

00381

36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado.

LA
INTERFASE CELULAR DEL CISTICERCO DE
TAENIA CRASSICEPS CON SU
HUESPED MURINO.

T E S I S
Que para obtener el Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
p r e s e n t a
M. en C. JOSE ALEJANDRO / PADILLA TREJO

Director de Tesis:
DR. CARLOS LARRALDE RANGEL

México, D. F.

Año 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicada:

*A mi esposa Claudia y mis hijos Alejandro y Erilio:
Por darte más vida a mi vida.*

*Al Dr. Larralde:
Por inculcarme el gusto de investigar por conocer.*

*A la memoria del Dr. Jaime Martínez Medellín y a la del Dr. Lino Díaz de León:
Quienes alentaron e impulsaron mi carrera académica.*

Agradecimientos:

A los Doctores:

Rafael Bojalil Parra

Edmundo De Ibis Lamoyi Velázquez

Abraham Landa Piedra

Carlos Larralde Rangel

Ana Flisser Steinbruch

Fernando García Tamayo

Marta Catalina Romano Pardo

Por sus sugerencias y críticas en el diseño experimental y a la redacción de esta tesis.

Agradezco a mis compañeros, maestros y amigos, quienes con su labor profesional apoyaron la elaboración de mi trabajo experimental y de mi tesis:

Gerardo Arreguín, Marco Bonilla, Carlos Castellanos, Patricia de la Torre, Victoria Domínguez, Gladis Fragoso, Claudia Garay, María Eugenia Gonsebatt, Tziipe Govezenky, Maricela Hernández, Luis Felipe Jiménez, Juan Pedro Lactette, Libia Loyo, José Luna, Raúl Mancilla, Horacio Merchant, Miguel Morales, Angel Oliva, Enrique Ortega Soto, Antonio Ramírez, Jesús Ramírez, Patricia Ramírez, Gabriela Rosas, Rafael Saavedra, Edda Sciuotto, Ignacio Terrazas, José Vázquez Talavera y Mónica Viveros.

Un agradecimiento especial a:

José Aviléz (Fotografía)

Ismael Ramírez Jiménez (Preparaciones histológicas y tinciones)

Enrique Vázquez (Dibujo)

Finalmente, agradezco el apoyo incondicional de mis familias, los Padilla y los González y de mis amigos y amigas: Nacho, Alberto, Carlos, Vio, Tziipe, Vicky, Claudia, Fabiola, Moni, Erika P, Mary, Erika y Doña Chuchita; quines además de ayudarme; han festejado y sufrido mis logros y tropiezos profesionales y familiares.

ÍNDICE:

Resumen	2
Abstract	4
Introducción	5
Neurocisticercosis	5
El modelo de cisticercosis por <i>Taenia crassiceps</i>	6
Inmunología de la cisticercosis	7
Respuesta inflamatoria	7
Inmunidad celular	8
Inmunidad humoral	9
Complemento	10
Planteamiento de la investigación	10
Objetivos	11
Artículo	13
EVANESCENT INFLAMMATORY INFILTRATE AND ODD- LOOKING CELLS IN MICE PERITONEAL CAVITY INFECTED WITH <i>TAENIA CRASSICEPS</i> CYSTICERCI.	
Material y Métodos	35
Resultados	36
Discusión Adicional	39
Apéndice I: Estructura del cisticerco	45
Apéndice II: Reproducción de helmintos parásitos	49
Bibliografía	52

RESUMEN:

Cambios en los leucocitos de la cavidad peritoneal ocurren inmediatamente después de la infección con cisticercos de *T. crassiceps*. Los basófilos, neutrófilos, macrófagos y monócitos fueron escasamente reclutados, y fueron las primeras poblaciones en disminuir, seguidos por los linfocitos que descendieron después de la sexta semana. Los eosinófilos fueron la principal población inflamatoria infiltrada, aumentaron rápidamente hasta la octava semana y después descendieron sin desaparecer. En la infección tardía cuando el volumen de parásitos puede igualar el peso del ratón, los cisticercos crecen acompañados de escasas células inflamatorias.

