el suero como en el LCR de los pacientes, con una sensibilidad del 80% y 90% respectivamente. Sin embargo, se siguieron presentando problemas de reactividad cruzada con otras parasitosis cuando se usó el extracto crudo. Posteriormente al utilizar el antígeno B purificado se obtuvieron resultados similares de sensibilidad y especificidad (Flisser, A., et al, 1994).

Recientemente, Tsang, et al (1989), estandarizaron la inmunolectrotransferencia, en donde emplearon una serie de antígenos glicoproteicos específicos de *T. solium*. Estos autores reportaron la presencia de siete glicoproteínas diagnósticas reconocidas comúnmente por los sueros de los pacientes con neurocisticercosis. Esta técnica tiene un 100% de especificidad y un 98% de sensibilidad, puede utilizarse en la búsqueda de

anticuerpos en muestras de suero, LCR y saliva (Tsang, et al, 1989; Feldman, et al, 1990).

Una alternativa para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana es la detección de moléculas de excreción y secreción (ES) del cisticerco, en donde se confirma la presencia del parásito en el paciente, se ha estandarizado un ELISA con doble anticuerpo de captura, usando para ello anticuerpos monoclonales y policlonales contra antígenos de ES y somáticos del cisticerco de *T. solium*, esta técnica tiene una sensibilidad del 72% (Correa, et al 1989).

5.2 Taeniosis

El diagnóstico de la taeniosis humana hasta hace algunos años se hacía solamente por métodos coproparasitológicos (CPS), en donde se busca la presencia de huevos por técnicas de concentración (Ritchie, 1948) o proglótidos del parásito en tamizados de heces. Estas técnicas son poco sensibles, sólo se logra detectar del 50 al 70% de los portadores de *Taenia* ya que la liberación de proglótidos y huevos no es constante y ocurre únicamente en el período patente de la infección. Aunado a la baja sensibilidad de los CPS, el diagnóstico sólo permite la diferenciación de género y no pueden distinguirse morfológicamente los huevos de *T. solium* de los de *T. saginata*. El diagnóstico diferencial entre estas dos especies de *Taenia* se basa en la observación del número de ramas uterinas en los proglótidos grávidos o por la presencia de un rostelo armado en el escólex (Flisser, et al, 1994).

En cuanto al diagnóstico inmunológico se han probado técnicas intradérmicas y pruebas serológicas como la fijación de complemento, la doble precipitación radial, donde se detectaron anticuerpos contra la *Taenia*, estos ensayos tuvieron baja especificidad y

sensibilidad (Gemmell, et al, 1983).

Recientemente, la detección de antígenos del parásito en muestras fecales ha resultado ser una técnica de diagnóstico muy útil (Deplazes, et al, 1990,1991; Maas, et al, 1991; Allan, J., et al, 1990,1992; Avila, G., 1992). Los métodos desarrollados se basan en un ELISA de captura de doble anticuerpo policlonal producidos en conejo dirigidos contra antígenos somáticos de la *Taenia* (Allan, J., et al, 1990, 1992; Maas, et al, 1991; Avila, G., 1992) o de ES (Deplazes, et al, 1990, 1991). La detección de coproantígenos de *Taenia* tiene una sensibilidad y especificidad del 100% (Avila, G., 1992), aunque no se puede diferenciar entre los portadores de *T. solium* y *T. saginata*. Las ventajas del ELISA para coproantígenos de *Taenia* es que puede diagnosticarse la parasitosis aún en el periodo prepatente, no es necesario la presencia de huevos o proglótidos del parásito y puede demostrarse la eficacia del tratamiento antiparasitario (Avila, G., 1992). Existe una variante de esta técnica que prescinde del uso de la placa de microtitulación, el ensayo se conoce como ELISA en mancha o Dipstick dot-ELISA, como soporte para los anticuerpos se utiliza una membrana de nitrocelulosa; el método es más rápido, permite su utilización en zonas donde se carece de laboratorio, puede usarse incluso en el campo, aunque es menos sensible, ya que se detecta al 89% de los casos positivos (Allan, J., et al, 1992).

Recientemente se desarrolló un método certero para el diagnóstico de los portadores de *T. solium* que se basa en la detección de huevos del parásito por medio de sondas específicas que llegan a detectar la presencia de un sólo huevo en las heces del individuo; aunque esta prueba puede diferenciar las especies de *Taenia*, su sensibilidad disminuye en el periodo prepatente de la infección, debido a la ausencia de huevos. (Flisser, et al

1988; Harrison, et al, 1990).

6. INMUNOLOGIA

Las investigaciones sobre inmunidad y diagnóstico en *T. solium* se han dirigido primordialmente al estudio del estadio larvario del parásito, debido quizás a la gran cantidad de síntomas y al desenlace fatal que puede tener un paciente con neurocisticercosis. Se ha estudiado ampliamente la respuesta inmune humoral y se han hecho algunos trabajos sobre la repuesta inmune celular. En cuanto al estadio adulto de esta *Taenia* se conoce muy poco sobre la relación hospedero-parásito y los informes que se tienen se han generado de la infección por *T. saginata* principalmente (Gemmell, 1983). Además debe tenerse presente que la respuesta inmune que genere el hospedero contra *T. solium* va a depender de la naturaleza del sitio invadido, la intimidad del contacto hospedero-parásito y del estadio de desarrollo del parásito (Smyth, J.D. and McManus, D.P., 1989).

6.1 Cisticercosis humana

El paciente con neurocisticercosis genera una respuesta inmune heterogénea contra el parásito, pueden reconocer más de un antígeno del metacéstodo y producir diferentes clases de inmunoglobulinas contra ellos (Espinoza, B, et al, 1986), las cuales pueden detectarse en suero, LCR y saliva (Flisser, A., 1980; Flisser, A., et al, 1982; Grogl, M., et al, 1985; Feldman, et al, 1990). La IgM se encuentra con menor frecuencia en LCR, y su presencia puede indicar daño de la barrera hematoencefálica (Flisser, A., 1994). Los anticuerpos de clase IgA han sido reportados en pocos casos tanto en suero como

en LCR (Flisser, A., et al, 1980; Espinoza, B., et al, 1986) y aunque ha sido investigada su presencia principalmente en saliva, no se ha encontrado (Acosta, E., et al 1990); sin embargo, la detección de inmunoglobulinas puede variar debido principalmente al ensayo o a la fuente antigénica empleada (Flisser, A., 1994). Se ha demostrado la producción local de IgG específica contra el cisticerco en el SNC, pero los epítopes antigénicos que reconoce o su concentración relativa en suero y LCR se desconoce (Miller, B.I., et al, 1983; Cho, S.Y., 1988). La presencia de IgG en suero corrobora que la enfermedad es generalmente un proceso crónico y de larga duración (Flisser, A., 1994). En cuanto a la inmunoglobulina de clase IgE, los pocos estudios existentes indican una elevación en el nivel de IgE total y específica en individuos con neurocisticercosis (Goldberg, A. S., et al , 1981; Cisneros, V., et al, 1982; Godorezky, C., 1987.).

El cisticerco de *T. solium* tiene un antígeno inmunodominante conocido como antígeno B, es una proteína de secreción del parásito de 95-105 KD de peso molecular que se encuentra también en varios platelmintos (Flisser, A., 1988) la mayoría de los pacientes responden contra este antígeno (Espinoza, B., 1982, 1986; Plancarte, A, et al, 1987; Correa, M.D., et al, 1989; Flisser, A., 1980, 1982, 1990), aunque también hay cierta heterogeneidad en el reconocimiento contra este antígeno en suero y LCR de pacientes con neurocisticercosis y en sueros de animales inmunizados. Según la técnica de inmunoelectrotransferencia estandarizada por Tsang, et al (1989) hay siete glicoproteínas comunmente reconocidas por anticuerpos de sueros y LCR de pacientes con cisticercosis, las cuales son GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13, la respuesta inmune es bastante heterogénea, la mayoría de los sueros reaccionan con más de una banda diagnóstica, siendo las de mayor peso molecular las más comúnmente encontradas

(GP42-39 y GP24) (Larralde, C., et al., 1989; Tsang, et al, 1989).

Por otra parte, en cortes histológicos hechos de cisticercos se ha visto la presencia de proteínas y de inmunoglobulinas adsorbidas a la superficie de la membrana del parásito, aunque se desconoce el papel que desempeñan y si estos anticuerpos son específicos contra el cisticerco, se cree que es un mecanismo de evasión contra la respuesta inmune del huésped que posee el parásito (Correa, D., et al, 1989).

Las imágenes histológicas de cortes de tejido parasitado tanto en el hombre como en el cerdo, demuestran la presencia de una reacción inflamatoria alrededor del cisticerco, el primer tipo de célula identificada como invasora en la reacción es el eosinófilo (Escobar, A., 1972; Willms, K. and Merchant, M., 1980, Rabiela, M. T., 1989). La inflamación es más pronunciada cuando el cisticerco está en contacto con las meninges basales, provocando de forma progresiva un cuadro de hidrocefalia e hipertensión endocraniana.

La información accesible sobre la inmunidad celular en los pacientes con neurocisticercosis es escasa, sin embargo, se ha observado una relación anormal en las poblaciones celulares CD4/CD8, con un incremento en la subpoblación de las células T citotóxicas, que sugieren alguna disfunción de la respuesta inmune (Flisser, A., 1982, 1986, 1987). También se ha demostrado que los productos de ES de los cisticercos son genotóxicos en los linfocitos T humanos y de cerdo, comprobado en linfocitos periféricos de individuos con cisticercosis (Herrera, A.L., et al, 1994).

6.2 Taeniosis

En infecciones experimentales y naturales con céstodos adultos se ha demostrado una respuesta de anticuerpos específicos contra el parásito adulto, lo que indica la presencia de mecanismos efectores inmunológicamente mediados que probablemente contribuyen

a la relación hospedero-parásito en el intestino. No se conoce la inmunidad a la taeniosis por *T. solium*, aunque se ha demostrado la presencia de anticuerpos circulantes en pacientes con *Taenia saginata* (Machnicka, 1974). Por otro lado el papel de los anticuerpos circulantes en el crecimiento o rechazo de los parásitos no está claro, al igual que la producción de anticuerpos locales.

7. ANTECEDENTES

7.1 Modelo Experimental

Debido a la dificultad en el diagnóstico e identificación del individuo con taeniosis, particularmente por *T. solium*, y al poco conocimiento de la relación hospedero-parásito, se han desarrollado modelos experimentales en donde se ha tratado de obtener el estado adulto de la *Taenia* con las mismas características morfológicas que las obtenidas de infecciones naturales en el ser humano. Al respecto, Gnezdilov (1957) reportó el modelo experimental del hámster dorado para *T. solium* y Verster (1971, 1974), inició el uso de agentes inmunosupresores para aumentar la susceptibilidad de los animales a la infección. En el modelo del hámster se han obtenido ejemplares de *T. solium* con las mismas características morfológicas de las reportadas en el hospedero natural, con excepción de la presencia de proglótidos grávidos (Avila, G., 1992; Aguilar, L., 1994). Se ha observado que la aplicación de medicamentos inmunosupresores y antihistamínicos mejoran proporcionalmente el establecimiento de las taenias en el intestino delgado del hámster (Pathak, K.M.L. and Gaur, S.N.S., 1985). El grado de desarrollo sexual del parásito está relacionado directamente con la cantidad de inmunosupresor administrado

aunque también la carga parasitaria afecta negativamente el desarrollo de la *Taenia* (Aguilar, L., 1995; Sato and Kamiya, 1989). En los hámsteres no inmunosuprimidos puede implantarse la *Taenia*, sin embargo, su permanencia en el intestino es muy corta y los parásitos son rechazados rápidamente en comparación con el grupo de animales inmunosuprimidos (Avila, G., 1992; Aguilar, L., 1995; Sato and Kamiya, 1989).

7.2 Respuesta inmune contra parásitos intestinales

Lo que se conoce hasta ahora sobre los parásitos es que en la mayoría de sus hospederos naturales son capaces de producir una respuesta inmune de tipo crónica, que es relativamente ineficiente en eliminar a los parásitos residentes. Esta resistencia llevada a cabo en el hospedero puede ser de cuatro formas: 1) inmunidad concomitante, 2) inmunidad esterilizante, 3) inmunidad modificada por el parásito y 4) resistencia natural o innata, y los mecanismos efectores que intervienen son muy variados (Mitchell, G.F., 1982).

Durante muchos años se creyó que los céstodos adultos no eran inmunogénicos o su inmunogenicidad era muy poca, estas afirmaciones se basan en el hecho de que el escólex de la mayoría de los céstodos no tenían una penetración suficiente en la mucosa intestinal y por tanto era mínimo su contacto con el sistema inmune del hospedero (Ito, A. and Smyth, J.D., 1987). *Echinococcus granulosus* y *E. multiloculares* son dos céstodos que se estudiaron en un inicio y se consideraron parásitos intestinales y tisulares por penetrar su escólex la mucosa intestinal, como resultado de esta interacción el hospedero puede generar anticuerpos anti-*E. granulosus* y son detectados en suero de perros desde los 14 días post-infección (Jenkins, D.J. and Rickard, M.D., 1986). Sin embargo, en

muchos céstodos el contacto del escólex es más superficial y el rompimiento de la mucosa puede no ocurrir.

Por otra parte, no se ha establecido bien si los antígenos de parásitos intestinales son realmente absorbidos a través de la pared intestinal, así, los antígenos liberados por cualquier parte del parásito (cuello o estróbilo) podrían ser absorbidos y posiblemente estimular la respuesta inmune del hospedero. Se conoce que la inoculación de antígenos solubles no invasivos producidos por varios microorganismos, incluyendo a los parásitos, al entrar en el tracto intestinal producen una respuesta inmune que es medible (Ayuya, J.M. and Williams, J.F., 1979; Loyd, S., 1979; Rickard, M.D., et al, 1981).

Se han hecho una gran cantidad de trabajos con antígenos de ES obtenidos *in vitro* de nemátodos, tremátodos y céstodos; los antígenos de ES proveen una estimulación antigénica que genera una respuesta inmune protectora en el hospedero, expresada como muerte o expulsión del parásito o el desarrollo de inmunidad concomitante (Lightowers, M.W. and Rickard, M.D., 1988). Alternativamente, con estos productos de ES el parásito puede evadir la respuesta inmune del hospedero mediante múltiples mecanismos (Scott, P.A. and Sher, A., 1993). Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados están enfocados al estudio del estado larvario del parásito, pero evidencias recientes sugieren que el estadio adulto intestinal de varios céstodos también son capaces de estimular la respuesta inmune local y sistémica (Williams, J., 1979).

Actualmente, los estudios sobre la inmunología del tracto intestinal está recibiendo mucha atención, ya que la estimulación antigénica en el caso de los parásitos intestinales se puede llevar a cabo a este nivel. Muchos de los estudios que se conocen se han originado de los modelos experimentales de ratas y ratones infectados con *Hymenolepis*

diminuta principalmente, en estos modelos se han encontrado anticuerpos específicos circulantes que tienen un papel importante en el rechazo de infecciones secundarias con *H. diminuta* (Harris, W.G., and Turton, J.A., 1972; Befus, 1974, 1975; Hopkins, et al, 1980). También se ha visto la participación de inmunoglobulinas del hospedero y factores del complemento adheridos a la superficie tegumental del parásito adulto (Befus, D., 1977), que se cree que tienen un papel importante en la expulsión y en la eliminación temprana de los parásitos en infecciones sucesivas. Los estudios inmunológicos en los modelos rata/ratón para *H. diminuta* han sido muy útiles para averiguar el papel de la respuesta inmune en la relación hospedero-parásito, la rata hospedero natural para este céstodo puede albergar al parásito en el intestino hasta su estado adulto en forma persistente, detectándose inmunoglobulinas en suero y sobre la superficie del céstodo, aunque su papel protector no está claro. El rechazo del parásito que puede presentarse en la rata es debido primordialmente a la carga parasitaria (Rickard, M.D., 1983).

En el ratón infectado con *H. diminuta* el parásito es expulsado rápidamente sin llegar a su madurez sexual desde una primoinfección, y en infecciones sucesivas el tiempo de rechazo se acorta, detectándose inmunoglobulinas de clase IgG, IgA e IgM; en este modelo se ha encontrado una relación más estrecha entre la expulsión del parásito y la respuesta inmune, puesto que los ratones atímicos no son capaces de rechazar la infección y cuando estos mismos son reconstituidos con timocitos los animales restablecen su capacidad para rechazar al parásito (Rickard, M.D., 1983).

Las investigaciones que se han hecho con *E. granulosus*, han demostrado que los antígenos de ES obtenidos *in vitro* son capaces de generar una respuesta inmune

protectora en perros, ocurriendo así la estimulación antigénica a nivel intestinal (Herd, R.P., et al, 1975), además con estos antígenos puede realizarse una prueba serodiagnóstica altamente específica (Heath, D.D., et al, 1985).

Por otra parte, en los animales inmunosuprimidos la relación hospedero-parásito se ve alterada de tal manera que se obtiene una mayor carga parasitaria comparada con aquellos animales inmunológicamente normales, este fenómeno ha sido demostrado en ratones infectados con *H. nana* y en hámsteres con *T. solium* o *T. crassiceps* (Verster, 1971, 1974; Sato and Kamiya, 1989; Avila, G., 1992; Aguilar, L., 1995).

7.3 Respuesta inmune en la mucosa intestinal

En los últimos años los estudios de la respuesta inmune asociada a mucosas han aumentado considerablemente, en forma particular la mucosa intestinal ha llamado más la atención debido al número elevado de microorganismos infecciosos que tiene su entrada por la vía oral y al potencial que tiene como barrera física e inmunológica que ofrece el intestino; por lo tanto, es de suma importancia conocer los mecanismos inmunológicos que se llevan a cabo en la mucosa intestinal cuando es estimulada por los exoantígenos liberados por parásitos intestinales.

La generación de una respuesta inmune en el tracto gastrointestinal involucra estructuras compartimentalizadas, cuya población celular caracteriza sus funciones en la respuesta inmune local. En primer lugar se menciona a los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), el cual incluye a las placas de Peyer, los nódulos linfoides y al apéndice; y también se tiene a la lámina propia y los leucocitos intraepiteliales (Befus, D. 1993).

Tejidos linfoides asociados al intestino.

Sobre las placas de Peyer, el epitelio especializado de estos sitios se encarga de la inducción de la respuesta inmune y difiere dramáticamente del epitelio del resto de la mucosa; contiene un tipo único de células, las células M, que carecen del borde típico en cepillo de los enterocitos y continuamente endocitan material del lumen. La arquitectura de estas células es notable, su membrana basolateral está profundamente invaginada para formar una gran bolsa intraepitelial que generalmente contiene una agrupación de linfocitos T, B y macrófagos, su membrana apical contiene numerosas vesículas membranosas que se encargan de endocitar el material del lumen intestinal, está muy cercana a la membrana basolateral debido a la invaginación lo cual permite una rápida endocitosis y el reparto del material en las vesículas intraepiteliales, donde el antígeno fagocitado es procesado. El paso de antígenos por las células M parece ser un requisito para montar una respuesta inmune en la mucosa (Neutra, M.R., et al, 1987; Neutra, M.R. and Kraehenbuhl, J.P., 1992), a la fecha no ha sido encontrada relación alguna entre estas células y cualquier helminto intestinal, sin embargo, pueden proveer alguna señal física o química que el helminto intestinal utiliza para sobrevivir y convivir con su hospedero (Befus, D., 1995). Existen otras vías importantes de captura de antígenos en las células epiteliales, la vía paracelular y la vía transcelular a través de células epiteliales, dado que es realmente desconocido el mecanismo por el cual actúan estas últimas vías, se considera la captura de antígenos por las células M la vía más importante (Befus, D., 1995).

En la superficie de las placas de Peyer se encuentran grandes cantidades de linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B, y las células M, bajo este linfoepitelio inductivo de IgA, hay un sitio de rápida proliferación de células B y células de muerte programada.

En el GALT se lleva a cabo la inducción de la respuesta inmune, así como hiporespuestas específicas que dan lugar a la llamada tolerancia oral. La respuesta de anticuerpos en las mucosas se lleva a cabo en las placas de Peyer que incluye una respuesta notable de IgA en su forma polimérica, aunque no es la única inmunoglobulina producida en esta zona, otras clases de anticuerpos que también se presentan en las secreciones en diferentes concentraciones son la IgM, IgG e IgE. La IgG es sintetizada principalmente en los tejidos linfoides periféricos, puede ser transportada al intestino por un proceso de trasudación o difusión directa a través de la superficie epitelial, se sabe que cuando hay inflamación en el tracto gastrointestinal se incrementan las cantidades de IgG local.

Una vez hecha la activación en los sitios precursores en las placas de Peyer, la maduración de las células inducidas se lleva a cabo fuera de la mucosa intestinal; los linfoblastos se dirigen a los nódulos linfáticos mesentéricos, de ahí al ducto linfático torácico y a la circulación sistémica, donde circulan como células maduras que tendrán como destino final las superficies epiteliales, particularmente la lámina propia del intestino delgado (Walker, W.A. and Isselbacher, K.J., 1977; Hanson, L.A., et al, 1983).

Lámina Propia.

En contraste con el medio ambiente inductor de Placas de Peyer, la lámina propia es referida como un sitio efector, contiene un gran número de células plasmáticas productoras de IgA, así como linfocitos T (con sus correspondientes linfocinas) CD4+ y CD8+, macrófagos, células cebadas, eosinófilos y neutrófilos (Befus, D., 1995).

Leucocitos intraepiteliales

Hay múltiples componentes celulares en el sistema inmune de las mucosas, muchas de

estas células son únicas o parecen ser especialmente adaptadas al medio ambiente de las mucosas. Las células circulan a lo largo de todo el cuerpo y pueden ser reclutadas cuando se presenta la señal de la presencia de gérmenes, un proceso inflamatorio u otro estímulo (Befus, D., 1995).

La población de leucocitos es muy heterogénea y en el humano se conoce parcialmente, sin embargo, se sabe que es muy parecida al reportado en el modelo murino; la mayoría de las células que se encuentran en esta zona son linfocitos T. En humanos el 90% de los linfocitos son CD8+ y aproximadamente 10% son CD4+, aproximadamente el 70% de estos son TCR alfa/beta y 27% son TCR gama/delta, de los linfocitos CD8+ el 63% son homodímeros CD8 alfa/alfa y 37% son heterodímeros CD8 alfa/beta. Se sugiere que la estimulación antigénica es importante en la expresión de células Thy1+, CD4+ y alfa/beta+, pero la expresión de CD8+, CD3+ y TCR gama/delta es relativamente independiente del antígeno (Befus, A.D., 1986, 1993, 1995). Otras células presentes son las células cebadas, células NK y precursores de células T.

Como se menciona anteriormente en la mucosa intestinal se genera una respuesta inmune contra los parásitos intestinales, que puede medirse mediante la detección de anticuerpos en los contenidos intestinales y en forma particular por coproanticuerpos. Desde hace ya varios años se ha investigado la presencia de anticuerpos en la materia fecal en infecciones bacterianas, virales y parasitarias a nivel intestinal, con el objeto de conocer el papel de la respuesta inmune en este nivel y establecer su desarrollo en el rechazo a infecciones intestinales, así como el inicio de un nuevo campo de estudio para la creación de vacunas orales.

En parasitosis se han detectado coproanticuerpos en pacientes con ambiosis intestinal

aguda, sin embargo los títulos encontrados no difieren de aquellos registrados en pacientes sanos, siendo las inmunoglobulinas IgA e IgM las más frecuentemente encontradas (Ximénez, C., et al, 1990).

Múltiples estudios se han hecho para caracterizar la respuesta de coproanticuerpos contra *Cryptosporidium sp.* tanto en modelos experimentales como en infecciones naturales. Se han detectado anticuerpos de clase IgA e IgM anti *Cryptosporidium sp.* en heces de pacientes con SIDA e infectados con criptosporidiosis, sin embargo, no se ha establecido aun su actividad protectora (Kapel, N., et al, 1993). Un caso similar se ha reportado en becerros infectados con *Cryptosporidium parvum* tanto en infecciones naturales como experimentales, en donde el incremento en los niveles de coproanticuerpos IgA e IgM, (principalmente la primera) y de IgG en suero coincidieron con la expulsión de ooquistes en heces (Hill, B.D., et al, 1990; Peeters, J.E., et al, 1992).

En los modelos experimentales de *Haemonchus contortus* y *Nippostrongylus brasiliensis* también se han detectado anticuerpos en heces principalmente inmunoglobulinas de clase IgA, tanto en animales vacunados como infectados experimentalmente (Wedrychowicz, H., 1984).

El modelo experimental de *Giardia muris* en el ratón ha sido muy estudiado debido a que el comportamiento de la infección es muy parecido al de *G. duodenalis* (*G. lamblia*) en el hombre, este parásito es rechazado inmunológicamente del intestino del ratón normal, pero en ratones deficientes de linfocitos T se crea una infección crónica. Los resultados de estos modelos sugieren que en ratones normales el rechazo del parásito del intestino está relacionado con la presencia de inmunoglobulinas específicas (IgA e IgG),

encontradas como coproanticuerpos solubles y sobre la superficie de trofozoitos obtenidos de materia fecal de ratones normales infectados (Anders, R.F., et al, 1982; Snider, D.P. and Underdown, B.J., 1986; Heyworth, N., 1986).

Las detecciones de coproanticuerpos en seres humanos se han enfocado principalmente a infecciones virales causados por rotavirus en pacientes pediátricos (Oshijima, H., et al, 1989). También se han estudiado algunas otras alteraciones del tracto intestinal, donde la inmunoglobulina de clase IgA es la más abundante, aunque en padecimientos como colitis ulcerativa la IgG llega a ser la más abundante (Haneberg, B. and Aarskog, D., 1975).

III METODOLOGIA

1. MODELO EXPERIMENTAL DE *Taenia solium* EN EL HAMSTER DORADO

Se realizó una infección experimental en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) siguiendo el procedimiento descrito por Verster (1971), con algunas modificaciones. Se emplearon 32 hámsteres, cinco machos y 27 hembras de 7 a 12 meses de edad, provenientes de los bioterios del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Los animales se mantuvieron en el bioterio a una temperatura de 20°C y con una humedad de 45%, estos parámetros ambientales se mantuvieron constantes durante el tiempo que duró el experimento. Desde el principio del estudio los hámsteres permanecieron en jaulas individuales con camas de aserrín estéril, se les proporcionó alimento comercial balanceado para roedores y agua estéril *ad libitum* durante el período de estudio. Previamente a la infección, los animales se desparasitaron con praziquantel en una dosis de 30mg/kg de peso por vía oral.

1.1 Obtención de cisticercos de *T. solium*.

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron de un cerdo infectado naturalmente proveniente de Tepeaca, en el estado de Puebla. Los cisticercos se extrajeron por disección del músculo esquelético; una parte de ellos fueron utilizados para la infección de los animales y los restantes se emplearon para verificar su viabilidad, sometiéndolos a la prueba de evaginación *in vitro* descrita por Correa, et al (1987). En ambos casos los cisticercos fueron desprovistos de su vesícula y mantenidos en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) hasta su uso posterior.

1.2 Grupos experimentales y protocolo de infección.

Al inicio del trabajo se tuvieron problemas para la obtención de un grupo de hámsteres con las mismas características de edad y sexo en el momento en el que se consiguió el cerdo parasitado; por esta razón se infectaron animales de diferentes lotes e incluso se empleó un grupo de machos que habían sido utilizados previamente en protocolos de inmunización. Los animales se dividieron en tres grupos, el primero quedó integrado por cuatro hembras de 12 meses de edad procedentes del bioterio del IIB, estos animales se infectaron y no fueron inmunosuprimidos. El segundo grupo lo formaron 23 hembras de siete meses de edad obtenidos del bioterio del CINVESTAV, estos hámsteres fueron infectados e inmunosuprimidos. El tercer grupo de animales estuvo integrado por cinco machos de 12 meses de edad procedentes del bioterio del IIB, los cuales sólo fueron inmunosuprimidos (Cuadro No. 1), cabe señalar que los animales de este grupo fueron inmunizados cuatro meses antes del inicio del experimento con extracto crudo de *T. solium*.

Los animales de los grupos I y II fueron infectados por vía oral con cuatro cisticercos de *T. solium*. Mediante pinzas de disección se les administraron los cisticercos en el hocico de cada hámster, a los cuáles se les había mantenido sin comer un día antes, por último se comprobó la deglución de los parásitos. Los hámsteres que fueron inmunosuprimidos (grupos II y III) recibieron una dosis de 2 mg del esteroide acetato de metilprednisolona por vía intramuscular en el día uno del experimento, esta misma dosis se les aplicó cada dos semanas durante las siguientes diez semanas post-infección (SPI).

Cuadro No. 1: Grupos experimentales

GRUPO	ANIMAL	SEXO	CIST. n	DOSIS DE ESTEROIDE	TIEMPO DE * EXPER.
GRUPO I	4	HEMBRAS	4	0	13SPI
GRUPO II	23	HEMBRAS	4	2mg/14 días	19SPI
GRUPO III	5	MACHOS	4	2mg/14 días	17SPI

*Tiempo de experimentación en el cual se sacrificó el último animal de cada grupo.

n Número

0 acetato de metilprednisolona

SPi semanas post-infección.

CIST Cisticercos

1.3 Colección de muestras biológicas.

Se tomaron muestras de suero y heces de cada animal semanalmente, antes de la infección y posterior a ésta, hasta que los hámsteres perdieron la infección.

1.4 Obtención del estadio adulto de *T. solium*

Las taenias adultas fueron obtenidas de los animales de los grupos I y II, cada 21 días se sacrificó un hámster de cada grupo mediante la inhalación de éter; asimismo, cuando el estado físico y de salud de los animales estaba muy disminuido se procedió a sacrificar a los hámsteres. Se realizó la necropsia de los animales, se extrajo el intestino delgado que se colocó en una caja petri que contenía SSAF, se abrió a todo lo largo para liberar a las taenias y verificar que no estuvieran parasitados con otros géneros. Se obtuvieron los parásitos y se procedió a su identificación mediante la observación de las características morfológicas de *T. solium* que consisten en un escólex provisto de cuatro

ventosas musculares inermes, la presencia de un rostelo armado con una doble corona de ganchos y la disposición del poro genital irregularmente alternado en proglótidos sucesivos.

También se verificó el desarrollo sexual de *T. solium* por medio de la observación de los órganos reproductores en preparaciones fijas. Cuando las taenias que se colectaron estaban vivas se procedió a cultivarlas para obtener antígeno de excreción-secreción (ES). Las taenias muertas fueron empleadas para la revisión morfológica y para la obtención de antígeno crudo o somático.

1.5 ELISA para la detección de coproantígenos de *T. solium*.

Se hizo el seguimiento de la taeniosis por medio del ELISA para coproantígenos de *T. solium* descrito por Allan, et al (1990) y Avila (1992), en el cual se utilizan anticuerpos policlonales producidos en conejo contra antígeno somático de *T. solium* (Figura No. 1).

a. Preparación de las muestras.

Las muestras de heces de los hámsteres fueron rehidratadas con solución salina amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20 a una concentración de 0.3% (SSAF-Tw 0.3%), en una proporción volumen a volumen, se homogeneizaron y centrifugaron a 3000rpm durante 25 minutos a 4°C. Se colectaron los sobrenadantes, se almacenaron en alícuotas de 1.5ml a -20°C hasta el momento de su uso.

b. ELISA para coproantígenos de *T. solium*.

1. Se utilizó una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano MaxiSorp F96 (NUNC 439454) la cual fue sensibilizada con el primer anticuerpo policlonal anti-*T. solium* (IgG de conejo) a una concentración de 9µg/ml de proteína, en solución amortiguadora de

carbonatos, pH 9.6, se agregaron 100µl de la solución por pozo y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C.

2. Se realizaron tres lavados sucesivos con SSAF-Tw 0.3% y se adicionaron 200µl por pozo; cada lavado se hizo durante cinco minutos.

3. Se bloqueó la placa con SSAF-Tw 0.3%, se cubrió cada pozo con 100µl durante una hora a temperatura ambiente.

4. Adición de la muestra problema. Se colocan 100µl por pozo de los sobrenadantes de heces por duplicado. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora.

5. Se repitió el inciso 2.

6. Para revelar la reacción antígeno anticuerpo se adicionó el mismo anticuerpo policlonal IgG anti-*T.solium* marcado con peroxidasa, a una concentración de 9µg/ml en SSAF-Tw 0.3%, se colocaron 100µl por pozo. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora.

7. Se repitió el inciso 2.

8. Por último se agregó el sustrato ácido 5 amino salicilico en solución de fostato de sodio monobásico y dibásico (0.01M) y EDTA (0.01M), conteniendo peróxido de hidrógeno, se adicionaron 100µl por pozo de esta solución y se incubó durante siete minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

9. Los valores de absorbancia se midieron en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 2550) a 450nm.

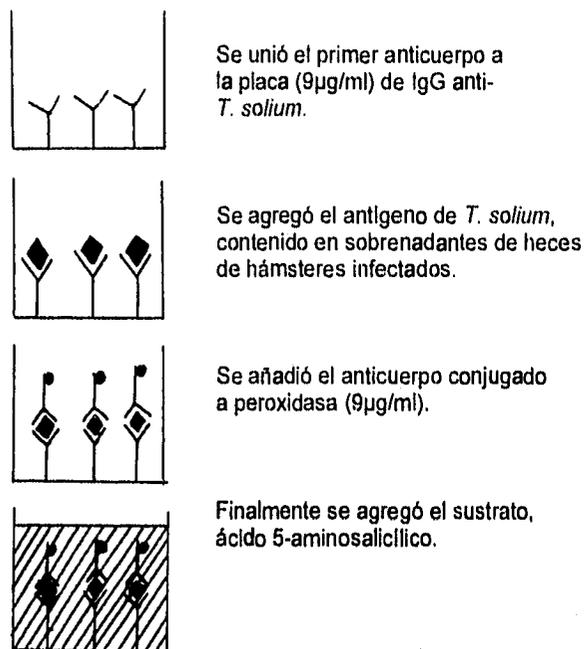


Figura No. 1 Diagrama que ilustra el ELISA para coproantígenos de *T. solium*.

Se utilizaron como controles negativos en cada placa aquellas muestras provenientes de los animales del grupo III no infectado o las obtenidas antes de la infección. En un principio se usó como control positivo antígeno somático de *T. solium* a concentraciones de 0.1, 1, 10 μ g/ml, y una vez comprobada la presencia del parásito a la necropsia de algunos animales, se usaron los sobrenadantes de heces de estos hámsteres infectados.

1.6 Tamizados de heces para la obtención de proglótidos.

Se buscaron proglótidos de *T. solium* en las heces de los hámsteres infectados para comprobar la expulsión de la *Taenia*. El sedimento de las muestras hidratadas fué resuspendido con agua corriente y pasado a través de un tamiz. Las heces se limpiaron

con agua en el tamiz y macroscópicamente fueron observados los proglótidos sobre la malla del mismo. Después fueron recolectados y observados en el microscopio estereoscópico para comprobar su naturaleza. Aquellas estructuras que correspondían realmente a proglótidos, se colectaron y tñieron para su identificación morfológica.

1.7 Tinción de parásitos.

Tanto las taenias, como los proglótidos colectadas de las heces fueron teñidos con la técnica de para-carmin de Mayer. Cada uno de los especímenes fueron colocados entre dos portaobjetos y presionados entre sí y se mantuvieron en alcohol al 70% hasta su tinción.

Técnica de para-carmin de Mayer

- a.** Lavar las taenias con alcohol al 96% durante 10 minutos.
- b.** Teñir con para-carmin de Mayer durante 8-10 minutos.
- c.** Lavar en alcohol al 96% acidulado al 2% con HCl, hasta que los bordes del ejemplar se observen pálidos y los órganos internos fueron visibles al microscopio.
- d.** Lavar en alcohol al 96% durante 1-2 minutos para detener la acción del HCl.
- e.** Deshidratar en alcohol al 100% durante 20-25 minutos.
- f.** Aclarar en salicilato de metilo.
- g.** Montar en bálsamo de Canadá y etiquetar las preparaciones.

2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN EL MODELO EXPERIMENTAL.

2.1 Obtención de sueros.

Los hámsteres fueron sangrados del plexo retro orbital previa anestesia general en una cámara de éter. Se realizó la punción con un tubo capilar y se extrajeron 1.5ml de sangre por animal, se procedió a separar el suero que se almacenó en tubos tipo Eppendorf a -20°C. Para evitar infecciones en los ojos de los animales se les administraron gotas de cloranfenicol después del sangrado.

2.2 Obtención del antígeno de Excreción-Secreción (ES) de *T. solium*

Las taenias vivas se lavaron con SSAF para quitar cualquier resto de contenido intestinal, se realizaron cinco lavados con duración de cinco minutos cada uno. Después se lavaron con SSAF estéril tres veces durante 10 minutos en cada ocasión, se continuaron los lavados con SSAF estéril adicionado de antibióticos (10 000 U/ml penicilina G sódica, 10 000µg/ml sulfato de estreptomina, 25µg/ml anfotericina B como fungicida) tres veces en intervalos de dos minutos en cada lavado. Posteriormente los parásitos se colocaron en medio de cultivo, que consistió en medio de RPMI (GIFCO) no suplementado (10.4g del medio sólido disueltos en un litro de agua destilada-desionizada) al que se le agregó 2g de bicarbonato de sodio y 2g HEPES; se ajustó el pH a 6.8 y se esterilizó con filtros de 0.22µm. Al medio de RPMI se le agregó 10 000 U/ml de penicilina G sódica, 10 000 µg/ml de sulfato de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina B como fungicida. Los parásitos de 15-30cm de largo se colocaron en 5-10ml del medio, se mantuvieron en botellas de cultivo celular estériles a temperatura de 37°C y 7% de CO₂.

El medio se cosechó cuando viró a amarillo, aproximadamente a las 24 horas. Se cultivaron las taenias completas o solamente los estróbilos que tenían movimiento. El medio cosechado fué concentrado 10 veces a través de una membrana de ultrafiltración a presión positiva máxima de 5.3kg/cm² (AMICON INC DIAFLO) con un diámetro de poro para paso de sustancias con 10KD, enseguida se agregó p-hidroximercuribenzoato (PHMB) como inhibidor de proteasas a una concentración final del 0.04% y se almacenó a -20°C.

2.3 Obtención del antígeno crudo o somático de *T. solium*

Se preparó un extracto crudo de taenias adultas completas según la técnica descrita por Espinoza, et al (1982) con ligeras modificaciones; las taenias adultas obtenidas del intestino delgado de los hámsteres se lavaron cinco veces con solución salina fisiológica (0.15M NaCl, SSF) y se homogeneizaron con un Polytron (Brinkman Instruments) en SSF conteniendo cloruro de potasio 3M durante 1 minuto, manteniendo el extracto en un baño de hielo. Este procedimiento se repitió hasta que los parásitos quedaron perfectamente homogeneizados. El extracto se mantuvo durante toda la noche en agitación ligera a 4°C; posteriormente se centrifugó (Sorvall RT6000) a 2000g durante 30 minutos a 4°C, se dializó contra SSAF y se volvió a centrifugar (Beckman J2-21) a 24000g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.4 Determinación de proteínas.

A la solución antigénica final se le determinó su concentración proteica por el método de Lowry (1951) y se ajustó a una concentración de 2.5mg/ml antes de ser utilizada para forrar las placas de ELISA.

2.5 Estandarización del ELISA para anticuerpos séricos de clase IgG.

Se estandarizó un ELISA directo para detectar anticuerpos circulantes de clase IgG específicos para *T. solium* en animales infectados. Para ello se adsorbió en la superficie sólida de una placa de 96 pozos, antígeno de *T. solium* y como sistema revelador se utilizó un anticuerpo comercial policlonal anti-IgG de hámster conjugado a peroxidasa.

- a. Sensibilización de la placa de ELISA con el antígeno de ES y somático de *T. solium*. Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano Inmunolon 2, el antígeno de ES y somático de *T. solium* se agregó a concentraciones de 40, 20 y 10µg/ml en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6, se colocaron 100µl por pozo de la solución y se incubó toda la noche a 4°C.
- b. Se realizaron tres lavados sucesivos de la placa con 200µl de SSAF-Tw 0.3%, cada uno durante cinco minutos.
- c. Se bloqueó la placa con 100µl de una solución de albúmina sérica bovina al 1% en SSAF-Tw 0.1%.
- d. Se repitió el inciso b.
- e. Adición de las muestras. Se agregaron 100µl de los sueros diluidos 100, 200 y 300 veces en SSAF-Tw 0.3% por duplicado. Se incubó la placa a 37°C durante una hora.
- f. Se realizaron cuatro lavados con 200µl de SSAF-Tw 0.3% de 5 minutos cada uno.
- g. Se agregó el conjugado anti-IgG de hamster marcado con peroxidasa (KPL, Affinity purified antibody, goat anti-hamster IgG (H+L)) diluido 1:1000 en SSAF-Tw 0.3%, se adicionaron 100µl por pozo y se incubó durante una hora a 37°C.
- h. Se repitió el inciso f.

I. Se utilizó como sustrato o-fenilendiamina en amortiguador de citratos (0.1M), pH 4.5 conteniendo 0.4µl/ml de peróxido de hidrógeno al 30%; se adicionaron 100µl por pozo y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, posteriormente se detuvo la reacción al agregar 50µl por pozo de ácido sulfúrico 2N.

J. Los valores de absorbancia se midieron en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 2550) a 492nm.

Durante la estandarización de la técnica se usaron como controles negativos los sueros de los animales del grupo II antes de la infección, así como pozos no sensibilizados con el antígeno que contenían muestras de sueros. Como controles positivos en cada placa se utilizaron los sueros de los animales del grupo III, los cuales estaban inmunizados con antígeno somático de *T. solium*; además se probó en algunos pozos el antígeno unido al anticuerpo policlonal anti-*T. solium* utilizado en la detección de coproantígenos, revelando este sistema con un conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa. Finalmente, para probar la presencia de cualquier unión inespecífica por parte del conjugado anti-IgG de hámster, se probaron pozos en presencia y ausencia del antígeno sin muestra alguna de suero y se agregó directamente el conjugado.

2.6 Estandarización del ELISA para coproanticuerpos.

Con el mismo fundamento del ELISA para la detección de anticuerpos séricos de clase IgG se procedió a la detección de anticuerpos de esta misma clase en heces de hámsteres infectados. Usando tan sólo como fuente antigénica el antígeno de ES de *T. solium*.

a. Sensibilización de la placa de ELISA con el antígeno de ES de *T. solium*. Se utilizaron

placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano MaxiSorp F96 (NUNC 439454) que se sensibilizaron con antígeno de ES de *T. solium* a concentraciones de 10, 20 y 40µg/ml en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6, se agregaron 100µl por pozo de la solución y se incubó durante toda la noche a 4°C.

b. Se realizaron tres lavados sucesivos de la placa con 200µl de SSAF-Tw 0.3%, cada uno de cinco minutos.

c. Se llevó a cabo el bloqueo de la placa con SSAF-Tw 0.3%, se adicionaron 100µl por pozo, se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

d. Se agregaron los sobrenadantes de heces, se colocaron 50µl por pozo por duplicado y se incubó a 37°C durante una hora.

e. Se realizaron cuatro lavados con 200µl de SSAF-Tw 0.3% de cinco minutos cada uno.

f. Se agregó el conjugado anti-IgG de hámster marcado con peroxidasa (KPL, Affinity purified antibody, goat anti-hamster IgG (H+L)) diluido 1:1000 en SSAF-Tw 0.3%, se adicionaron 100µl por pozo y se incubó la placa durante una hora a 37°C.

g. Se repitió el inciso e.

h. Se utilizó como sustrato o-fenilendiamina en amortiguador de citratos (0.1M) pH 4.5 conteniendo 0.4µl/ml de peróxido de hidrógeno al 30%, se adicionaron 100µl por pozo y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, posteriormente se detuvo la reacción al agregar 50µl por pozo de ácido sulfúrico 2N.

i. Los valores de absorbancia se midieron en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 2550) a 492nm.