Conviviendo con el exudado inflamatorio encontramos una significativa población de células de apariencia extraña, que pueden ser de origen mesotelial u originadas por el parásito. Estas células son a menudo multinucleadas, tienden a formar agregados y cuando son mantenidas en cultivo *in vitro* formaron estructuras quísticas, son autofluorescentes, hibrida ron con DNA del cisticerco de *T. crassiceps* y fijaron anticuerpos dirigidos contra los cisticercos de *T. crassiceps*.

Cuando el exudado peritoneal es reinyectado en ratones sanos, las células extrañas son capaces de sobrevivir por meses, induciendo una respuesta inmune contra los antígenos de *T. crassiceps* e inmunidad protectora a posteriores desafíos con cisticercos.

Los cisticercos de *T. crassiceps* mantenidos en cultivo *in vitro*, liberan células al medio de cultivo, morfológicamente similares a las células extrañas observadas en la cavidad peritoneal de los ratones infectados.

Los hallazgos sugieren que los cisticercos *T. crassiceps* liberan células a la cavidad peritoneal de los ratones, nosotros encontramos unas células de apariencia extrañas que podrían originarse del parásito, sin embargo morfológicamente no las podemos diferenciar de las células mesoteliales del huésped, que pudieran participar en el rechazo del parásito. Por sus propiedades inmunogénicas y antigénicas estas células extrañas pudieran estar involucradas en la confrontación huésped-parásito, principalmente en la infección temprana.

ABSTRACT

Changes in the leukocyte population of the peritoneal cavity ensue immediately after infection with *Taenia crassiceps* metacestodes. Basophils and neutrophils rapidly decrease whilst macrophages, monocytes and lymphocytes increase to reach only modest levels by 6 weeks and then progressively diminish to nearly disappear by 15 weeks, when the parasite begin rapid reproduction. Eosinophils also appear early in infection but then abate to lower levels that persist longer than do the other leukocytes. Thus, in late massive infections, when the mass of cysticerci may equal that of the mouse, the cysticerci grow amongst surprisingly few inflammatory cells. However, mingling with the peritoneal inflammatory cells a significant number of odd-looking cells are identified, that could correspond to host's metaplastic mesothelial cells or be of parasite origin. These cells are often multinucleated and tend to aggregate in varigerated clusters and form cystic structures *in vitro*; they also bind specific anti-*T. crassiceps* antibodies onto their surface and specific *T. crassiceps* DNA-probes in their nuclei. When the peritoneal cell exudate is reinjected intraperitoneally into naive mice the odd-looking cells subsist for months, inducing in the host the synthesis of specific anti-*T. crassiceps* antibodies as well as immune resistance to challenge, but do not reassemble into cysticerci even after six months of inoculation as do other isolated cysticercus cells. The early appearance and the immunogenic and antigenic properties of these odd-looking cells suggest they are important protagonists in the early host-parasite confrontation when the outcome of infection is set.

INTRODUCCIÓN:

La neurocisticercosis humana (NCC) es una enfermedad causada por la larva de la *Taenia solium*, en la que el parásito se aloja y causa lesiones al sistema nervioso central (Nieto 1982), que se asocian con diferentes manifestaciones patológicas, debidas a la combinación de la respuesta inflamatoria, la topografía de la lesión, el número de parásitos y en muchos casos la secuela de infestaciones previas. La sintomatología de la NCC puede variar desde una alteración neurológica discreta, hasta la más dramática alteración cerebral, causando hasta la muerte a los enfermos (Madrado 1989, y Shriqui 1992).