El control positivo en las placas fué el antígeno unido al anticuerpo policlonal anti-T.

solium de conejo, revelado con el conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa. Como controles negativos fueron tomadas todas las muestras de heces colectadas antes de la infección, así como pozos no sensibilizados con el antígeno pero que contenían sobrenadantes de heces, revelado con el conjugado anti-IgG de hámster. Finalmente para probar la presencia de cualquier unión inespecífica por parte del conjugado anti-IgG de hámster, se probaron pozos en presencia y ausencia del antígeno, sin muestra alguna de heces y se agregó directamente el conjugado.

2.7 Estandarización del ELISA para antígenos séricos.

Tomando en cuenta la técnica de coproantígenos, se procedió a estandarizar un ELISA para la detección de antígenos séricos. Al igual que en la técnica anterior se trata de un ELISA de captura, que se basa en el empleo de un anticuerpo policlonal anti-*T. solium* producido en conejo usado como anticuerpo primario que se adsorbe a la placa; y el mismo anticuerpo policlonal conjugado a peroxidasa se usa para revelar la reacción como anticuerpo secundario.

a. Se probaron dos placas de ELISA para microtitulación de 96 pozos de fondo plano de las marcas MaxiSorp e Immunolon 2, las cuales fueron sensibilizadas con 9µg/ml del anticuerpo primario IgG anti-*T. solium* de conejo en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6, se agregaron 100µl por pozo de la solución. Se incubó durante toda la noche a 4°C.

b. Se lavó tres veces la placa con 200µl por pozo de SSAF-Tw 0.3%, cada lavado fué de cinco minutos.

c. Se bloqueó la placa con 100µl por pozo de SSAF-Tw 0.3%, durante una hora a

temperatura ambiente.

d. Se agregaron 100µl por pozo de los sueros diluidos 2, 3, 4, 50 y 100 veces, y se incubó a 37°C durante una hora.

e. Se lavó la placa cuatro veces con intervalos de cinco minutos cada lavado, con 200µl de SSAF- Tw 0.3%.

f. Posteriormente se agregó el mismo anticuerpo policlonal IgG anti-*T. solium* marcado con peroxidasa a una concentración de 9µg/ml en SSAF-Tw 0.3%, se adicionaron 100µl por pozo. Se incubó a 37°C durante una hora.

g. Se repitió el inciso e.

h. Se utilizó como sustrato o-fenilendiamina en amortiguador de citratos (0.1M) pH 4.5 conteniendo 0.4µl/ml de peróxido de hidrógeno al 30%, se adicionaron 100µl por pozo y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente en la obscuridad, posteriormente se detuvo la reacción al agregar 50µl por pozo de ácido sulfúrico 2N.

i. Los valores de absorbancia se midieron en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 2550) a 492nm. Como control positivo se utilizó antígeno somático de *T. solium* a concentraciones de 10, 1 y 0.1µg/ml en SSAF-Tw 0.1%. Como control negativo se utilizaron todos los sueros de los animales antes de la infección

3 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en la reproducción del modelo experimental y en el tamaño y número de las taenias recuperadas, se organizaron y resumieron por medio de técnicas estadísticas descriptivas (Daniel, W.W., 1987). La evaluación de las técnicas de ELISA

desarrolladas se realizaron siguiendo los procedimientos descritos por Schwabe, et al (1977).

El criterio de positividad para una muestra individual se determinó cuando su valor de absorbancia sobrepasó el punto de corte del ensayo. Este consistió en el promedio de todas las absorbancias de las muestras de los animales antes de la infección, así como las del grupo control no infectado, más tres desviaciones estándar. Los resultados del ELISA obtenidos en los diferentes grupos experimentales se analizaron por medio del análisis de regresión lineal simple (Daniel, W.W., 1977).

IV RESULTADOS

1. MODELO EXPERIMENTAL DE *T. solium* EN EL HAMSTER DORADO.

1.1 Viabilidad de cisticercos de *T. solium*.

Se revisó la viabilidad de los cisticercos utilizados en la infección, éstos tuvieron un 91% de evaginación; de 40 cisticercos colocados en medio de cultivo RPMI y bilis de cerdo, 36 evaginaron a las 12 horas.

1.2 Grupos experimentales y protocolo de infección

La taeniosis en los hámsteres se comprobó mediante el ELISA para coproantígenos de *T. solium*, por la presencia de proglótidos de *Taenia* en tamizados de heces o por medio de la recuperación de los parásitos a la necropsia de los animales. *T. solium* logró infectar al 100% de los animales, todos los ejemplares que se colectaron se localizaron en el primer tercio del intestino delgado del hámster y presentaron las siguientes características morfológicas: escólex armado con una doble corona de ganchos y cuatro ventosas musculares inermes; en el estróbilo se observaron los poros genitales irregularmente alternados en proglótidos sucesivos, estas características corresponden a las reportados para *T. solium* obtenida del ser humano. Ninguno de los hámsteres estuvo infectado con otros géneros y especies de parásitos (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Recuperación de *T. solium* en el hámster dorado

GRUPO SEXO	ANIMAL No. ¹	CIST. ² No.	ESTEROIDE* DOSIS No.	ANIMALES CON TAENIA A LA NECROPSIA		MOR- TALI- DAD %
				No.	%	
I ♀	4	4	0 0	2	50	0
II ♀	23	4	2mg 6	14	61.4	40
III ♂	5	0	2mg 6	0	0	40

*El esteroide (acetato de metilprednisolona) se aplicó cada 15 días.

1 Número.

2 Cisticercos.

1.3 Obtención del estado adulto.

Todos los animales a los cuales se les administraron los cisticercos (grupos I y II) resultaron infectados con *T. solium*. En los animales del grupo I no inmunosuprimido se recuperaron taenias en el 50% de los animales, los demás perdieron la infección durante el experimento. De los cuatro cisticercos administrados a cada animal, sólo se logró recuperar una *Taenia* en los animales sacrificados a la sexta y novena semana post-infección (SPI); los otros hámsteres fueron positivos en el ELISA para antígenos de *T. solium* desde la primera SPI y hasta la décima SPI cuando los animales eliminaron a la *Taenia*. Las dos taenias recuperadas de este grupo presentaron el mayor desarrollo sexual y fueron las más largas en comparación con el resto de los parásitos obtenidos en ambos grupos de animales infectados. Los hámsteres de este grupo que estuvieron parasitados fueron sacrificados bajo el protocolo de necropsias de un animal por grupo

cada 21 días. La *Taenia* recuperada a la sexta SPI midió 49cm de largo por 8mm de ancho y se albergaba solamente en el intestino delgado del hámster, al momento que se extrajo estaba contraída. En cuanto al desarrollo sexual de esta *Taenia*, presentaba proglótidos maduros con útero ramificado (cinco ramas por lado) y huevos en proceso de formación, poro genital y ovarios muy prominentes. La *Taenia* obtenida a la novena SPI midió 82cm de largo por 5mm de ancho, con menor desarrollo de las ramas uterinas en comparación con la anterior, el poro genital y los ovarios presentaron el mismo desarrollo (Figura No. 2). El resto de las hembras se sabía que estaban infectadas por los valores obtenidos mediante los coproantígenos, sin embargo, se realizó la necropsia hasta tres semanas después de la eliminación de las taenias (Cuadro No. 4), a las 13 SPI. En este grupo no se observó mortalidad debida a la infección por *T. solium* ni por infecciones secundarias.

Cuadro No. 4 Características morfológicas de las taenias recuperadas de los hámsteres del Grupo I: no inmunosuprimido.

ANIMAL SEXO	SPI	TAENIAS	TAMAÑO(cm) LARGO X ANCHO	DESARROLLO
♀1	6	1	49x0.8	Proglótidos maduros. Útero ramificado con 5 ramas laterales.
♀2	9	1	82x0.5	Proglótidos maduros. Útero ramificado.

SPI semanas post-infección.



Figura No. 2a. *Taenia solium* recuperada de un hámster del grupo I.

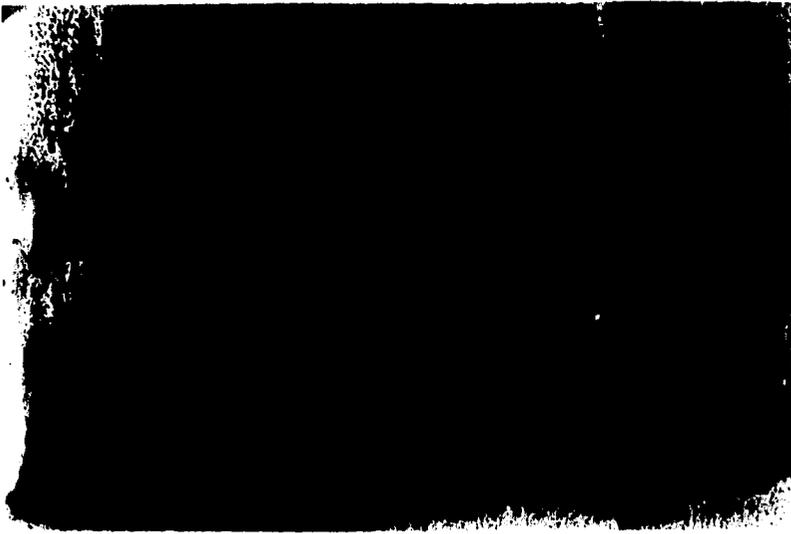


Figura No. 2 b. Proglótido maduro de *T. solium* extraída de un hámster del grupo I a la sexta SPI. Estructuras sexuales: útero ramificado (U), ramas uterinas (RU), poro genital (PG)

En los animales del grupo II que fueron inmunosuprimidos se recuperaron taenias en el 61.4% de los animales, de cuatro cisticercos administrados, se recuperaron de dos a cuatro taenias, la carga parasitaria por hámster en este grupo se distribuyó de la siguiente manera: del 61.4% de los animales de los cuales se recuperaron taenias, el 57% tuvo cuatro taenias, el 14.5% tuvo tres taenias y el 28.5% tuvo dos taenias, la carga parasitaria en estos animales fué mayor que la obtenida en el grupo I, de animales no inmunosuprimidos; estos datos muestran el efecto del esteroide sobre la carga parasitaria, ya que favorece una mayor implantación de las taenias. El desarrollo sexual y las dimensiones de las taenias recuperadas en este grupo fué comparativamente menor con las obtenidas en el grupo I. El máximo desarrollo se observó entre la cuarta y quinta SPI, tiempo en el cual ya no se observaron cambios importantes en el crecimiento de los parásitos. La *Taenia* de mayor tamaño encontrada fué de 38cm de largo por 3mm de ancho a la sexta SPI. Varias de las taenias recuperadas por animal tenían características similares entre sí, es decir, de las dos o cuatro taenias recuperadas de un sólo hámster éstas coincidían en tamaño y desarrollo sexual. Al respecto, se obtuvieron ejemplares con proglótidos maduros, sin útero ramificado, con poro genital prominente y en algunos de ellos se observó el cirro exteriorizado (Cuadro No.5, Figura No. 3).

Cuadro No 5. Características morfológicas de las taenias recuperadas de los hámsteres del grupo II: inmunosuprimido

ANIMAL	TAENIAS	SPI	TAMAÑO(cm) largoxancho	OBSERVACIONES
♀7	4	2	.2x0.2 2(.3x0.2) .4x0.2	Escólex y cuello presentes, estróbilo no perceptible
♀8	4	2	.5x0.2 2(.6x0.2) .8x0.2	Escólex y cuello presentes, estróbilo no perceptible
♀9	-----	3	-----	Sin necropsia.
♀19	4	3	10x0.2 11x0.2 5x0.2 8.5x0.2	Proglótidos inmaduros, primordios del poro genital.
♀26	3	3	3(12x0.2)	Proglótidos inmaduros, primordios de órganos sexuales.
♀27	4	3	9x0.2 10x0.2 2(13x0.2)	Proglótidos inmaduros, primordios de órganos sexuales.
♀29	2	3	5x0.2 8x0.2	Presencia de escólex y cuello.
♀32	-----	3	-----	Sin necropsia.

ANIMAL	TAENIAS	SPI	TAMAÑO largoxancho	OBSERVA- CIONES
♀30	3	3	-----	Las taenias recuperadas se encontraron fragmentadas y no se midieron.
♀11	4	4	20x0.3 21x0.3 23x0.3 Fragmentada	Proglótidos maduros. organos sexuales diferenciados.
♀34	2	6	36x0.4 30x0.3	Proglótidos maduros con órganos sexuales diferenciados.
♀10	4	6	24x0.3 26x0.3 33x0.3 34x0.3	Proglótidos maduros con órganos sexuales diferenciados.
♀23	2	8	38x0.2 38x0.2	Proglótidos maduros con órganos sexuales diferenciados.
♀22		9	-----	<i>Taenia</i> expulsada a la octava SPI.
♀33	4		25x0.3 30x0.3 32x0.3 30x0.3	Proglótidos maduros con órganos sexuales diferenciados.
♀25	4	11	24x0.4 28x0.4 26x0.4 24x0.4	Proglótidos maduros con órganos sexuales diferenciados.

ANIMAL	TAENIAS	SPI	TAMAÑO(cm) largoxancho	OBSERVA- CIONES
♀16	-----	12	-----	<i>Taenia</i> expulsada a la tercera SPI.
♀28	2	13	23x0.2 24x0.2	Proglótid ^{os} maduros con órganos sexuales diferenciados.
♀20	-----	14	-----	<i>Taenia</i> expulsada a la décima SPI.
♀14	-----	17	-----	<i>Taenia</i> expulsada a la tercera SPI.
♀17	-----	17	-----	<i>Taenia</i> expulsada a la sexta SPI.
♀21	-----	21	-----	<i>Taenia</i> expulsada a las 18 SPI.
♀24	-----	21	-----	<i>Taenia</i> expulsada a las 15 SPI.



Figura No. 3 Proglótido maduro de una *Taenia* recuperada de un hámster infectado, se observa el cirro exteriorizado (C), así como el poro genital (PG), los ovarios (OV), el útero (U), la bolsa del cirro (BC), testículos (T), ootipo (OO), glándula vitelina (GV), canal longitudinal excretor (CL), canal transversal (CT), vagina (VAG), conducto deferente (CD).

La infección en estos animales se mantuvo hasta las 17 SPI comprobado por coproantígenos, nuevamente la presencia del inmunosupresor favoreció considerablemente la permanencia de las taenias por un mayor tiempo en la mucosa intestinal del hámster.

El 40% de los animales de este grupo murió en el primer mes del experimento, debido primordialmente a infecciones ajenas causadas por la inmunosupresión, sin embargo, a estos animales se les realizó la necropsia para la obtención de los parásitos.

Hubo dos hámsteres a los cuales no se les pudo realizar la necropsia debido al mal

estado de los cadáveres. Cabe mencionar que hubo tres animales que perdieron la infección en los primeros 40 días, pero que se mantuvieron vivos para monitorear la respuesta inmune humoral.

La inmunosupresión de los animales de este grupo se suspendió a la décima SPI para permitir que los hámsteres eliminaran a la *Taenia* y estudiar la respuesta humoral.

La mortalidad registrada en el grupo III de animales inmunosuprimidos pero no infectados también fué del 40% en el primer mes del experimento, el último animal de este grupo se sacrificó a la 14 SPI; en ninguno de los hámsteres se encontraron parásitos en el intestino delgado.

1.4 ELISA para la detección de coproantígenos de *T. solium*

Se tomaron muestras de heces de los 32 hámsteres antes de la infección para determinar el punto de corte del ensayo y de esta manera diferenciar entre los animales con taeniosis y los no infectados, el valor del punto de corte fué de 0.17. Una vez que los hámsteres se infectaron se colectó material de cada animal en forma individual semanalmente y de esta manera hacer el seguimiento de la infección.

En el grupo I se detectaron coproantígenos de *Taenia* desde la primera semana de infección. La máxima densidad óptica (DO) se registró a la sexta y séptima SPI, después de este punto máximo los coproantígenos descienden casi linealmente hasta hacerse negativos después de la décima SPI, fecha en la cual sólo dos hámsteres estaban vivos (Figura No. 4). Los animales se sacrificaron a la 13 SPI y no se encontraron taenias.

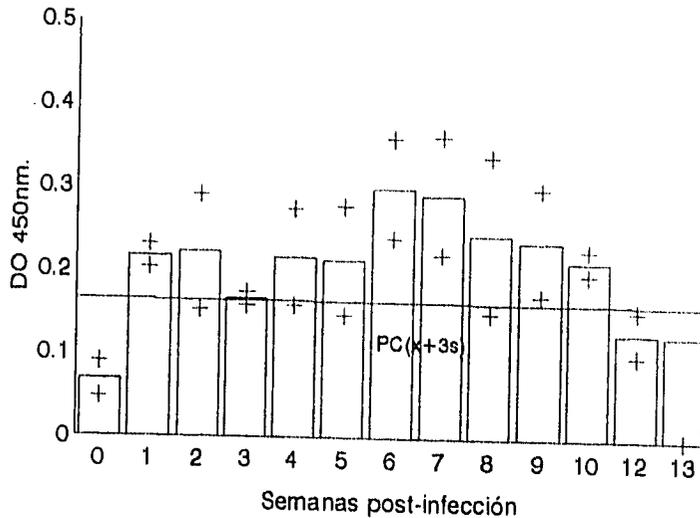


Figura No. 4 Cinética de aparición de coproantígenos en el grupo I no inmunosuprimido. Se grafican los promedios de las absorbancias en barras, en cruces se presenta las desviaciones estándar del grupo conformado por cuatro animales. El punto de corte (PC) fué de 0.17.

La cinética de aparición de antígenos en heces en el grupo II tuvo un comportamiento muy similar, la detección se realizó desde la primera SPI. La máxima DO se obtuvo a la octava SPI, a partir de entonces los valores de densidad óptica comenzaron a disminuir paulatinamente, registrándose valores por abajo del punto de corte a las 18 SPI cuando los animales pierden la infección; en esta fecha sólo dos hámsteres estaban vivos (Figura No.5).

Un factor muy importante observado en el grupo II fué la liberación de proglótidlos de *T. solium* que aumentó en forma considerable las DO en los coproantígenos, en muestras que contenían proglótidlos se obtuvieron DO mayores hasta por una décima en comparación con las muestras de animales infectados sin proglótidlos en heces.

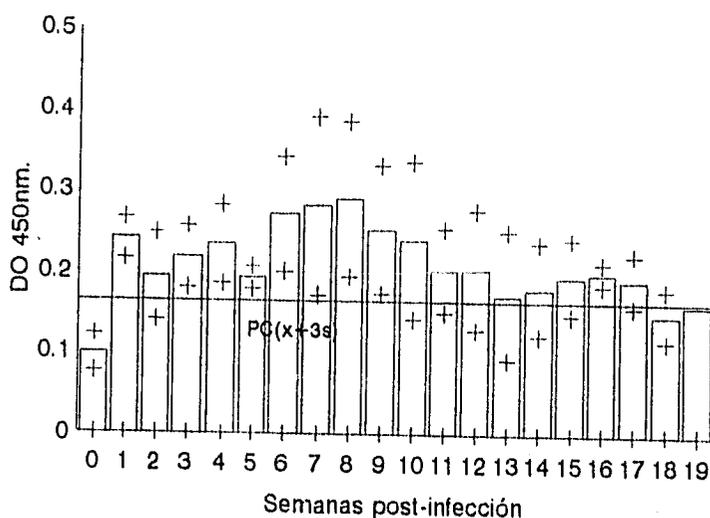


Figura No.5 Cinética de aparición de coproantígenos en el grupo II inmunosuprimido. Se grafican los promedios de las absorbancias en barras, en cruces se presentan las desviaciones estándar. El punto de corte (PC) fué de 0.17.

Los análisis de regresión lineal demostraron que no hay relación alguna entre el tamaño o número de parásitos y la cantidad de antígeno detectado en heces. Ejemplo de ello fué el grupo I donde se obtuvieron las *taenias* más grandes sin incremento detectable de los coproantígenos en comparación con el grupo II, también en estos animales a pesar de tener un mayor número de *taenias* las DO fueron muy similares (Cuadro No.6).

El comportamiento general de las cinéticas de coproantígenos en ambos grupos experimentales no fué uniforme, hubo incrementos y decrementos alternados lo que indicó que la cantidad de antígenos liberados no es la misma. Los valores de absorbancia del grupo III siempre se mantuvieron por abajo del punto de corte, hasta al sacrificio del último animal a las 14 SPI (Figura No. 6).

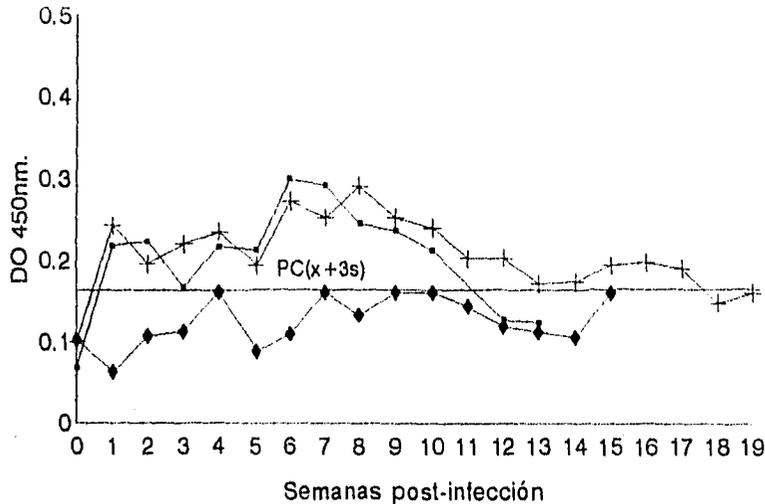


Figura No.6 Cinética de detección de coproantígenos en los tres grupos experimentales de hámsteres. Grupo I (●) no inmunosuprimido, grupo II (+) inmunosuprimido y grupo III (◆) sin infección. Cada punto representa el promedio de las absorbancias del grupo en esa semana de infección. El punto de corte (PC) fué de 0.17.