La NCC es una enfermedad prevalente en muchos países (Roman *et al.*, 2000), es común en toda Latinoamérica, (de Kaminsky RG 1991 Chequer *et al.*, 1990. Schenone *et al.*, 1982) exceptuando Argentina. Se encuentra en Asia (PathaK KM 1989), África (Dumas *et al.*, 1990), Australia (Mc Dowell *et al.*, 1990), y en algunos países de Europa (García-Albea 1989). En México es una enfermedad importante, en la población abierta la seropositividad va desde 1.2 % (Larralde *et al.*, 1992) hasta 10.8 % (Sarti *et al.*, 1992; 1994), recientemente se encontró un 12.2 % en un grupo de soldados de población urbana (García-García *et al.*, 1999). La presencia de anticuerpos en estas personas sugiere que han tenido contactos con la *T. solium*, por lo que se consideran estar en riesgo de contraer NCC. La NCC en México es la causa principal de epilepsia tardía (Del Brutto *et al.*, 1988), de neurocirugía en instituciones especializadas (Zenteno 1965), y se ha encontrado entre el 2 y 3 por ciento de las necropsias (Rábiela 1979, Albores-

Saavedra. 1971).

EL MODELO DE CISTICERCOSIS POR *Taenia crassiceps*

Un modelo experimental de cisticercosis permite explorar hipótesis que serían imposible probar en seres humanos, así también el estudio de la relación huésped-parásito en estos modelos permite conocer fenómenos que posiblemente pueden extrapolarse a la cisticercosis humana. La *T. crassiceps* tiene como huésped definitivo a los zorros y otros caninos y como huésped intermediario a roedores principalmente ratones (Freeman 1962) (información más detallada acerca del ciclo de vida de *T. crassiceps* se encuentran en la introducción del artículo de esta tesis). La elección y utilización del modelo de cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* se debe principalmente a las siguientes características: Los cisticercos de *T. crassiceps* tienen gran similitud antigénica con *T. solium*, por lo que sus componentes antigénicos se han propuesto como un sustituto de los antígenos de *T. solium* en el inmunodiagnóstico de NCC (Larralde *et al.*, 1990). Se ha observado la capacidad de protección cruzada de las mezclas antigénicas de *T. solium*, en la cisticercosis murina de *T. crassiceps*, por lo que ahora se estudia la protección de la cisticercosis porcina causada por *T. solium* con los antígenos de *T. crassiceps* (Cruz-Revilla *et al.*, 2000). Estos cisticercos han sido usados exitosamente para el estudio de la cisticercosis ocular, inoculando estos parásitos en uno de los globos oculares de conejos (Cardenas *et al.*, 1989). Los cisticercos de *T. crassiceps* pueden perpetuarse fácilmente a través de inoculaciones sucesivas en ratones, que desarrollan grandes cargas parasitarias, el tamaño

macroscópico de los cisticercos permite contarlos y medirlos para hacer evaluaciones más precisas (Freeman 1962). Además, aunque no es frecuente, han aparecido casos de personas infectadas por cisticercos de *T. crassiceps*, en las que ha causado principalmente cisticercosis muscular y ocular, estos pacientes se han caracterizado por ser personas inmunocomprometidas o personas con SIDA, en las que la cisticercosis por *T. crassiceps* aparece como un agente oportunista (Freeman *et al.*, 1973; Shea *et al.*, 1973; Klinker *et al.*, 1992; Arocker-Mettinger *et al.*, 1992; Francois *et al.*, 1998).

INMUNOLOGÍA DE LA CISTICERCOSIS

La NCC es una enfermedad dinámica en la que se mezclan factores socioeconómicos y biológicos del huésped como la heterogeneidad de la respuesta inmune y la sintomatología con factores del parásito como el número de cisticercos desde uno hasta infecciones masivas o el cisticerco recemoso que se presenta en un tercio de los casos de NCC (Flisser *et al.*, 1997).

Respuesta inflamatoria:

En los pacientes de NCC la respuesta inflamatoria en contra de los cisticercos, es pequeña cuando existe, pero generalmente está ausente (Escobar 1983), fenómenos inflamatorios semejantes se han observado en cerdos cisticercosos, que se han infectado de manera natural y experimental (de Aluja *et al.*, 1988).

En los cerdos infectados es frecuente observar cisticercos rodeados por una cápsula de células gigantes, formadas al parecer por macrófagos del huésped. Los neutrófilos y basófilos generalmente no se encuentran en las zonas cercanas al parásito, los eosinófilos son el grupo de células que aparece constantemente (de Aluja *et al.*, 1988), estas características de la respuesta inflamatoria también se han observado en *T. crassiceps*, (Good *et al.*, 1982) y *T. taeniaeformis* (Mitchell *et al.*, 1982).

Inmunidad celular:

Se ha observado que la inmunidad celular de los enfermos de NCC está disminuida, esto se ha determinado al medir la respuesta en piel a los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD derivado de proteína purificada) y al estudiar la proliferación blastoide de linfocitos T estimulados con fitolaca americana, fitohemaglutinina, y concanavalina A (Flisser *et al.*, 1982). Los estudios de las poblaciones celulares y citocinas en el líquido cefalorraquídeo de los enfermos de NCC, han encontrado una respuesta inmune mediada por una heterogeneidad de poblaciones celulares y citocinas del tipo Th1 y Th2 con predominancia de respuesta Th1 y la citocina IL-12 incrementada (Restrepo *et al* 1998).

Estudios con la cisticercosis de *T. crassiceps* señalan, que la respuesta inmune celular se inhibe durante la infección, al medir la disminución de la hipersensibilidad retardada en el cojinete plantar de los ratones, en respuesta a antígenos del cisticerco (Bojalil *et al* 1993). Resultados similares se han

encontrado en *T. taeniaformis* (Williams *et al* 1982). (para más información ver la introducción y la discusión del artículo de esta tesis).

Inmunidad humoral:

Muchos de los enfermos de NCC responden contra la presencia del parásito sintetizando anticuerpos en contra de los antígenos del cisticerco. Los anticuerpos detectados son principalmente de tipo IgG seguidos por IgM y en algunos casos se detectan anticuerpos de tipo IgA e IgE (Flisser *et al.*, 1982; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 1996). Sin embargo es también conocido que una fracción importante de enfermos de NCC no sintetiza anticuerpos en contra del cisticerco (Ramos-Kuri *et al.* 1992), la falta de anticuerpos se ha relacionado principalmente con el número de parásitos y el estado del desarrollo o degeneración de los parásitos (Sotelo 1985). Sin duda la inmunología humoral de la cisticercosis es la más conocida lo que ha permitido su aplicación al inmunodiagnóstico NCC (Flisser *et al.*, 1988)

Estudios de inmunidad humoral en el modelo murino de *T. crassiceps*, han mostrado que existe una relación directa entre el número de parásitos y el título de anticuerpos circulantes. Se sospecha que la respuesta inmune humoral no esta involucrada directamente en la protección del huésped contra el parásito (Sciutto *et al.*, 1990).

Complemento:

Las proteínas del complemento juegan un papel relevante en la eliminación temprana de los agentes infecciosos. Se conoce que el cisticerco ha desarrollado mecanismos de evasión a través de la paramiosina que interaccionan con la proteína C1q inhibiendo la vía clásica del complemento (Laclette *et al.*, 1990). También los antígenos del cisticerco podrían inhibir la vía alterna del complemento, a través de residuos glucosídicos en sus proteínas, ya que los residuos de ácido siálico en las proteínas del cisticerco podrían inhibir la activación de C3b en la vía alterna del complemento (Williams *et al.*, 1980).