1.6 Tamizados de heces

Se hicieron tamizados de heces de cada animal en forma individual semanalmente a partir de la séptima SPI. Los animales del grupo I no inmunosuprimidos no liberaron proglótidos de *T. solium*; sin embargo, todos los animales inmunosuprimidos e infectados (comprobado por coproantígenos) del grupo II liberaron proglótidos en heces de manera periódica hasta la completa expulsión de las taenias. La eliminación de proglótidos de *Taenia* en este grupo se inició a partir de la octava SPI, algunos de los proglótidos que se colectaron se fijaron y tñieron con la técnica de para-carmin de Mayer. Al microscopio de luz se observó que los proglótidos eran en su mayoría maduros, tenían el poro genital muy prominente y en algunos se logró identificar el cirro, lo cual indicaba la próxima fecundación; sin embargo, no se logró el desarrollo de proglótidos maduros con útero

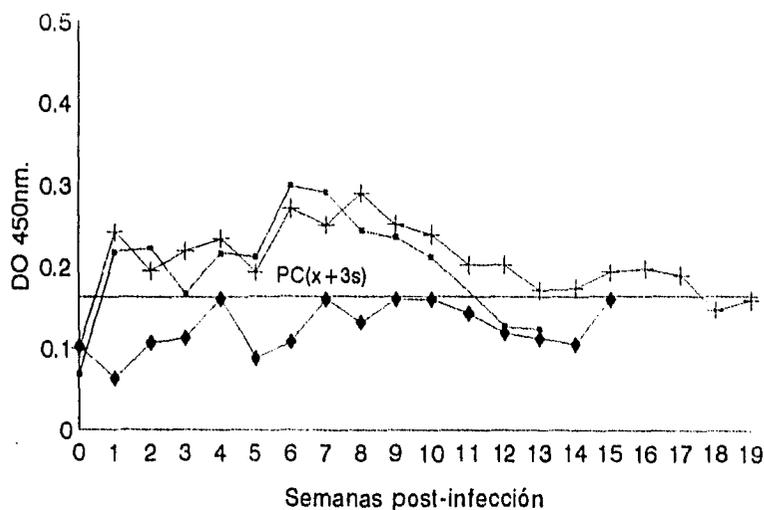


Figura No.6 Cinética de detección de coproantígenos en los tres grupos experimentales de hámsteres. Grupo I (●) no inmunosuprimido, grupo II (+) inmunosuprimido y grupo III (◆) sin infección. Cada punto representa el promedio de las absorbancias del grupo en esa semana de infección. El punto de corte (PC) fué de 0.17.

1.6 Tamizados de heces

Se hicieron tamizados de heces de cada animal en forma individual semanalmente a partir de la séptima SPI. Los animales del grupo I no inmunosuprimidos no liberaron proglótidos de *T. solium*; sin embargo, todos los animales inmunosuprimidos e infectados (comprobado por coproantígenos) del grupo II liberaron proglótidos en heces de manera periódica hasta la completa expulsión de las taenias. La eliminación de proglótidos de *Taenia* en este grupo se inició a partir de la octava SPI, algunos de los proglótidos que se colectaron se fijaron y tiñeron con la técnica de para-carmín de Mayer. Al microscopio de luz se observó que los proglótidos eran en su mayoría maduros, tenían el poro genital muy prominente y en algunos se logró identificar el cirro, lo cual indicaba la próxima fecundación; sin embargo, no se logró el desarrollo de proglótidos maduros con útero

ramificado (Figura No. 7).

Cuadro No. 6 Promedios de los valores de absorbancia y desviaciones estándar de coproantígenos en los grupos experimentales.

SPI	GRUPO I X ¹ DE ²	GRUPO II X DE	GRUPO III X DE
0	.068 .02	.099 .023	.102 .09
1	.217 .014	.241 .025	.063 .016
2	.222 .069	.194 .054	.106 .035
3	.166 .008	.218 .038	.112 .048
4	.216 .058	.234 .048	.168 .038
5	.216 .058	.193 .014	.088 .022
6	.212 .065	.271 .071	.109 .018
7	.299 .06	.281 .110	.16 0
8	.291 .071	.29 .096	.132 .006
9	.244 .097	.252 .079	.17 .042
10	.236 .064	.239 .097	.17 .02
11	.212 .015	.202 .052	.143 .067
13	.127 .027	.203 .074	.114 0
14	.124 0	.171 .079	.112 .01
15		.179 .057	.105 0
16		.194 .047	.163 .001
17		.198 .014	
18		.19 .032	
19		.148 .032	
20		.18 0	

1 X Promedios 2 DE Desviación estándar SPI semanas postinfección

Conforme avanzaba el tiempo de infección y aumentaba la liberación de proglótidos en heces, el grado de madurez y el tamaño de los proglótidos recolectados disminuyó; cuando se sacrificaron los hámsteres infectados que tenían un historial de liberación de proglótidos, las taenias encontradas en el intestino eran más pequeñas que las recuperadas semanas antes de la liberación de proglótidos en otros animales infectados del mismo grupo.

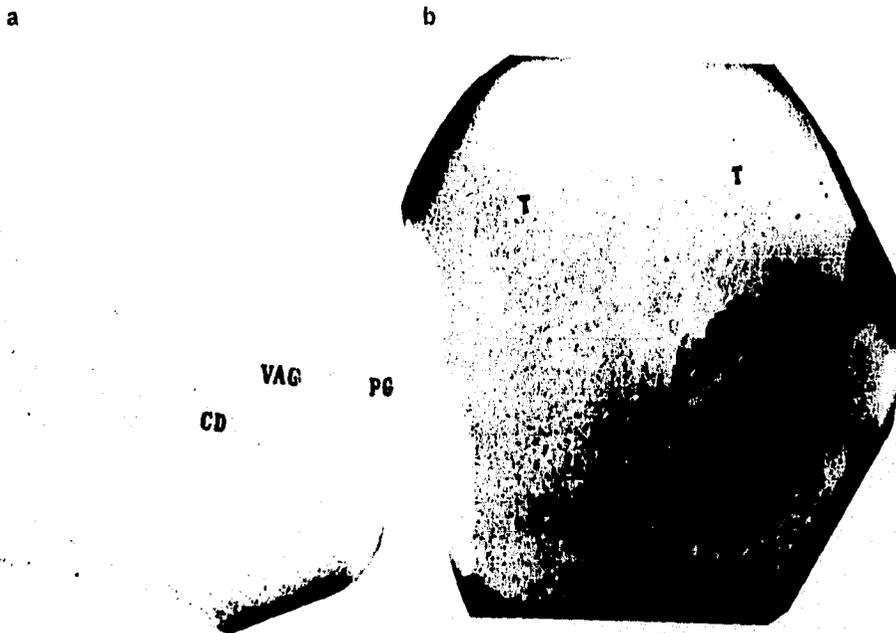


Figura No. 7 Proglótidos maduros de *T. solium* recuperados de las heces de hámsteres del grupo II inmunosuprimido colectados en diferentes semanas de infección. Técnica de tinción: para-Carmin de Mayer. Se observan las siguientes estructuras: a) vagina (VAG), conducto deferente (CD), poro genital (PG). b) vagina (VAG), testículos (T), poro genital (PG), conducto deferente (CD), ovario (OV).

Las dos taenias recuperadas del grupo I, donde no hubo liberación de proglótidos se observó el mayor desarrollo sexual de los parásitos, en estos animales la expulsión de la *Taenia* fué espontánea sin detección de proglótidos en heces y la disminución de las DO de los coproantígenos fue por abajo del punto de corte.

2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN EL MODELO EXPERIMENTAL.

2.1 Estandarización del ELISA para anticuerpos séricos.

Para la estandarización de esta técnica primero se procedió a obtener el antígeno de ES de *T. solium*; para ello se colocaron de una a tres taenias en medio de cultivo de RPMI. La mayoría de la taenias recuperadas vivas durante los dos primeros meses de la infección fueron cultivadas. Los parásitos se mantuvieron vivos en cultivo por cinco días en promedio sin contaminación alguna, después de una semana las taenias murieron y se destinaron para la preparación de antígeno somático.

Las taenias se colocaron en 10ml de medio de cultivo, el cual se cosechó a las 24 horas y se concentró, posteriormente se almacenó en congelación en alícuotas de 2.1mg/ml o 2.4mg/ml de proteína para usarse como fuente antigénica en la estandarización de los ELISAs para anticuerpos (Fig. No. 8).

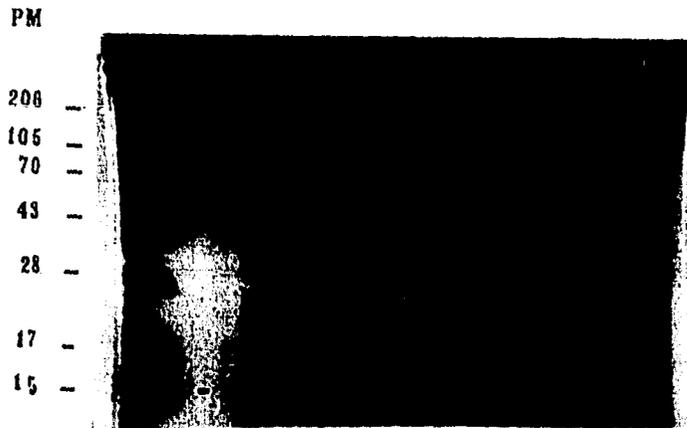


Figura No. 8. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, en el carril 1 se muestran los pesos moleculares, los carriles 3, 4 y 5 corresponden al antígeno de ES (115 $\mu\text{g/ml}$), los carriles restantes son del antígeno somático de *T. solium* (42 $\mu\text{g/ml}$).

En la estandarización del ELISA para anticuerpos séricos IgG anti-*T. solium* se tomaron como control positivo los sueros de los animales del grupo III inmunizados con extracto crudo del parásito y los controles negativos fueron los sueros colectados de los animales del grupo II antes de la infección. El antígeno de ES de *T. solium* se probó a las concentraciones de 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ y los sueros se ensayaron a las diluciones 1:100, 1:200 y 1:300 (Figura No. 9).

El sistema que discriminó en forma satisfactoria los sueros positivos de los negativos fué cuando se usó el antígeno de ES a 10 $\mu\text{g/ml}$ y al suero diluido 1:200. Las otras concentraciones de antígeno así como las diluciones de suero probadas en la estandarización se descartaron, ya que a mayores concentraciones el sistema se saturaba y el fondo de la prueba se incrementaba.

También se usó en la estandarización del ELISA para anticuerpos el antígeno crudo de *T. solium*, sin embargo, los valores obtenidos con éste antígeno presentaban grandes

fluctuaciones incluso en los animales inmunizados, por ello se optó por descartar el antígeno somático para realizar las cinéticas de anticuerpos en suero y en heces.

a.

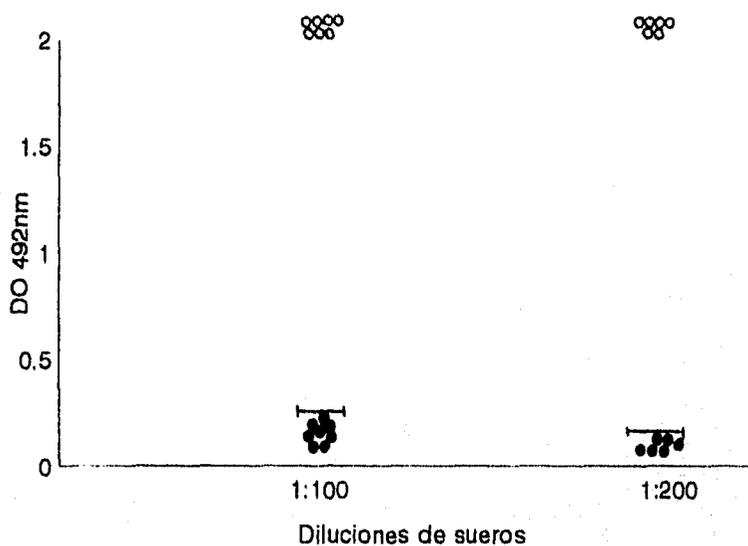


Figura No.9 Estandarización del ELISA para anticuerpos séricos usando antígeno de ES de *T. solium*. a. Antígeno de ES a 10 µg/ml probando diluciones del suero 1:100 y 1:200, sueros de los animales antes de la infección (●) y de los animales inmunizados (○) del grupo III. Con una barra horizontal se marcan los puntos de corte.

b.

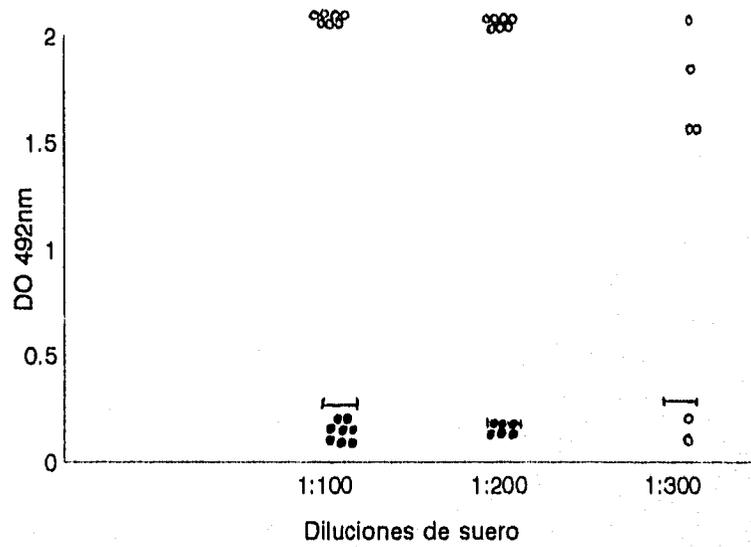


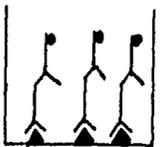
Figura No.9b. Antígeno de ES a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ probando diluciones del suero 1:100, 1:200 y 1:300 sueros de los animales antes de la infección (●) y de los animales Inmunizados (○) del grupo III. Con una barra horizontal se marcan los puntos de corte.



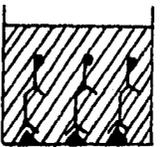
Se unió el antígeno de ES de *T. solium* ($10\mu\text{g/ml}$) a la placa.



Se agregó el suero de hámster (1:200) como fuente de anticuerpos.



Se añadió el conjugado anti-IgG de hámster acoplado a peroxidasa (1:1000).



Finalmente se añadió el sustrato (OPD¹-peróxido).

1 OPD orto-fenilendiamina.

Figura No. 10 ELISA para anticuerpos séricos de clase IgG anti *T. solium*.

Una vez estandarizada la técnica (Figura No. 10) se procedió a realizar la cinética de anticuerpos en los hámsteres. Con los sueros de los animales del grupo II tomados antes de la infección se determinó el punto de corte que fué de 0.230 (Cuadro No. 7).

En el grupo I de animales no inmunosuprimidos se lograron detectar anticuerpos de clase IgG desde la primera SPI, aunque en cantidades apenas cuantificables, a partir de esa fecha se observó un aumento acelerado en las DO hasta llegar a un máximo de detección a los sexta y séptima SPI con absorbancias mayores a 2. Después de estos días los títulos de anticuerpos de clase IgG disminuyen casi linealmente sin alcanzar el punto de corte, permanecieron detectables con valores aproximados a uno por lo menos tres semanas

después de la pérdida de la infección, tiempo en el cual fueron sacrificados los hámsteres
(Figura No. 11)

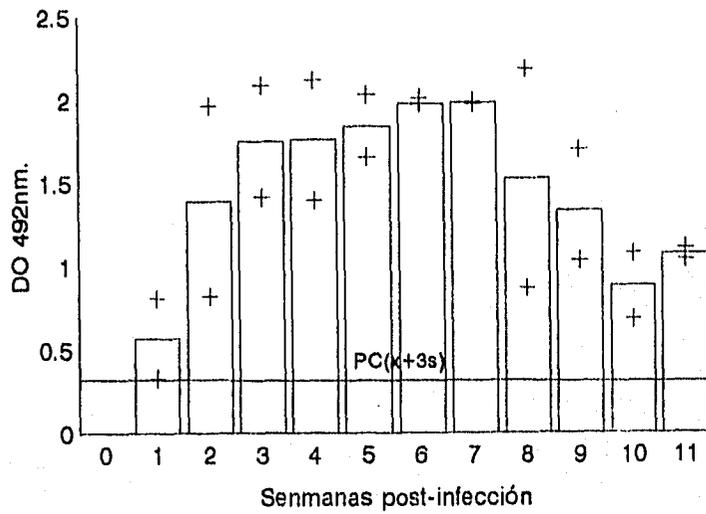


Figura No. 11 Cinética de detección de anticuerpos de clase IgG en suero de hámsteres del grupo I no inmunosuprimido. En barras se presentan los valores promedio y en cruces las desviaciones estándar de las absorbancias. El punto de corte (PC) fué de 0.23.

Cuadro No. 7 Promedios de los valores de absorbancia promedio y desviaciones estandar de anticuerpos de clase IgG de los grupos experimentales de hámsteres.

SPI	GRUPO I X DE	GRUPO II X DE	GRUPO III X DE
0		.133 .039	2 0
1	.567 .24	.293 .253	2 0
2	1.39 .572	.732 .529	1.94 .1
3	1.75 .337	1.156 .59	1.95 .099
4	1.758 .361	1.354 .432	1.74 .38
5	1.84 .186	1.697 .375	1.92 .12
6	1.975 .033	1.904 .143	1.94 .11
7	1.98 .066	1.861 .188	1.55 .71
8	1.524 .656	1.74 .395	1.87 .22
9	1.33 .296	1.207 .549	1.38 .93
10	.879 .197	1.44 .229	1.52 .65
11	1.075 .034	1.369 .169	1.66 .167
12		1.468 .273	1.298 0
13		1.21 .24	.94 .32
14		1.042 .208	1.28 .033
15		1.787 .269	1.56 .616
16		1.765 .225	
17		1.871 .198	
18		1.829 .036	
19		1.946 .075	
20		1.841 .224	

SPI Semanas post-infección. X Promedios DE Desviación estándar.

En el grupo II también se observó un patrón similar, aunque la detección comenzó un poco después de la primera SPI, el incremento de los anticuerpos en este caso fué más gradual hasta encontrar el máximo de absorbancia a la sexta SPI, sin embargo, en este grupo existieron fluctuaciones en los niveles de anticuerpos a lo largo del experimento. No se observó una disminución gradual de los anticuerpos al igual que en el grupo I, incluso permanecieron detectables con títulos altos cercanos a dos, tres semanas después de la pérdida de la infección (tiempo en el cual se sacrificaron). A pesar de la inmunosupresión en los animales del grupo II, la respuesta de anticuerpos anti-*T. solium* de clase IgG fué muy similar al grupo I, el esteroide no fué capaz de suprimir la respuesta inmune sistémica, aunque se presentó una semana después (Figura No. 12).

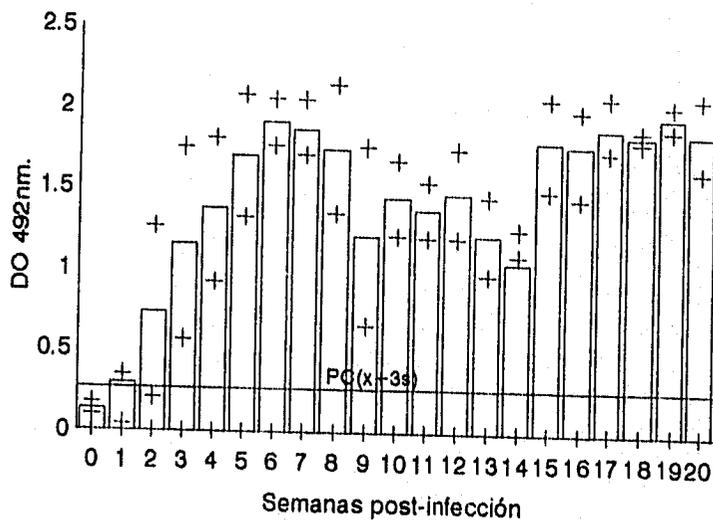


Figura No. 12 Cinética de detección de anticuerpos de clase IgG en suero de hámsteres del grupo II inmunosuprimido. En barras se presentan los valores promedio y en cruces las desviaciones estándar de las absorbancias. El punto de corte (PC) fué de 0.23.

Finalmente, los animales del grupo III inmunizado con antígeno crudo de *T. solium* e inmunosuprimidos permanecieron con títulos altos de anticuerpos mayores a dos a lo largo de todo el experimento, hubo una ligera disminución en algunos de los animales cuando fueron sacrificados; nuevamente, el esteroide no afectó la respuesta de estos hámsteres (Figura No. 13).

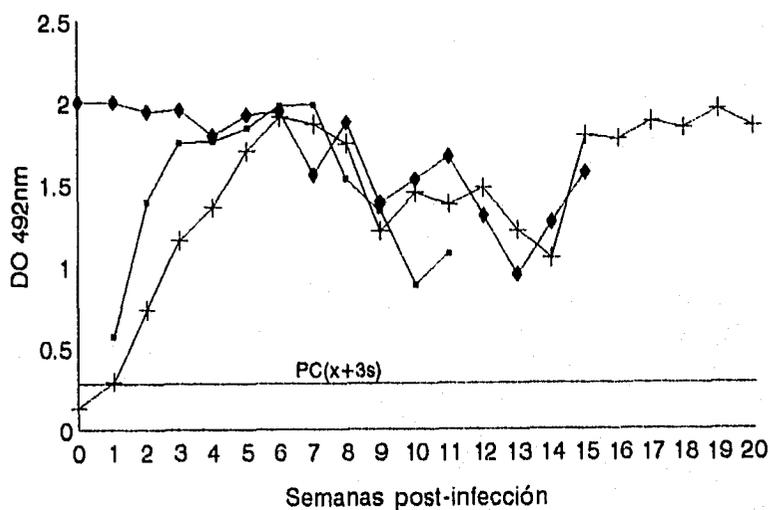


Figura No. 13 Cinética de anticuerpos séricos para los tres grupos experimentales de hámsteres. Grupo I (●) no inmunosuprimido, grupo II inmunosuprimido (+) y grupo III (◆) inmunizados sin infección. Cada punto corresponde al promedio de las absorbancias. El punto de corte (PC) fué de 0.23.

Cuando se compararon las cinéticas de coproantígenos y anticuerpos séricos en los animales de los grupos I y II se observó que los anticuerpos séricos disminuyen a la par que los coproantígenos. En el grupo I, la disminución lineal de los anticuerpos correspondió a la disminución de los coproantígenos hasta su desaparición a la décima SPI (Figura No. 14). En el grupo II también se presentó este mismo patrón, conforme aumentaron o disminuyeron los antígenos en heces también lo hicieron los anticuerpos en suero (Figura No. 15).

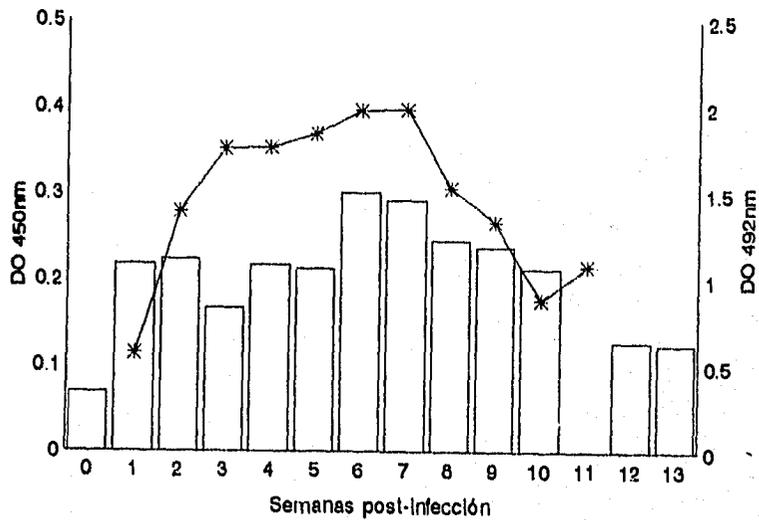


Figura No. 14. Cinética de coproantígenos (□) y anticuerpos séricos (*) de hámsteres del grupo I no inmunosuprimidos. Las lecturas para coproantígenos se hicieron a 450nm y para anticuerpos a 492nm. El punto de corte (PC) para coproantígenos fué de 0.17 y para anticuerpos de 0.23.

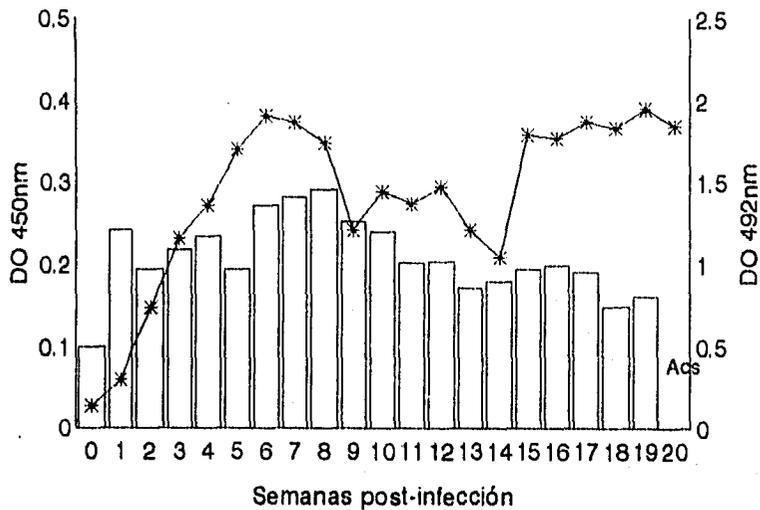


Figura No. 15 Cinética de coproantígenos (□) y anticuerpos séricos (*) de hámsteres del grupo II inmunosuprimidos. Las lecturas para coproantígenos se hicieron a 450nm y para anticuerpos a 492nm. El punto de corte (PC) para coproantígenos fué de 0.17 y para anticuerpos de 0.23.

2.2 Estandarización del ELISA para coproanticuerpos.

Los sobrenadantes de heces de los tres grupos de animales fueron ensayados, para estandarizar el ELISA se usaron las muestras de heces tomadas antes de la infección y durante los primeros días de la misma. Se tomaron como controles negativos los sobrenadantes de heces colectados antes de la infección.

Se probaron cuatro concentraciones de antígeno de ES de *T. solium*: 10, 20, 40 y 50µg/ml, así como sobrenadantes de heces sin diluir con un volumen de 50µl por pozo, a todas estas concentraciones fué posible la detección de anticuerpos en heces. Las soluciones antigénicas de 50 y 40µg/ml incrementaban el fondo de la prueba por lo que se descartaron; las concentraciones de 10 y 20µg/ml del antígeno originaron DO más

bajas, pero con una detección adecuada, obteniéndose por tanto un punto de corte más bajo (Figura No. 16). Se optó por usar la concentración de 20 μ g/ml de antígeno de ES en forma rutinaria, con esta concentración se logró incrementar un poco más las DO sin elevar el fondo de la prueba, el punto de corte (PC) fué de 0.24 (Figura No. 17).

Durante el período de inmunosupresión de los hámsteres la respuesta inmune local fué completamente abatida, detectándose anticuerpos en heces sólo en los animales no inmunosuprimidos del grupo I, cuando ya no se aplicó esteroide en los animales del grupo II (décima SPI) comenzaron a detectarse anticuerpos en estos animales.

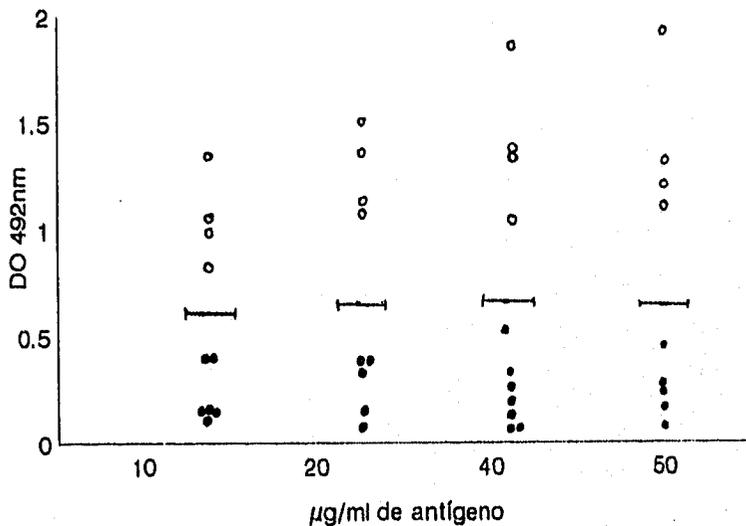
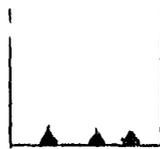
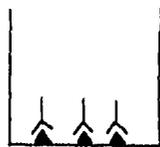


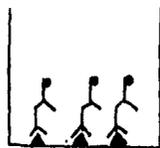
Figura No. 16 Estandarización del ELISA para la detección de anticuerpos de clase IgG en heces. Se ensayaron muestras de hámsteres antes (●) y después de la infección (○) de animales no inmunosuprimidos (5 SPI), con diferentes concentraciones del antígeno de ES de *T. solium*. Con una barra horizontal se marcan los puntos de corte.



Se unió el antígeno ES de *T. solium* (20µg/ml) a la placa.



Se agregó 50µl de sobrenadantes de heces como fuente de anticuerpos.



Se añadió el conjugado anti-IgG hámster conjugado a peroxidasa. (1:1000).



Finalmente se añadió el sustrato (OPD¹- peróxido).

1 orto-fenilendiamina.

Figura No.17 ELISA para la detección de coproanticuerpos de clase IgG anti-*T.solium*.

En el grupo I los coproanticuerpos se detectaron después de la segunda SPI, cabe mencionar que se obtuvieron títulos altos en este grupo antes de la infección con DO de 0.49 en promedio que corresponden a la presencia de anticuerpos, este hecho no pudo ser corroborado con los sueros de estos mismos animales debido a que no se contaba con los sueros tomados al inicio del experimento, sin embargo, podría ser que los hámsteres de este grupo hubieran estado infectados con *Hymenolepis nana* y que como resultado de la infección natural crearan anticuerpos contra este parásito, los cuales se sabe tienen reactividad cruzada con *T. solium*. No obstante, a partir de la tercera semana de infección existió un incremento importante en los valores de

absorbancia que indicaron la presencia de anticuerpos de clase IgG en las heces de estos animales. El punto máximo de detección se encontró a la sexta y novena SPI, produciéndose posteriormente una ligera disminución hasta permanecer casi constante al término del experimento a las 13 SPI (Figura No. 18).

En el grupo II se detectaron anticuerpos en heces en forma esporádica hasta la octava SPI, cuando se retiró el inmunosupresor a la décima SPI los valores fueron incrementándose gradualmente, sin embargo, existió un aumento muy prominente a partir de las 15 SPI presentándose el máximo de detección a las 17 SPI tiempo en el cual se expulsó la *Taenia* comprobado por coproantígenos. Después de la desaparición del parásito los coproanticuerpos disminuyen ligeramente permaneciendo así hasta las 19 SPI. (Figura No. 19).

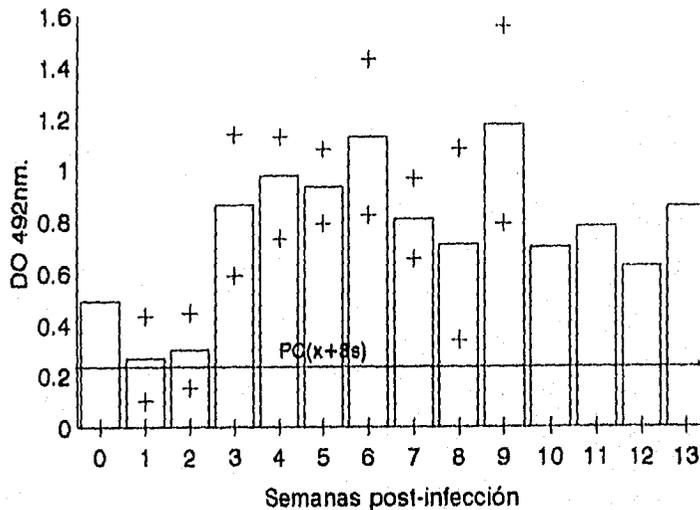


Figura No. 18 Cinética de aparición de coproanticuerpos en el grupo I no inmunosuprimido. En barras se grafican los valores promedio y en cruces la desviación estándar. El punto de corte (PC) fué de 0.24.

Al comparar las cinéticas de coproanticuerpos en ambos grupos de hámsteres se observó una menor respuesta inmune local provocada por el esteroide en el grupo II (Figura No. 19), sin embargo, en los dos grupos los coproanticuerpos parecen verse ligeramente aumentados cuando el parásito desaparece del intestino del hámster (Figura No. 20, Cuadro No. 8).

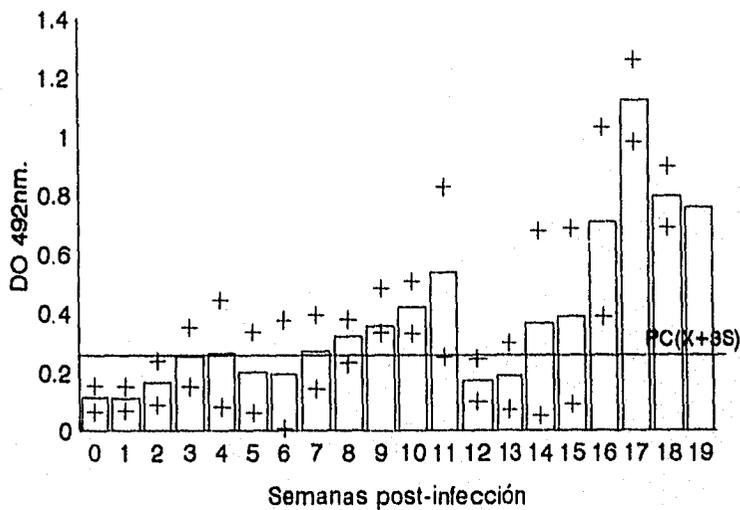


Figura No. 19 Cinética de aparición de coproanticuerpos en el grupo II inmunosuprimido. En barras se grafican los valores promedio y en cruces la desviación estandar. El punto de corte (PC) fué de 0.24.

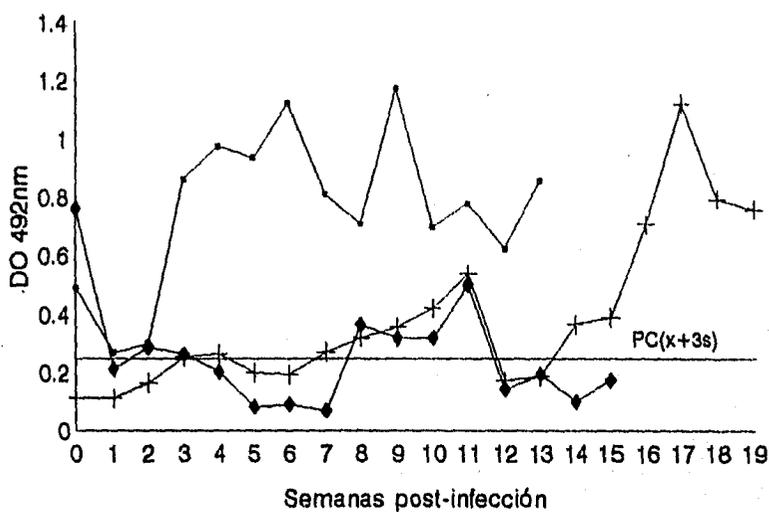


Figura No. 20. Cinética de coproanticuerpos en los tres grupos experimentales de hámsteres. Grupo I (●) no inmunosuprimido, grupo II (+) inmunosuprimido y grupo III (◆) no infectado. El esteroide fué retirado en la décima SPI. El punto de corte (PC) fué de 0.24.

Si se comparan las cinéticas de coproanticuerpos y anticuerpos séricos en el grupo I, los coproanticuerpos presentaron el mismo patrón que el de los anticuerpos en suero (Figura No. 21). Se observaron dos máximos de concentración de coproanticuerpos a la sexta y novena SPI, el primero coincide con el título máximo de anticuerpos en suero (sexta SPI). Al parecer no existe una gran disminución de los anticuerpos cuando desaparece el parásito a la décima SPI (grupo I) y 17 SPI (grupo II) (Figura No.21 y No. 22), incluso se observa un ligero aumento de los mismos permaneciendo así hasta el término del experimento.

Cuadro No. 8 Promedio de los valores de absorbancia y desviaciones estándar de coproanticuerpos en los grupos experimentales de hámsteres.

SPI	GRUPO I X DE	GRUPO II X DE	GRUPO III X DE
0	.49 .127	.112 .043	.76 .48
1	.266 .166	.114 .042	.21 .25
2	.298 .145	.163 .074	.285 .05
3	.861 .274	.252 .1	.261 .103
4	.974 .242	.263 .181	.2 .05
5	.933 .145	.198 .137	.081 .007
6	1.12 .303	.191 .184	.09 .03
7	.808 .158	.268 .127	.068 .007
8	.708 .371	.318 .06	.363 .055
9	1.172 .384	.356 .127	.316 .213
10	.698 0	.418 .088	.318 0
11	.778 0	.537 .288	.499 .11
12	.624 0	.171 .0713	.142 0
13	.853 0	.185 .112	.193 0
14		.364 .313	.098 .001
15		.388 .295	.173 .013
16		.707 .322	
17		1.119 .139	
18		.793 .103	
19		.757 0	

SPI Semanas post-infección
X Promedios DE Desviaciones estándar

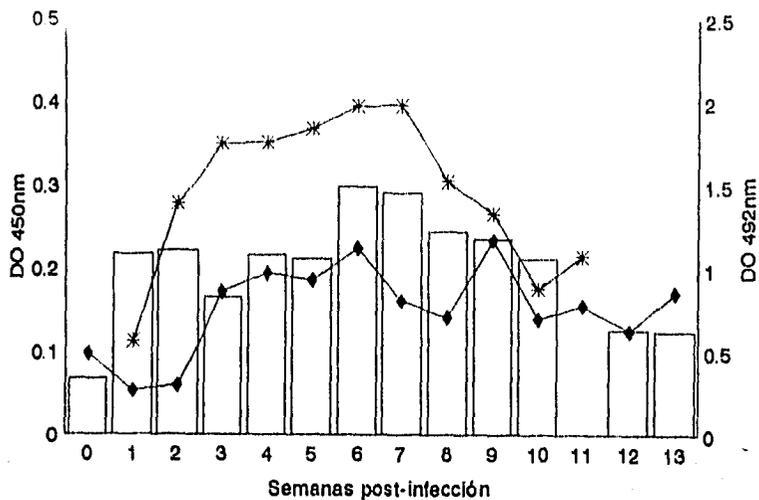


Figura No. 21. Comparación de las cinéticas de coproantígenos en barras (□), coproanticuerpos (●) y anticuerpos séricos (*) en el grupo I no inmunosuprimido. Las lecturas se realizaron a 450nm para coproantígenos, el resto se llevó a cabo a 492nm. Los puntos de corte (PC) fueron para coproantígenos 0.17, coproanticuerpos 0.24 y anticuerpos séricos 0.23.

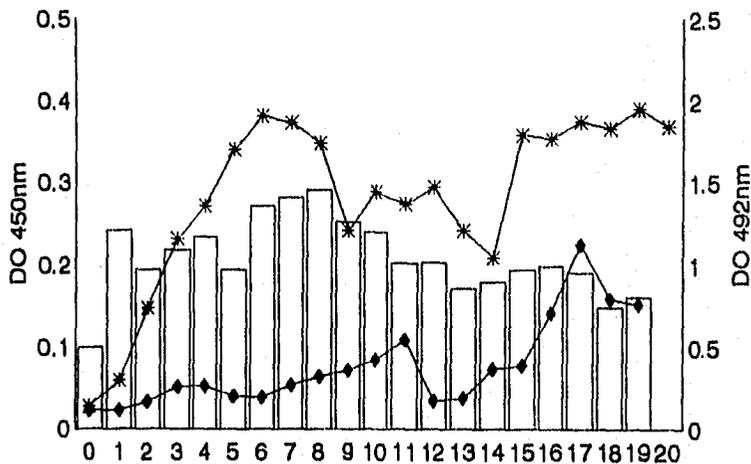
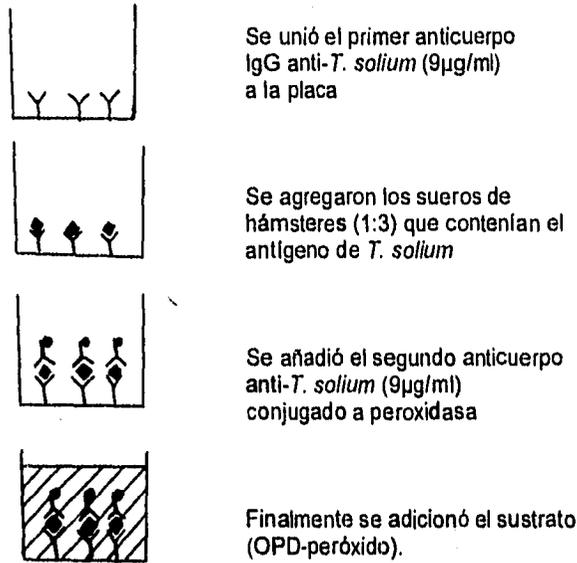


Figura No. 22 Comparación de las cinéticas de coproantígenos en barras (□), coproanticuerpos (●) y anticuerpos séricos (*) en el grupo II Inmunosuprimido. Las lecturas se realizaron a 450nm para coproantígenos el resto se llevó a cabo a 492nm. Los puntos de corte (PC) fueron para coproantígenos 0.17, coproanticuerpos 0.24 y anticuerpos séricos 0.23.

2.3 Estandarización del ELISA para antígenos séricos.

Para completar la caracterización de la respuesta inmune humoral en el modelo y poder dar una explicación con más fundamentos de la respuesta de anticuerpos sistémicos encontrada en los hámsteres infectados, se procedió a estandarizar una técnica de ELISA para detectar antígenos circulantes de la *Taenia* en el suero de los animales infectados. Se tomó en cuenta el ELISA de captura estandarizado por Allan y col. (1990) y Avila (1992), para la detección de coproantígenos, se hicieron modificaciones a esta técnica y se adecuó para la detección en suero. La única variable que se manejó fue la dilución del suero, se probaron los sueros de los hámsteres diluidos de 2, 3, 4, 50 y 100 veces. Sólo en los sueros diluidos dos y tres veces se pudieron detectar antígenos de la *Taenia* por esta técnica, se eligió la dilución 1: 3 ya que se contaba con muy pequeñas cantidades de muestra. Como control positivo se utilizó antígeno crudo de *T. solium* a concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/ml, como control negativo se utilizaron todos los sueros tomados antes de la infección, con ellos mismos se estableció el punto de corte que fue de 0.27 (Figura No. 23).

Una vez estandarizada la técnica se procedió a realizar las cinéticas de antígenos de cada uno de los grupos de hámsteres, en los animales inmunosuprimidos no se detectaron antígenos circulantes al menos en varias muestras evaluadas a lo largo de la infección (Cuadro No. 9, Figura No. 24).



OPD orto-fenilendiamina

Figura No. 23 Estandarización del ELISA para detección de antígenos de *T. solium* en suero.

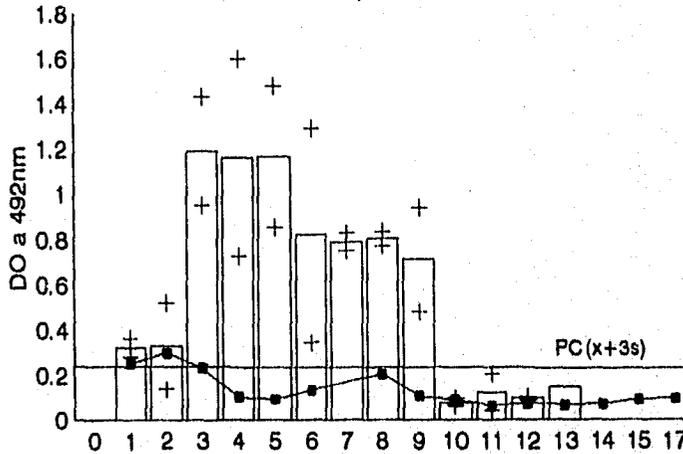


Figura No. 24 Cinética de aparición de antígenos de ES de *T. solium* en el grupo I no inmunosuprimido (en barras) y en el grupo II (), con sus desviaciones estándar (). El punto de corte (PC) fué de 0.27.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

La detección de antígenos circulantes mostró su mayor aumento a la tercera SPI antes que los anticuerpos séricos, lo que implica que el sistema inmune es estimulado por los antígenos liberados por la *Taenia* y que al parecer atraviesan la mucosa intestinal. A partir de la sexta y séptima semana post-infección comienzan a disminuir los antígenos circulantes, mientras los anticuerpos presentan sus máximos valores (Figura No. 25).

Por otra parte, los antígenos circulantes se comportan en forma similar que los coproanticuerpos, desarrollan las DO más altas desde la tercera SPI y presentan fluctuaciones en el transcurso de la infección. Sin embargo, el comportamiento de los antígenos circulantes y los coproantígenos es diferente, mientras los antígenos en suero comienzan a disminuir a la sexta SPI los coproantígenos aumentan, de tal manera que a la décima SPI ya no se detectan antígenos circulantes, mientras que los coproantígenos desaparecen dos semanas después (Figura No. 25).

En el grupo II de hámsteres inmunosuprimidos, no se logró detectar antígenos circulantes a lo largo de toda la infección.

Cuadro No. 9 Promedios de los valores de absorbancia y desviaciones estándar de antígenos circulantes de los grupos experimentales de hámsteres.

S PI	GRUPO I X SD	GRUPO II X
0		.257
1	.322 .041	.252
2	.327 .191	.23
3	1.191 .241	.101
4	1.161 .436	.092
5	1.166 .312	.133
6	.818 .472	
7	.788 .038	.204
8	.801 .03	.105
9	.71 .229	.089
10	.079 .018	.063
11	.123 .08	.075
12	.095 .007	.067
13	.148 0	.091
14		.096

SPI Semanas post-infección
 X Promedios
 DE Desviaciones estándar

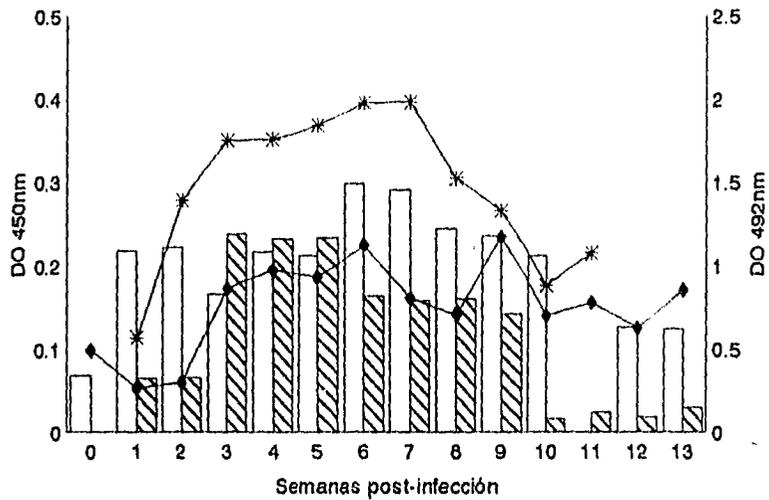


Figura No. 25 Comportamiento de la respuesta inmune humoral en hámsteres no inmunosuprimidos. En barras se presentan las cinéticas de coproantígenos (□) y antígenos séricos (▨); en líneas las cinéticas de coproanticuerpos (*) y anticuerpos séricos (▲). Las lecturas de absorbancia para coproantígenos se hicieron a 450nm, todas las demás fueron a 492nm.

V DISCUSION

Existen trabajos previos que reiteran la utilidad del hámster dorado como modelo experimental para *T. solium*, tanto para el establecimiento de la parasitosis (Verster, A., 1971, 1974; Avila, G., 1992; Aguilar, A., 1995) como para la obtención de material antigénico para la estandarización de un ensayo inmunoenzimático para la detección de antígenos de la *Taenia* en heces de individuos infectados (Allan, J. et al, 1990; Avila, G., 1992). El hámster también ha sido usado ampliamente en otras parasitosis, en la infección por *Ancylostoma ceylanicum* (Ray, D.K., et al 1972; Garside y Behnke, 1988), para *Necator americanus* (Rajasekariah, G.R., et al, 1990) y recientemente se ha usado en la taeniosis por *T. crassiceps* y equinococosis por *E. multilocularis* (Sato y Kamiya, 1989; Kamiya y Sato, 1990). En el presente trabajo se utilizó el modelo de taeniosis en hámster para estudiar la respuesta inmune desarrollada contra el parásito y el papel que desempeña ésta en la expulsión o permanencia de *T. solium* en el intestino delgado del hospedero. Verster (1971, 1974) reportó que *T. solium* podía implantarse en el intestino delgado del hámster dorado, con la aplicación de esteroides como el acetato de metilprednisolona se aumentaba la susceptibilidad y la permanencia del parásito en el hospedero.

T. solium pudo desarrollar en el 100% de los hámsteres inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos de los grupos experimentales, en los hámsteres del grupo II inmunosuprimidos hubo un mayor porcentaje de obtención de taenias, 61.4%, en contraste con el 50% encontrado en los animales no inmunosuprimidos, además en los animales tratados con el esteroide se obtuvo un mayor número de taenias por animal, por

el contrario en el grupo I no inmunosuprimido sólo se obtuvo una *Taenia* por individuo.

Sin embargo, al igual que lo reportado por Verster (1974), la inmunosupresión aumentó la mortalidad de los animales hasta en un 40% durante el primer mes del experimento, debido principalmente a infecciones secundarias favorecidas por el estado de inmunosupresión de los animales.

Por otra parte, el inmunosupresor también aumentó el tiempo de permanencia del parásito en el intestino del hámster y favoreció que hubiera mayor carga parasitaria, los animales del grupo II inmunosuprimido permanecieron infectados hasta las 17 SPI comprobado por coproantígenos, mientras que en los hámsteres del grupo I no inmunosuprimidos la infección duró hasta la décima SPI. En cuanto a la carga parasitaria, en los animales inmunosuprimidos se obtuvieron de dos a cuatro taenias, con un promedio de infección de 3.3 taenias por hámster. En animales que tenían hasta cuatro parásitos el desarrollo sexual de cada una de las taenias fué similar, se obtuvieron taenias con proglótidos maduros y órganos sexuales diferenciados. Los parásitos más largos que se recuperaron midieron 38cm.

El grupo de animales no inmunosuprimidos (grupo I) también se parasitó, según los reportes de la literatura el porcentaje de individuos parasitados en estas circunstancias puede variar de 0 al 100% (Verster, 1974; Avila, G., 1992; Aguilar, A., 1995) y el tiempo de permanencia de *T. solium* suele ser muy corto, 58 días según Verster (1971). A pesar de que en esta infección se obtuvo un porcentaje menor de implantación de las taenias (25%), éstas permanecieron hasta la décima SPI, período superior al reportado por Avila (1992), aunque también se ha informado la permanencia de *T. solium* hasta las 12 SPI en animales no inmunosuprimidos (Monroy-Ostria, A., 1993). Las taenias

recuperadas de este grupo tuvieron un desarrollo morfométrico y sexual mayor que las taenias obtenidas de los hámsteres inmunosuprimidos, a la sexta SPI se obtuvo un ejemplar de 59cm con proglótidos maduros y útero ramificado con huevos en proceso de formación; a la novena SPI se recuperó otra *Taenia* de 82cm con el mismo grado de desarrollo que la anterior aunque con menos ramas uterinas. La diferenciación de los órganos genitales en taenias obtenidas de hámsteres no inmunosuprimidos fué mayor al reportado por Verster (1971), quien obtuvo taenias con ductos genitales y testículos y Avila (1992), que reporta la presencia de parásitos sin diferenciación sexual.

Cabe señalar que los animales inmunosuprimidos expulsaron proglótidos de la *Taenia* en las heces de manera constante a partir de la octava SPI hasta la completa eliminación del parásito, la expulsión fué progresiva; mientras que en los animales no inmunosuprimidos no se detectaron proglótidos en heces durante la infección, de tal manera que la eliminación de *T. solium* en estos animales fué completa y momentánea, no hubo destrobilación de la *Taenia*. En otros céstodos como *T. crassiceps* se ha reportado que primero ocurre la destrobilación y en seguida la expulsión del parásito por parte del gerbo y el ratón, sin embargo, en hámsteres no se presenta destrobilación y la eliminación de esta *Taenia* es completa (Sato, H. and Kamiya, M., et al, 1989; Sato, H., et al, 1994).

Puede haber varias razones que expliquen las diferencias obtenidas en las taenias colectadas de animales inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos.

1. La susceptibilidad individual al parásito varía de un individuo a otro aún en la misma especie, esta variabilidad puede deberse al hecho de que no se está trabajando

con animales singénicos; al respecto se han hecho infecciones con *T. solium* en hámsteres blancos o albinos sin éxito en la recuperación de parásitos adultos, lo que nos habla de la influencia genética en la implantación de las taenias (Monroy-Ostria, A., et al, 1993).

En infecciones experimentales con *H. nana* en ratones de diferentes cepas, se ha observado que los animales responden en forma variada al parásito, las cepas dd e ICR son más susceptibles que los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3H/He (Ito, A, 1984; Ito, A. and Kamiyama, T., 1985).

En el caso del hámster dorado se han observado diferencias en animales procedentes de diferentes bioterios, al comparar la susceptibilidad del hospedero al parásito en anteriores experimentos (Avila, G., 1992; Aguilar, A., 1995). Además en estudios preliminares se ha visto que los hámsteres machos son más susceptibles a la taeniosis, sin embargo, las taenias más largas se obtienen de la hembras. En los machos el tiempo de duración de la parasitosis es menor debido principalmente a que ellos son más susceptibles al tratamiento inmunosupresor y contraen más infecciones secundarias en un tiempo menor (Avila, G., 1992; Aguilar, L., 1995).

Por otra parte no se ha observado una relación entre la edad de los animales y la susceptibilidad a la *Taenia*, sin embargo, es importante el tamaño de los hámsteres debido a que albergan en su intestino un parásito de gran longitud.

Los animales de este experimento fueron obtenidos de diferentes bioterios, los hámsteres de los grupos I y III provenían del IIB y eran de 12 meses de edad y los animales del grupo II del CINVESTAV, con siete meses de edad, es posible que haya diferencias genéticas en los hámsteres de éstos bioterios o que la edad de los animales

influyera en el desarrollo de *T. solium*.

2. Efecto de la carga parasitaria sobre el desarrollo de las taenias. En el modelo experimental de *H. diminuta* en rata (hospedero natural) se ha observado que cuando se excede en la infección experimental, una gran proporción de parásitos son expulsados por el hospedero antes de su desarrollo sexual total (Harris and Turton, 1973; Rickard, M.D., 1983), dicha expulsión no es mediada inmunológicamente. Por su parte Sato y Kamiya (1990) relacionaron el desarrollo de *T. crassiceps* solamente con la carga parasitaria, obteniendo un mayor número de proglótidos grávidos por taenia en animales parasitados con una a tres taenias que cuando había seis o más taenias. Considerando que en los animales inmunosuprimidos se establecieron en su mayoría las cuatro taenias, la luz intestinal pudo no ser suficiente para albergar ese número de parásitos con un mayor tamaño y desarrollo, también existe la posibilidad de que hubiera competencia por los nutrientes y el contenido intestinal no fuera suficiente para soportar esa carga parasitaria. Las taenias alcanzaron el máximo crecimiento entre la tercera y sexta SPI y posteriormente comenzó la destrobilación en los animales inmunosuprimidos a la octava SPI, obteniéndose taenias más pequeñas con capacidad de crecimiento y de esta manera los parásitos pudieran sobrevivir por más tiempo. Cabe señalar que las taenias más grandes recuperadas de los animales inmunosuprimidos midieron 38cm y fueron obtenidas de animales que tuvieron dos o tres taenias. Por el contrario, en los animales que no recibieron el esteroide se logró el establecimiento de una *Taenia* que pudo desarrollarse y nutrirse en forma libre en la luz intestinal, a pesar de su gran tamaño (59 y 82 cm), en un intestino delgado que llega medir de 30 a 40cm, las taenias estaban

contraídas de tal manera que alcanzaron ese tamaño sin llegar al intestino grueso (en estas condiciones fueron extraídas y una vez muertas se elongaron para ser medidas) en estos ejemplares el ancho de los proglótidos se incrementó considerablemente; el crecimiento de las taenias no se detuvo y se colectó un ejemplar de 82cm de largo a la novena SPI.

3. Efecto del esteroide. Por una parte la carga parasitaria pudo influir negativamente en el desarrollo de la *Taenia*, afectando directamente su crecimiento y constitución, puesto que el efecto de destrobilación sólo se observó en animales inmunosuprimidos.

Por otra parte se han desarrollado pruebas inmunológicas para la detección de antígenos en heces, se tienen métodos inmunoenzimáticos para el diagnóstico de amibiosis y giardiosis (Green, et al, 1985; Grundy, et al, 1987); también se tiene un ELISA para *H. diminuta* en ratas infectadas experimentalmente (Allan y Craig, 1989) y uno más desarrollado para el diagnóstico de *T. hydatigena* en perros (Deplazes, et al, 1990). Recientemente se estandarizó un ELISA para la detección de coproantígenos de *T. solium* en hámsteres infectados experimentalmente así como en individuos con taeniosis (Allan, J., et al 1990; Deplazes, et al, 1991; Avila, G., 1992), esta técnica es sensible y específica en un 100% (Avila, G., 1992). El ELISA resultó ser útil para la detección de coproantígenos de la *Taenia* en animales infectados, permitió realizar la cinética de la infección detectando como positivos tan sólo a los hámsteres con taeniosis, una vez que el parásito fué eliminado el ELISA se negativizó, indicando la eliminación de la *Taenia*. En el presente trabajo se lograron detectar coproantígenos del parásito desde la primera SPI en ambos grupos experimentales, con un aumento en las absorbancias a partir de la

segunda semana de infección, aunque este incremento no fué uniforme durante el transcurso de la infección.

No se encontró relación alguna entre las absorbancias de los coproantígenos, el número y el tamaño de las taenias, y se presentaron fluctuaciones en las absorbancias a lo largo de la infección, estas variaciones pudieron deberse a que no se presentan los mismos antígenos en las heces o a que la concentración de los mismos no es igual en todos los días (Allan, J., et al, 1990); por otro parte se tiene que tomar en cuenta la respuesta inmune humoral local, donde es posible que muchos de los antígenos se encuentran neutralizados por anticuerpos específicos locales (Craig, P.S., 1986; Langley y Hyllyer, 1989). Las absorbancias entre los grupos de infección inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos fueron comparativamente iguales, a pesar de que en los primeros hubo mayor número de taenias. El grupo sin infección (III) siempre se mantuvo por abajo del punto del corte.

A pesar de que no se observó correlación entre los coproantígenos y el número o tamaño de las taenias, los valores de absorbancia se vieron drásticamente incrementados cuando se presentaban proglótidos en heces, de hecho se encontró una relación cualitativa entre el valor de absorbancia (cerca a 0.3) y la detección de proglótidos en tamizados de heces en los animales inmunosuprimidos, estos incrementos en las absorbancias se debieron tanto a antígenos secretados en solución como también a antígenos somáticos liberados en grandes proporciones. Sin embargo, los valores similares de absorbancia del grupo I no inmunosuprimido se debieron exclusivamente a antígenos de ES de la *Taenia* expulsados a través de las heces, ya que no se liberaron proglótidos en este grupo experimental.

El estudio de la respuesta inmune en las parasitosis es de crucial importancia, ya que en infecciones por *H. nana* en el ratón la expulsión de este céstodo está inmunológicamente mediada. En el presente trabajo se inició el estudio de la respuesta inmune humoral que los hámsteres desarrollan contra la *Taenia*, con tal motivo se estandarizó un ELISA que permitió la detección de anticuerpos de clase IgG en el suero de los animales; como fuente de antígenos se usaron los productos de excreción-secreción de la *Taenia*, no se usó el antígeno crudo debido a que presentaba gran inespecificidad con elevados puntos de corte, probablemente esta reacción inespecífica fué a consecuencia de que este antígeno es producto de una maceración del parásito total junto con posibles contaminaciones bacterianas y productos que se encuentran en el intestino del hámster.

Los antígenos de ES son productos menos contaminados, que se extraen estériles del cultivo del parásito, con este antígeno

se obtuvo una mayor resolución sin elevar el fondo de la prueba, la diferencia entre las muestras negativas y los animales inmunizados (grupo III) fué por lo menos de 2 unidades al inicio del experimento. El uso de antígenos de ES se apoya en la idea de que son estos antígenos los que tienen contacto directo con el sistema inmune local en la mucosa intestinal y que son capaces de inducir una respuesta sistémica detectable (Heath, D., et al, 1985; Jenkins, J.D. and Rickard, M.D., 1986; Lightowers, M.W. and Rickard, M.D., 1988). Al respecto hay trabajos de inmunización con antígenos de ES del gusano adulto de *Echinococcus granulosus*, que reducen el desarrollo sexual de los parásitos adultos suprimiendo de manera considerable la producción de huevos en perros inmunizados (Herd, R.P., et al, 1975). También estos antígenos han sido utilizados para detectar anticuerpos en perros infectados experimentalmente con *E. granulosus* y *T. ovis*,

anticuerpos contra los antígenos de ES del escólex y protoescólex son detectados después de la segunda semana de infección, con altos títulos y sin reacción cruzada alguna con géneros afines (Jenkins and Rickard, 1986; Heath, D.D., et al, 1985).

La estrecha relación entre escólex y epitelio intestinal no implica que las glándulas rostelares sean las únicas en contribuir con la excreción de antígenos, se abre de nuevo la discusión si éstos antígenos atraviesan tan sólo las zonas dañadas del intestino donde el parásito se encuentra anclado, o si es a través de toda la mucosa intestinal donde los antígenos logran atravesar, así el antígeno liberado de cualquier parte del parásito, no justamente el escólex embebido en la lámina propia, podría ser absorbido y posiblemente estimular a la respuesta inmune. Es bien conocido que muchos antígenos orales no invasivos son capaces de atravesar la mucosa intestinal y estimular la respuesta inmune local y sistémica (Aizpurua and Russell-Jones, 1988). Por ejemplo, la inmunización contra taenidos larvarios ha sido llevada a cabo por dosificación oral con antígenos procedentes de oncosferas, cuyos resultados son alentadores al reducir la carga parasitaria al momento de retar a los animales inmunizados (Ayuya and Williams, 1979; Lloyd, 1979; Rickard, M.D. and Brumley, et al, 1981).

La respuesta de anticuerpos séricos se detectó a partir de la primera semana de infección en ambos grupos de animales no inmunosuprimidos e inmunosuprimidos (I y II), con un aumento paulatino conforme iban apareciendo los antígenos en heces, la máxima concentración se observó entre la sexta y séptima SPI, a partir de las cuales disminuyeron conforme los coproantígenos también lo hacían, la dinámica de detección de anticuerpos se observó muy dependiente de la presencia de los coproantígenos. Cabe señalar que en los animales infectados no inmunosuprimidos se presentó una respuesta de anticuerpos

circulantes tan intensa como en los animales inmunosuprimidos. La respuesta inmune desarrollada en animales infectados aún con esteroide apoya el concepto del paso de antígenos por toda la superficie intestinal, y no sólo a través de las glándulas rosetelares adheridas al intestino.

En hámsteres infectados con *T. crassiceps* e inmunosuprimidos con el esteroide butil acetato terciario de prednisolona se observaron títulos altos de anticuerpos IgG en el suero, aunque la respuesta también se vió influenciada por la carga parasitaria ya que en animales con menor número de parásitos los títulos de anticuerpos fueron menores en comparación con los hámsteres con un mayor número de metacéstodos; en los animales con más taenias (60 metacéstodos en la infección) e inmunosuprimidos la respuesta de anticuerpos fué similar a la registrada en animales infectados con tres metacéstodos (Sato, H. and Kamiya, 1994). Estos autores proponen que la respuesta inmune provocada por el menor número de parásitos pudo ser demasiado baja para eliminar a *T. crassiceps*, favoreciendo de esta manera la opinión de que los antígenos se originan del escólex y no del estróbilo, ya que a tiempos de infección mayores, la estimulación del sistema inmune debió haber aumentado al incrementarse la masa estrobilar, como la respuesta inmune no se vió aumentada se sugiere que la estimulación fué llevada a cabo tan sólo por antígenos provenientes del escólex. (Sato, H., et al, 1994).

El patrón de comportamiento de los anticuerpos en el experimento nos indicaría una respuesta inmune que depende únicamente de la presencia de la fuente antigénica. En ambos grupos de animales infectados los anticuerpos se detectaron por lo menos tres semanas después de expulsada la *Taenia* por el hoapedero, aunque con títulos continuamente descendentes. La duración del experimento no nos permitió saber hasta

cuando eran detectables los anticuerpos, sin embargo, en hámsteres que perdieron la infección en etapas tempranas (durante el primer mes) y a los cuales se les mantuvo con vida se les detectó una respuesta ligeramente disminuida 11 semanas después de la pérdida del parásito, esta respuesta bien pudo deberse a la estimulación de células en etapas tardías de la infección.

El grupo de animales no infectados (grupo III) los cuales fueron inmunizados con antígeno crudo de *T. solium* e inmunosuprimidos con el acetato de metilprednisolona, mantuvieron títulos altos (absorbancias mayores a 2 unidades) de anticuerpos por lo menos durante diez semanas en el experimento, con una ligera disminución después de este tiempo.

Mediante un ELISA (de Vos and Dick, 1991) se logró la cuantificación de anticuerpos de clase IgG en heces de una forma rápida y sencilla. Los coproanticuerpos sólo fueron detectados en animales del grupo I no inmunosuprimido a partir de la tercera semana de infección; se detectaron anticuerpos anti-*T. solium* antes de la infección en este grupo, con valores ligeramente por arriba del punto de corte, estos anticuerpos detectados seguramente estaban dirigidos contra *H. nana*, parásito común entre roedores de laboratorio y a pesar de que se llevó a cabo una desparasitación previa de los hámsteres, se detectaron anticuerpos aún circulantes contra este parásito con el antígeno de ES de *T. solium* en títulos muy bajos, y se ha comprobado que los anticuerpos contra *H. nana* presentan reacción cruzada con *T. solium* durante las primeras semanas de infección (Monroy-Ostría, A., et al, 1992).

La dinámica de aparición de coproanticuerpos observada en el grupo I tuvo un patrón muy similar al encontrado en los anticuerpos séricos, con títulos máximos a los sexta SPI

de la misma forma que en los anticuerpos en suero, con una paulatina disminución a partir de este tiempo, sin embargo, hubo un incremento pronunciado en los títulos de coproanticuerpos cuando el parásito es expulsado por el hospedero que no coincide con los títulos de anticuerpos en suero encontrados en ese tiempo. Puede haber varias razones que expliquen este comportamiento. Los títulos de coproanticuerpos de clase IgG detectados fueron considerablemente menores a los encontrados a nivel sistémico, debido primordialmente a que esta inmunoglobulina es sintetizada en mínimas cantidades en tejidos linfoides periféricos y células linfoides locales, aunque puede ser liberada al intestino mediante algún proceso de trasudación o puede entrar por difusión directa a través de la superficie intestinal. Sin embargo, cuando el tracto gastrointestinal se llega a inflamar, se incrementan las cantidades de inmunoglobulinas monoméricas, particularmente IgG, en secreciones. Este incremento probablemente resulta de la liberación de factores quimiotácticos por células inflamatorias que favorecen la exudación de inmunoglobulinas del espacio intravascular (Walker and Isselbacher, 1977). Al respecto Monroy-Ostria (1993) ha reportado la presencia de una respuesta inflamatoria local inducida por el parásito adulto en hámsteres infectados con *T. solium* desde la cuarta semana post-infección. Ahora bien, un bajo título de anticuerpos de clase IgG en heces puede deberse a la existencia de cierta degradación de las inmunoglobulinas por la presencia de proteasas.

En condiciones normales la principal inmunoglobulina presente en la luz intestinal tanto en humanos como en otras especies es la IgA, en algunas parasitosis se han detectado coproanticuerpos en pacientes con amibosis intestinal aguda, sin embargo, los títulos encontrados no difieren de aquellos registrados en pacientes sanos (Ximénez, C.,

et al, 1990). En infecciones naturales como experimentales con *Cryptosporidium parvum* se han detectado anticuerpos de clase IgA e IgM en heces, sin embargo, no se ha establecido aún su actividad protectora (Kapel, N., et al, 1993) aunque incrementos en los niveles de coproanticuerpos y de IgG en suero coincidieron con la expulsión de ooquistes del parásito en heces (Peeters, J.E., et al 1992; Hill, B.D., et al, 1990).

El hecho de que los coproanticuerpos tiendan a aumentar cuando los coproantígenos han desaparecido puede indicar la previa existencia de complejos inmunes a nivel local, de hecho, durante la infección parte de las inmunoglobulinas liberadas al intestino neutralizan antígenos liberados por el parásito, que al desaparecer éste implicarían un aumento detectable de anticuerpos libres cuando la prueba para coproantígenos se ha negativizado.

Infecciones experimentales con *Giardia muris* en ratón, han mostrado que la presencia de anticuerpos de clase IgG e IgA sobre la superficie de trofozoitos intestinales juegan un papel importante en el rechazo de la infección (Heyworth, M., 1986). Asimismo niveles elevados de IgA anti-*G. muris* en secreciones intestinales han sido asociadas a la expulsión del protozooario del intestino de ratón (Snider, D., and Underdown, B.J., 1986). También es importante la evidencia del enlace de inmunoglobulinas y el factor C3 del complemento sobre la superficie de *H. diminuta* en ratón (Befus, D., 1974; 1975) y la demostración de lesiones en la membrana que puede ser resultado de un daño mediado por anticuerpos (Befus and Threadgold, 1975).

A nivel sistémico la IgG sigue siendo detectada en concentraciones menores cuando el parásito ha sido expulsado, y su presencia en el intestino puede deberse al trasudado favorecido por la reacción inflamatoria local ocasionada por la *Taenia*. En la infección

realizada tanto en el grupo I y II se detectaron niveles ascendentes de coproanticuerpos previos a la expulsión de la taenia, con niveles disminuidos pero detectables durante las tres semanas posteriores a la eliminación del parásito.

En el grupo II en el cual no se detectaron anticuerpos en heces, el esteroide abatió por completo la respuesta inmune local e inflamatoria, después de la suspensión de la administración de la metilprednisolona la detección de coproanticuerpos comenzó hacerse evidente, el esteroide se dejó de administrar a la décima SPI y los coproanticuerpos comenzaron a detectarse de forma sistemática a las 15 SPI. Los resultados obtenidos hasta la décima SPI es probable que sean atribuidos al esteroide, ya que el acetato de metilprednisolona es un glucocorticoide que disminuye la presentación de antígenos por macrófagos, reducen la expresión de antígenos de histocompatibilidad en linfocitos periféricos, primordialmente en células B; en cuanto a la respuesta inflamatoria los glucocorticoides tienen múltiples efectos sobre la producción y función de muchos mediadores inflamatorios e inmunológicos (principalmente histamina, prostaglandinas, leucotrienos, aminas vasoactivas) también pueden alterar la función de estos mediadores producidos normalmente.

Los resultados encontrados sugieren un daño en la mucosa intestinal causado por la presencia del parásito, como consecuencia el hámster desarrolla una respuesta inflamatoria mediada quizás inmunológicamente, esta respuesta local es la única abatida por el acetato de metil-prednisolona, mientras que la respuesta sistémica no se altera.

En el grupo III el cual no se infectó pero si se inmunosuprimió durante el experimento no se detectaron coproanticuerpos, salvo en algunas ocasiones se detectaron con títulos muy bajos durante el experimento.

Finalmente es necesario investigar más a fondo la respuesta inmune del tracto gastrointestinal en el modelo de taeniosis en hámster, en este trabajo no se incluyen los estudios de la principal inmunoglobulina sistémica en mucosas, la IgA, tampoco la caracterización de leucitos en tejidos linfoides como las placas de Peyer, que pueden dar la pauta para conocer el verdadero papel de los mecanismos inmunes y no inmunes en la relación hospedero-parásito.

Para tratar de explicar la respuesta inmune humoral sistémica tan intensa en los hámsteres infectados inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos se procedió a detectar antígenos a nivel sérico, siguiendo básicamente el ELISA de captura hecho para coproantígenos. Existen múltiples estudios de detección de antígenos parasitarios en suero, pero básicamente se trata de parásitos tisulares que tienen contacto directo con el sistema inmune. Se han detectado antígenos de *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepática* (todos ellos parásitos tisulares) en suero de pacientes infectados como métodos diagnóstico, los cuáles han sido de gran ayuda ya que indican la presencia de una infección patente, a diferencia de la búsqueda de anticuerpos que pueden permanecer después de la pérdida del parásito.

En el presente experimento se lograron detectar antígenos séricos tan sólo en el grupo de animales no inmunosuprimidos a partir de la tercera semana de infección al igual que en los coproanticuerpos, en esta prueba no se presentó ninguna muestra positiva antes de la infección y como se mencionó anteriormente este ELISA de captura de detección de antígenos no presenta reacción cruzada con otros géneros. Los valores de absorbancia obtenidos para antígenos circulantes fueron bajos, siguiendo una dinámica de aparición muy similar a la de los coproanticuerpos, las máximas absorbancias detectadas fueron

precisamente en la tercera, cuarta y quinta semana de infección tiempo en el cual se observa el mayor incremento de anticuerpos séricos. La posterior disminución de los antígenos séricos coincidió con los títulos menores de anticuerpos en suero. Finalmente la desaparición de los antígenos séricos coincidió con la expulsión del parásito comprobado por coproantígenos.

El grupo II inmunosuprimido no se detectaron antígenos en suero, lo cual indica de nuevo el efecto del esteroide en inhibir la respuesta inflamatoria local. Al igual que la IgG puede ser originada principalmente del exudado de líquido intravascular, el propio daño causado por el parásito y sus consecuente respuesta inflamatoria inducida por el hospedero puede provocar el paso de antígenos de forma facilitada a través de la pared intestinal hacia la circulación, fenómeno que no ocurre en los animales inmunosuprimidos.

En el presente trabajo se reitera la utilidad del hámster dorado como modelo experimental para *T. solium*, así como sus beneficios para estudiar la relación hospedero-parásito. En cuanto a la caracterización de la respuesta inmune, se demostró que el hámster desarrolla una respuesta contra *T. solium* la cual puede ser medida por medio de la detección de anticuerpos de clase IgG a nivel local y sistémico; la inmunosupresión en los animales con acetato de metilprednisolona abate la respuesta inmune local e inflamatoria permitiendo que se implante un mayor número de taenias y que permanezcan por más tiempo en el intestino del hámster. En los animales no inmunosuprimidos se observan que al momento que la *Taenia* es expulsada se presenta un incremento en los títulos de anticuerpos a nivel local y permanecen altos durante varias semanas, este mismo fenómeno se observa en los animales inmunosuprimidos sólo cuando se retira el esteroide. En cuanto a la respuesta humoral sistémica (IgG) se mantiene con títulos altos

desde la tercera semana de infección tanto en los animales inmunosuprimidos como no inmunosuprimidos hasta semanas posteriores a la eliminación de *T. solium*. Aunque se observa la participación de la respuesta inmune contra la *Taenia*, estos estudios no demuestran totalmente su participación en la expulsión del parásito, por lo que es necesario un mayor estudio tanto de la respuesta inflamatoria intestinal como de la respuesta inmune local para determinar su participación en la expulsión o permanencia de *T. solium* en el intestino del hámster.

VI. CONCLUSIONES

El hámster dorado es susceptible a la implantación y desarrollo de *T. solium*, dicha susceptibilidad se ve aumentada cuando los animales son inmunosuprimidos con el esteroide acetato de metilprednisolona y la *Taenia* puede permanecer por más tiempo en el intestino del hámster. Si bien, la infección se prolonga en el animal inmunosuprimido, el parásito es finalmente expulsado, así mismo en los animales tratados con el esteroide pueden colectarse proglótidos en heces antes de la eliminación total de la *Taenia*.

Se obtuvieron ejemplares de *T. solium* sexualmente maduros con útero ramificado y huevos en proceso de formación de hámsteres no inmunosuprimidos, los cuales tuvieron una carga parasitaria de una *Taenia* por animal. Los ejemplares colectados de los hámsteres inmunosuprimidos tuvieron un menor desarrollo sexual, en ninguna de las taenias encontradas se observó la presencia de útero ramificado, sin embargo, en estos animales la carga parasitaria fué mayor.

La infección de *T. solium* puede estudiarse a través del tiempo por medio del ELISA para coproantígenos de *Taenia*. Mediante este ensayo son capturados como positivos sólo los animales que están infectados a partir de la primera SPI, una vez que el parásito es expulsado el ELISA se hace negativo, el grupo de hámsteres no infectados siempre se mantuvo por debajo del punto de corte. No hubo diferencias estadísticas entre las absorbancias obtenidas de animales infectados inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos, aunque la presencia de proglótidos en heces incrementa considerablemente los valores de absorbancia del ELISA para coproantígenos de *T. solium*.

Respecto a la respuesta inmune humoral contra *T. solium* se detectaron anticuerpos de clase IgG en muestras de suero y heces cuando se empleó antígeno de ES del parásito. Los anticuerpos en suero se hicieron presentes desde la primera SPI en ambos grupos de hámsteres (inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos), no hubo diferencias estadísticas entre sus valores de absorbancia. Los niveles de anticuerpos en suero dependen de la presencia del parásito, una vez que es eliminada la *Taenia* (comprobada por coproantígenos) los títulos de anticuerpos comienzan a descender. En cuanto a la respuesta inmune humoral local, sólo se detectaron coproanticuerpos de clase IgG en los animales no inmunosuprimidos a partir de la primera SPI, los títulos más altos se registraron cuando la *Taenia* fué eliminada, disminuyendo ligeramente tiempo después. En los hámsteres inmunosuprimidos la detección de coproanticuerpos de clase IgG sólo fué posible cuando se retiró el esteroide, presentando una cinética muy parecida a la desarrollada por el grupo no inmunosuprimido. El esteroide abate la respuesta inmune local contra *T. solium*.

T. solium puede liberar antígenos de ES que atraviesan la mucosa intestinal y es posible detectarlos en el suero de los hámsteres no inmunosuprimidos únicamente; los antígenos de la *Taenia* a nivel sistémico desaparecen poco antes que los coproantígenos. En animales inmunosuprimidos no hay antígenos parasitarios circulantes.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. **Agullar, L.**, (1995) Tesis de Licenciatura Efecto del esteroide acetato de metilprednisolona en el desarrollo de *Taenia solium* en el hámster dorado. (*Mesocricetus aureatus*), Fac. de Ciencias, UNAM, México.
2. **Acevedo-Hernández, A.**, (1982), Economic impact of porcine cysticercosis in Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives, Eds. Flisser, A., Willms, K., Lacleit, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F., Academic Press, N.Y., 63-67pp.
3. **Acosta, E.**, (1990), Antibodies to the metacestode of *Taenia solium* in the saliva from patients with neurocysticercosis, *J. Clin. Lab. Anal.*, 4, 90-94pp.
4. **Allan, J., Avila, G., Garcia Noval, J., Flisser, A. and Craig, P.S.**, (1990), Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection, *Parasitol.*, 101, 473-477pp.
5. **Allan, J.C. y Craig, P.S.**, (1989), Coproantigens in gut tapeworm infection: *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitol. Res.*, 76, 68-73pp.
6. **Allan, J., Craig, P.S., Garcia-Naval, J., Mencos, F., Liu, D., Wang, Y., Wen, H., Zhou, P., Stringer, R., Rogan, M. and Zeyhle, E.**, (1992), Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs in dogs and humans, *Parasitol.*, 104, 1-9pp.
7. **Almeida-Pinto, J., Veiga-Press, J.A., Stocker, A., Coetho, T., and Montero, L.**, (1988), Cysticercosis of the brain. The valor of computed tomography, *Acta. Radiol.*, 29, 625-625pp.
8. **Anders, R.F., Roberts, I.C.-Thompson & Mitchell, G.F.**, (1982), Giardiasis in mice: analysis of humoral and cellular responses to *Giardia muris*, *Parasite Immunol.*, vol. 4, 47-57p.
9. **Avila, G.**, (1992), Tesis de Maestría en Ciencias, Detección de antígenos de *Taenia solium* por un método inmunoenzimático, Fac. de Medicina, UNAM, México.
10. **Ayuya, J.M., and Williams, J.F.**, (1979) Immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniformis*. VII. Oral and parenteral immunization with parasite antigens, *Immunol.*
11. **Baveja, V.K., Arga, G., Goyle, V., Sarma, D.K. and Gupta, M.**, (1990), Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of neurocysticercosis: a preliminary report, *J. Com. Dis.*, 22, 55-59pp.
12. **Befus, A.D.**, (1975), Secondary infection of *Hymenolepis diminuta* in mice: effects of varying worm burdens in primary and secondary infections, *Parasitol.*, 71, 61-75pp.
13. **Befus, A.D.**, (1977), *Hymenolepis diminuta* and *H. microstoma*. Mouse immunoglobulines binding to the tegumental surface, *Expl. Parasit.*, 41, 242-251pp.
14. **Befus, A.D. and Featherston, D.W.**, (1974), Delayed rejection of single *Hymenolepis diminuta* in primary infections of young mice, *Parasitol.*, 69, 77-85pp.
15. **Befus, D.**, (1986), Immunity in intestinal helminth infections: present concepts, future directions, *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, 80, 735-741pp.
16. **Befus, A.D.**, (1986), Immune responses: protective immunity, adaptation and pathogenesis, in Enteric infection 2. Intestinal helminths, M.J.G. Frathing, G.T. Keusch and D. Wakelin editors, Chapman and Hall, London, 49-70pp.

17. Befus, A.D., (1993), Neuromodulation of gastrointestinal Immune and Inflammatory Responses, In The handbook of Immunopharmacology, John L. Wallace editor, Academic Press London, 1-14pp.
18. Befus, D., (1982), Mecanismos of host resistance at the mucosa-parasite interface in Parasites-Their world and Ours, edit. D.F. Mettrick and S.S. Desser, Elsevier Biomedical Press, London, 34-36pp.
19. Befus, D., (1974), The immunoglobuline coat on *Hymenolepis sp.*, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 68, 273-278pp.
20. Befus, D. and Threadgold, L.T., (1975), Possible immunological damage to the tegument of *Hymenolepis diminuta* in mice and rats, *Parasitol.*, 71, 525-534pp.
21. Berman, J.D., Beaver, P.C., Cheever, A.W. and Quindlen, E.L., (1981), Cisticercus of 60 milliliter volume in human brain, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 616-619pp.
22. Briceño, C.E., Blagi, F., and Martínez, B., (1961), Cisticercosis. Observaciones sobre 97 casos de autopsia, *Prensa Med. Mex.*, 26, 193-197pp.
23. Cho, S.Y., Kim, S.Y., and Park, A.J., (1988), Intracranial synthesis of specific IgG antibody in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients, *Korean J. Parasitol*, 26, 15-26pp.
24. Cisneros, V., Dehesa, R. and Montes, J., (1982), Dosificación de la IgE total y específica en cisticercosis humana, *Alergia (Mex)*, 29, 77-82pp.
25. Corona, T., Pascoe, D., Coanzález-Barranco, D., Abad, P., Landa, C. and Estañol, B., (1986), Anticysticercus antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 49, 1044-1049pp.
26. Correa, D., Tovar, a., Espinoza, B., Plancarte, A., and Flisser, A., (1989), Cisticercosis humana: relación Inmunológica huésped-parásito, in Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, Flisser, A., and Malagón, F., Eds., Limusa-Noriega, México D.F., 31-43pp.
27. Craig y Faust, Parasitología Clínica, Salvat Ed., 1ª ed. 1974.
28. Craig, P.S., (1986), Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay, *Parasite Immunol.* 8, 171-188pp.
29. Cruz, M., Davis, A., Dixon, H., Pawlowski, Z.S. & Proano, J., (1989). Estudios operacionales sobre el control de *Taenia solium* Taeniasis/cysticercosis in Ecuador. *Bull. WHO*, 67, 401-407pp.
30. Damonte, L.J., (1983), Desconocimiento de la epidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública México*, Vol 25, 301-305pp.
31. Daplaesa, P., Eckert, J., Pawloski, S., Machowska, L., y Gottstein, B., (1991), An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* coproantigens in humans, *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84, 392-396pp.
32. Daplaesa, P., Gottstein, B., Stingelin y Eckert, J., (1990), Detection of *Taenia hydatigena* coproantigens by ELISA in dogs, *Vet. Parasitol.*, 36, 91-103p.
33. Díaz-Camacho, S., Candil, A., Uribe, M., and Wilms, K., (1990), Epidemiological study and control of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in México, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84,

563-566pp.

34. Díaz-camacho, S., Candil, A., Suato, V., Zazueta, M.L., Félix-Medina, M., Lozano, R., and Willms, K., (1991), Epidemiological study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45, 522-531,pp

35. Dixon, H.B.F. and Lipscom, F.M., (1961), Cysticercosis an analysis and followup of 450 cases, *Privy Council Med. Res. Special Rep. Ser.*, 229, 1-58pp.

36. Escobar, A. and Nieto, D., (1972), Parasitic diseases in Pathology of the Nervous system, Vol.3, Mnckler, J., Ed; McGraw Hill, N.Y., 2507-2515pp.

37. Espinoza, B., Ruiz-Palacios, g., Tovar, A., Plancarte, A., and Flisser A., (1986), Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in the patients with neurocysticercosis ans its application in immunodiagnosis, *J. Clin. Micro.*, Oct, 536-541pp.

38. Espinoza, B., Flisser, A., Plancarte, A., and Larraide, C., (1982), Immunodiagnosis of human cysticercosis : ELISA and immunoelectrophoresis, in *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Flisser,A., Willms,K, Lactlett,J.P., Larraide,C., Ridaura,C. and Beltrán, F. Eds., Academic Press, N.Y., 163-170pp.

39. Feldman, M., Plancarte, A., Sandoval, M., Wilson M. and Flisser A., (1990), Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the siagnosis of neurocysticercosis, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84, 559-562pp.

40. Fientje, B. and Padelt, H., (1981), Wertener Serologischen Diagnostik der *Taenia saginata* infestation des Menschen *Angewandte Parasitologie*, 22, 65-68pp.

41. Flisser, A., Plancarte, A., Correa, A., (1990), New approaches in *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65, 95-98pp.

42. Flisser, A. (1994), Taeniasis and Cysticercosis due to *T. solium*, in *Process of Clinical Parasitology*, Tsich,S. Eds., CRC Press Inc. N.Y., 77-116pp.

43. Flisser, A. (1988), Neurocysticercosis in México, *Parasitol. Today*, Vol 4, No.5, 22-25pp.

44. Flisser, A., Tarrab, R., Willms, K., Larraide, C., (1975), Inmunolectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana, *Arch Inves Med (Mex)*, 6, 1-12pp.

45. Flisser, A.a. (1980), The Immunology of human cysticercosis, in *Molecules, Cells and Parasites in Immunology*, Larraide, C., Willms, K., Ortiz, L., and Sela, M., Eds., Academic Press, N.Y., 125-143pp.

46. Flisser, A., Rivera, L., Trueba, J., Espinoza, B., Yakoleff-Greenhouae, V., Sierra, A., and Larraide, C., (1982), in *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Flisser,A., Willms,K, Lactlett,J.P., Larraide,C., Ridaura,C. and Beltrán, F. Eds., Academic Press, N.Y.

47. Flisser, A.b, Woodhouse, E. and Larraide, C., (1980), Human cysticercosis: antigens, antibodies, and no-responders, *Clin. Exp. Immunol.*, 39, 27-37pp.

48. Flisser, A., Espinoza, B., Tovar, A., Plancarte, A., and Correa, M.D., (1986), Host-parasite relationship in cysticercosis: Immunologic study in different compartments of the host, *Vet. parasitol.*, 20, 95-202pp.

49. Flisser, A., (1987), Relación huésped-parásito en la cisticercosis humana y porcina. *Gac. Med. Mex.*, 123, 157-162pp.
50. Flisser, A., Plancarte, A., Avila, G., (1994) Aplicacion de metodos de diagnostico de cisticercosis y teniasis a estudios epidemiologicos, *Rev Fac Med, UNAM*, Vol. 37, No. 2, 82-91p.
51. Flisser, A., (1995) *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*, in Enteric Infection 2. Intestinal helminths, edited by M.J.G. Farthing, G.T. Keusch and D. Wakelin, Chapman and Hall, London, 173-189pp.
52. Garside, P. and Bohne, J.M., (1988), *Ancylostoma ceylanicum* in the hamster: observations on the host parasite relationship during primary infection, *Parasitol.*, 98, 283-289pp.
53. Gemmell, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E.J.L., (1983), Guidelines for surveillance prevention and control of Taeniasis/Cysticercosis, WHO, VPH/83.49, Génova, 23-32pp.
54. Gnezdilov, V.G., (1957), The golden hamster (*Mesocricetus auratus* waterhouse) as potential definitive host of tapeworm *Taenia solium*, *Zoologicheski Zhurnal*, 36, 1770-1773pp.
55. Gobert, J.G., (1993), Determination of anti-*Cryptosporidium* coproantibodies by time resolved immunofluorometric assay, *Trans. R Soc Trop Med Hyg*, 87 (3), 330-332pp.
56. Godorezky, C., Díaz, M.L., Escobar, A., and Flisser, A., (1987), IgE concentration in serum of patients with neurocysticercosis, *Arch. Invest. Med. (Mex)*, 18, 225-227pp.
57. Goldberg, A.S., Heiner, D.C., Firemark, A.M., and Goldberg, M.A., (1981), Cerebrospinal fluid IgE and the diagnosis of cerebral cysticercosis, *Bull. Los Angeles Neurol. Soc.*, 46, 21-25pp.
58. Gottstein, B., Zinni, D. and Shantz, P.M., (1986), Species specific immunodiagnosis of *T. solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting, *Trop. Med. Parasitol.*, 38, 299-303pp.
59. Green, E.L., Miles, M.A. y Warhust, D.C., (1985) immunodiagnostic detection of Giardia antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay, *Lancet*, 28, 691-693pp.
60. Grogl, M., Estrada, J.J., McDonald, G., and Kuhn, R.E., (1985), Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis, *J. Parasitol.* 71, 433-442pp.
61. Grundy, M.S., Voller, A. and Warhust, D.C., (1987), An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Entamoeba histolytica antigens in faecal material, *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 627-632p.
62. Hall, A., Latham, M.C., Crompton, D. W.T. & Stephenson, L.S., (1981). *Taenia saginata* with the polymerase chain reaction. *Trans. of Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 85, 248-259pp.
63. Haneberg, B. and Aaskog, D., (1975). Human faecal immunoglobulins in healthy infants and children, and in some with diseases affecting the intestinal tract or the immune system, *Clin exp Immunol.*, 22, 210-222pp.
64. Hanson, L.A., Ahlstedt, S., Andersson, B., Carlsson, B., Cole, M.F., Cruz, J.R., Dahlgren, U., Ericson T.H., Jalli, F., Khan, S.R., (1983). Mucosal immunity, *Annals New York Academy of Sciences.* 1-21pp.

65. Harrison, W.G. and Turton, J.A., (1973), Antibody response to tape worm (*Hymenolepis diminuta*) in rat, *Nature*, Vol. 246, Dec. 21/28, 521-522pp.
66. Heath, D.D., Lawrence, S.B., Glennie, A. and Twaalfhoven, H., (1985), The use of ES antigens of the scolex of *Taenia ovis* for the serodiagnosis of infection in dogs, *J. Parasit.*, vol. 71, No. 2, 192-199pp.
67. Herd, R.P., Chappel, R.J. Biddell, D., (1975) Immunization of dogs against *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigens, *Int J Parasitology*, Vol 5, , 395-399pp.
68. Herrera, L.A., Santiago, L., Rojas, G., Salazar, P.M., Tato, P., Molinari, J.L., Schiffmann, D., Ostrosky, P., (1994), Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacystode. *Mutation Res.* , 305, 223-228pp.
69. Heyworth, M.F., (1986), Antibody response to *Giardia muris* Trophozoites in Mouse intestine, *Infection and Immunity*, vol. 52, No. 2, 568-571pp.
70. Hill, B.D., Blewett, D.A., Dowson, A.M., Wright, S., (1990), Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*, *Res. in Vet. Sc.* vol. 48, 76-81pp.
71. Hopkins, C.A., (1980) Immunity and *Hymenolepis diminuta*, in *Biology of the tapeworm Hymenolepis diminuta*, H. Arai ed., Academic Press. London and New York, 551-614pp.
72. Ito, A. & Smyth, J.D., Immunology of the lumen dwelling cestode infections. In immune responses in parasite infections: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, vol II, Trematodes and Cestodes, ed. E.J.L. Soulsby, 115-163pp, CRC Press Inc., Boca Raton, I.L.
73. Ito, A., (1984) *Hymenolepis nana* worm recovery from congenitally athymic nude and phenotypically normal rats and mice, *Exp. Parasitol.*, 58, 132-137pp.
74. Ito, A. and Kamiyama, T., (1985), Thymus dependency of induced immune response against *Hymenolepis nana* (cestode) using congenitally athymic nude mice, *Clin Exp Immunol*, 60, 87-94pp.
75. Jena, A., Sanchete, P.C., Gupta, R.K., Khusku, S., Chandra, R., and Lakshmi pathi, N., (1988), Cysticercosis of the brain shown by magnetic resonance imaging, *Clin. Radiol.*, 39, 542-546pp.
76. Jenkins, D.J. and Rickard, D.M., (1986), Specific responses in dogs experimentally infected with *Echinococcus granulosus*, *Am J Trop Med Hyg.* 35(2), 345-349p.
77. Kamiya, M. and Sato, H., (1990), Survival, strobilation and sexual maturation of *Echinococcus multilocularis* in small intestine of golden hamster, *Parasitol.*, 100, 125-130pp.
78. Kapel, N., Meillet, D., Buraud, M., Favence, L., Mayne, D., Gobert, J.G., (1993) Determination of anti-*Cryptosporidium* coproantibodies by time-resolved immunofluorometric assay, *Trans R Soc Trop Med Hyg.* May-Jun, 87(3), 330-332pp.
79. Keilbach, N.M., de Aluja, A.S., and Sarti, E., (1989) A programme to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*): experiences in a Mexican village, *Acta Lidensia*, 57, 181-189pp.
80. Lacleit, J.P., Ornelos, Y., Merchant, M.T. and Willms, K., (1982), Ultrastructure of surrounding envelopes of *T. solium* eggs, in *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Fliesser, A., Willms, K., Lacleit, J.P., Larraalde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. Eds., Academic Press, N.Y., 281-305pp.

81. Lamothe, R., García, L., (1985), Céstodos parásitos del hombre, en Prevención y control de enfermedades transmisibles, *Salud Pública*, 27:419-435pp.
82. Langley, R.J. and Hyllier, G.V., (1989) Detection of circulating immune complexes by enzyme-linked immunosorbent assay in sera from cattle infected with *Fasciola hepática*, *J. Parasitol.*, 75 (5), 690-695pp.
83. Lara-Aguilera, R., Mendoza, J.F., Martínez-Toledo, J.L., Macías-Sánchez, R., Willms, K., Altamirano, L., and Santamaría, A., (1992) *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican rural family, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46, 85-88pp.
84. Larraide, C., Montoya, R.M., Sc lutto, E., Díaz, M.L., Govedonky, T., and Coltorti, E., (1984) Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with serum from neurocysticercosis and hydatid disease patients, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78, 492-496pp.
85. Lightowers, M.W., Rickard, M.D., (1988). Excretory-Secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses, *Parasitol.*, 96.
86. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, L.A. and Randall, L.J. (1951) Protein measurement with the Folinphenol reagent, *T. Biol. Chem.*, 193, 265-275pp.
87. Loyd, S., (1979) Homologous and heterologous immunization against the metacestodes of *Taenia saginata* and *T. taeniaeformis* in cattle and mice, *Z. Parasitkde*, 60, 87
88. Lumsden, R.D. and Hildreth, M.B., (1983), The Fine Structure of Adult Tapeworms, in *Biology of The Cestoda*, C. Arne and P.W. Pappas editors, Vol. 1, Academic Press, 1983, 177-233pp.
89. Maas, M., Delgado, E., Knolbolch, J., (1992) Isolation of an immunodiagnostic *Taenia solium* coproantigen, *Trop Med Parasitol*, Sep. 43(3), 201-202pp
90. Machnicks, B. and Zwierz, C., (1974), The immunological reactivity of the sera people infected with *Taenia saginata* to cysticercus bovis antigens, *Bull. Acad. pol. Sci. Ser. Sci. tech.*, 22, 259-261pp.
91. Machnika, B., (1974) Studies on antigens common to *Cisticercus bovis* and *Taenia saginata*, in E.J.L. Soulsby ed., *Parasitic Zoonoses*, Academic Press, N.Y., 213-222pp.
92. Mahammad, I.N., Aseiner, D.C., Miller, B.C., Goldberg, M.A. and Kagan I.C., (1984), ELISA for diagnosis of cerebral cysticercosis *J. Clin. Microbiol.*, 20, 775-779pp.
93. McManus, D.P., García, E., Zepeda, Reis, A., Rishi, A.K. and Flisser, A. (1989) Human cysticercosis and taeniasis: molecular approaches for specific diagnosis and parasite identification, *Acta Leidensia*, No. 2, 81-91pp.
94. Miller, B.L., Helner, D. and Goldberg, M.A., (1983), The Immunology of cerebral cysticercosis, *Bull. Clin. Neurosis.*, 48, 18-23pp.
95. Minguetti, G. and Ferreira, M.V.C., (1983), Computed tomography in neurocysticercosis, *L. Neurol. Psychiat.*, 46, 936-942pp.
96. Mitchell, G.F., (1982), Effector mechanisms of host-protective immunity to parasites and evasion by parasites, in *Parasites-Their World and Ours*, Edited by D.F. Mettrick and S.S. Dessers, Elsevier Biomedical Press, 24-33pp.

97. **Monisov, A.A.**, (1966). On the problem of the perfecting the method of questioning the population on *Taeniarrynchus* infection. *Medinskaya Parazitologia Parazitanye, Bolezni*, 35, 105-129.
98. **Monroy-Ostría A., Gómez, J.L., Ramírez, A. y Carrillo, G.**, (1992). Reconocimiento por inmunoelectrotransferencia de antígenos de *Taenia solium* y su larva. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 34, 33-38pp.
99. **Monroy-Ostría, A., Monroy-Ostría, T.J., Gómez, G., Hernández, M.O.**, (1993). Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 35, 91-98pp.
100. **Moses, A.**, (1911) Dos métodos biológicos de diagnóstico de cisticercosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3, 322-326pp.
101. **Neutra, M.R. and Kraehenbuhl, J.P.**, (1992), Transepitelial transport defence I: the role of M cells. *Trends in cell Biology*, Vol. 2, May, 134-138pp.
102. **Neutra, M.R., Phillips, T.L., Mayer, E.L., Fishkind, D.J.**, (1987), Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res.*, 247, 537-546pp.
103. **Oshijima, H., Shijozaki, T., Kitamura, T.**, (1989), Detection of rotavirus coproantibodies by immunoblotting technique. *J Med Virol.* 29(2), 127-129p.
104. **Pathak, K.M.L. and Gaur, S.N.S.** (1985) Effect of immunosuppressants and antihistaminics on the development of *Taenia solium* in golden hamsters. *Indian J Vet Med*, Vol. 5, No. 1, 10-12pp.
105. **Parkhouse, R.M.E. and Harrison, J.S.**, (1989) Antigens of parasitic helminths in diagnosis. protection and diagnosis. *Parasitol.*, 99, 5-19pp.
106. **Pawloski, Z.S.**, (1990), Perspectives on the control of *Taenia solium*. *Parasitol. Today*, 6, 371-373.
107. **Peeters, J.E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vanderghesynst, D., Naciri, M., Ares-Mazas, E., Yvone, P.**, (1992), *Cryptosporidium parvum* in calves: Kinetics and immunoblot Analysis of Specific Serum and local antibody responses (Immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Am Soc for Microbiology*, Vol. 60, No. 6, 2309-2316pp.
108. **Piñacarte, A., Espinoza, B., and Flisser, A.**, (1987), Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's Nerv. Syst.*, 3, 203-205pp.
109. **Rabiela, M.T., Lombardo, L., and Flores, F.**, (1972) Cisticercosis cerebral estudio de 68 casos de autopsia. *Patología (Mex)*, 10, 27-40pp.
110. **Rabiela, M.T., Rivas, A., Castillo, S., and Cancino, F.**, (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. in *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Flisser, A., Williams, K., Lacleit, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. Eds., Academic Press, N.Y., 179-200pp.
111. **Rabiela, M.T., Rivas, A. and Flisser, A.**, (1989), Morphological types of *Taenia solium* cysticercosis. *Parasitol. Today*, 5, 357-359pp.
112. **Rajasekariah, G.R., Dhage, K.R., Bose, S. and Deb, N.**, (1987) Human *Necator americanus* in the intestines of young adult hamsters. *J. Parasitol.*, 73, 1252-1254pp.
113. **Ramos, O.M., Stiebel-Chin, G., Aiman, N. and Duehowny, M.**, (1986). Diagnosis of neurocysticercosis

by magnetic resonance imaging, *Pediatric Infect. Dis.*, 5, 470-473pp.

114. Ray, D.K., Bophale, K.K. and Shrivastava, V.B., (1972), Migration and growth of *Acylostoma ceylanicum* in golden hamster *Mesocricetus auralus*, *J. Helminthol.*, 46, 57-62pp.

115. Rickard, M.D. and Brumley, J.L., (1981), Immunization of calves against *Taenia saginata* infection using antigens collected by in vitro incubation of *T. saginata* oncospheres or ultrasonic desintegration of *T. saginata* and *T. hydatigena* oncospheres, *Res Vet. Sci.*, 30, 99-103pp.

116. Rickard, M.D., (1983), Immunity, in *Biology of Eucestoda*, C. Arme and P.W Pappas ed., Vol 2, Academic Press, 539-580p.

117. Rim, H.J. and Joo, K.H., (1989), Clinical evaluation of the therapeutic efficacy of praziquantel against human cysticercosis, *Acta Leidensia*, 57, 235-245pp.

118. Ritchie, L.S., (1948) An ether sedimentation technique for routine stool examinations, *Bull. US. Army Med Dept*, 8.

119. Rodríguez-Carbajal, J., and Balseaga-Durán, B., (1982), Neuroradiology of human cysticercosis, in *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Flisser, A., Willms, K., Lactlett, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. Eds., Academic Press, N.Y.

120. Sato, H. y Kamlya, H., Oku, Y., Kamlya, M., (1994), Infection course of the strobilar stage of *Taenia crassiceps* in golden hamsters, with reference to host response, *Parasitol Research*, 80, 99-103pp.

121. Sato, H. and Kamlya, M., (1989) Viable egg production of *Taenia crassiceps* developed in the intestine of prednisolone-treated golden hamster, *Jpn. J. Parasitol.*, 38, 46-53pp.

122. Sarti, E.J.-Gutiérrez, Schantz, P.M., Lara-Agullera, R., Gómez, H., Flisser, A., (1988) *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village, *Trop. Med. Parasit.*, 39, 194-198pp.

123. Sarti, E.J., Shantz, P.M., Plancarte, A., Wilson, M., Gutiérrez, O., Agullera, J., Roberts, J., and Flisser, A., (1994), Epidemiologic investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in rural village of Michoacán State, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88, 49-52pp.

124. Scott, P. A. and Sher, A., (1993), Immunoparasitology in *Fundamental Immunology*, edited by William E. Paull, third ed., Raven Press, New York, 1179-1210p.

125. Schenone, H., Villarreal, F., Rojas, A., and Ramírez, R., (1982), Epidemiology of human cysticercosis in Latin America, in *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Eds. Flisser, A., Willms, K., Lactlett, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F., Academic Press, N.Y., 25-38pp.

126. Schmidt, G.D., and Roberts, L.S., (1989), *Foundation of Parasitology*, C.V. Mosby, St. Louis, 354-379pp.

127. Shantz, P. M. and Sarti, J.E., (1989), Diagnostic methods and epidemiological surveillance of *Tenia solium* infection, *Acta Leidensia*, 57, 153-163pp.

128. Smyth, J.D. and Mcmanus, D:P., (1989), *The physiology and Biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press. Great Britain, 1-34pp.

129. Snider, P.D. and Underdown, B.J., (1986), Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*, *Infection and Immunity*, vol. 52, No.

1, 271-278pp.

130. Tsang, V.C.W., Brand, J.A. and Boyer, A.E., (1989), An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis human cysticercosis (*Taenia solium*), *The J. of Infect. Diseases*, vol 159, No. 1, 50-59pp.

131. Trejo, V. (1986) Caracterización del embrióforo del huevecillo de *Taenia solium*, Tesis, Fac. de Ciencias, UNAM, Mex.

132. Velasco M., Bravo, A.-Becherolle, Quirasco, F., (1982) Human cysticercosis: medical-social implication and economic impact in Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives, Flisser, A., Willms, K., Lactlett, J.P., Larraide, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. Eds., Academic Press, N.Y., 47-51pp.

133. Verster, A., (1971), Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linneus, 1758 y *Taenia saginata* Goeze, 1782., *Onderspoort J. Vet. Res.*, 38(1), 63-64pp.

134. Verster, A., (1974), The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*., *Onderspoort J. Vet. Res.*, 41, 23-28pp.

135. De Vos, T. and Dick, T.A., (1991), A rapid method to determine the sotype and specificity of coproantibodies in mice infected with *Trichinella* or fed cholera toxine, *J. Immunological Met.*, 141, 285-288pp.

136. Walker, W.A and Isserbalcher, K.J., (1977), Intestinal antibodies, *Physiology in Medicine*, vol. 27, No. 14, 767-773pp.

137. Wedrychowicz, H., Abbet, E.M., Holmes, P.H., (1984) Use of coproantibody measurement to assess the influence of diet on local immune responses of sheep vaccinated against *Haemonchus contortus*, *Res in Vet Science*, 36, 240-246pp.

138. Willms, K., Merchant, M.T., (1980), The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations, *Parasite Immunol.*, 2, 261-375pp.

139. Williams, J., (1979), Recent advances in the immunology of cestode infections, *J. Parasitol.*, Vol. 65, No. 3, 337-349pp.

140. Wilson, M., Bryan, R.T., Fried, J.A., Ware, D.A., Shantz, P.M., Pilcher, J.B. and Tsang, V.C.W., (1991), Clinical evaluation of cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients of neurocysticercosis, *J. Infect. Dis.*, 164, 1007-1009pp.

141. Ximénez, C., Hernández, H., Melendro, E.I. y Ramiro, M., (1990), Coproanticuerpos y anticuerpos séricos ambientales en la amebiasis intestinal aguda, *Arch. Inv. Med. México*, vol. 21, No. 1.

142. Yoshino, K. (1933), Studies on the post-embryonal development of *T. solium*. Part II. On the migratory course of the oncospheroa of *T. solium* within intermediate host. *J. Med. Assn. Formosa*, 32, 155-158pp.

143. Yoshino, K., (1934), On the evacuation of eggs from detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on the structure of its eggs, *Taiwan Igakkai Zasshi*, 33, 47-58pp.