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Investigamos la magnitud de la respuesta inflamatoria, y el desarrollo de los metacéstodos en la cavidad peritoneal de los ratones infectados experimentalmente con cisticercos de *T. crassiceps* (más información acerca de la biología y la relación huésped-parásito de *T. crassiceps* se encuentra en la introducción del artículo de esta tesis). Pensamos que la participación de la respuesta inflamatoria temprana, es un importante protagonista para la protección del huésped, que podría definir la eliminación o la instalación del parásito. Este es el primer trabajo en este parásito, que explora los eventos muy iniciales en la infección temprana del huésped y del parásito. Encontramos que el huésped fue capaz de montar una respuesta inflamatoria tempranamente, que desvanece conforme la infección avanza. Además presentamos evidencias de la existencia de unas células de apariencia extraña, que conviven con el exudado inflamatorio, que aquí trataremos de definir y describir.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Investigar el tipo y frecuencia de las células de la respuesta inflamatoria y la evolución de los metacéstodos en la cavidad peritoneal de los ratones infectados intraperitonealmente con cisticercos de *T. crassiceps*.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

Describir morfológicamente las poblaciones celulares de la cavidad peritoneal de los ratones infectados participantes en la respuesta inflamatoria temprana (desde 1 día) y tardía (hasta 6 meses).

Investigar los eventos iniciales de la infección y la cinética de crecimiento, de los cisticercos de *T. crassiceps* inoculados en la cavidad peritoneal de su huésped murino.

Determinar que los cisticercos de *T. crassiceps* y las células intraperitoneales de los ratones infectados son fluorescentes por su contenido de porfirinas.

Estudiar el comportamiento de las CIP de ratones infectados en condiciones de cultivo *in vitro*.

Determinar el origen de las células de la cavidad peritoneal de los ratones infectados, a través del uso de sondas de DNA de *T. crassiceps* y anticuerpos dirigidos contra antígenos de los cisticercos de *T. crassiceps*.

Estudiar la evolución de las CIP obtenidas de ratones infectados al inocularlas intraperitonealmente en ratones sanos.

A continuación se presentan copias del artículo que se desarrolló durante el trabajo de tesis (aceptado para su publicación en el Journal of Parasitology) y resultados adicionales: visualización de la fluorescencia por porfirinas en los cisticercos de *T. solium* y el análisis de porfirinas en el fluido vesicular de los cisticercos de *T. crassiceps* y en lisados de células intraperitoneales de ratones infectados.

The Journal of
PARASITOLOGY
Founded by Henry Baldwin Ward

Gerald W. Esch, Editor
Department of Biology
Box 7629, Reynolda Station
Wake Forest University
Winston-Salem, NC 27109

May 23, 2000

Mr. Alejandro Padilla
Department of Immunology
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70228
México D.F., MEXICO

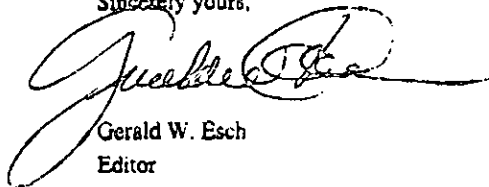
Dear Mr. Padilla,

This is to inform you that your ms., GE-2149, has been accepted for publication in the *Journal of Parasitology*, pending appropriate revision.

I trust this letter will satisfy the balance of your requirements for your Ph.D. degree.

With kindest regards, I am

Sincerely yours,



Gerald W. Esch
Editor
Journal of Parasitology

RH PADILLA ET AL.- ODD-LOOKING CELLS IN *TAENIA CRASSICEPS*
CYSTICERCOSIS

EVANESCENT INFLAMMATORY INFILTRATE AND ODD-LOOKING
CELLS IN MICE PERITONEAL CAVITY INFECTED WITH *TAENIA*
CRASSICEPS CYSTICERCICI

Alejandro Padilla, Tzipe Govezensky, Edda Sciutto, Luis F. Jimenez-García
*, María E. Gonsebatt, Patricia Ramirez, and Carlos Larralde+

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de
México; A.P. 70228, 04510 México D.F.; México

ABSTRACT: Changes in the leukocyte population of the peritoneal cavity ensue immediately after infection with *Taenia crassiceps* metacestodes. Basophils and neutrophils decrease, whereas macrophages, monocytes, and lymphocytes increase to reach only modest levels by 6 wk and then diminish to nearly disappear by 15 wk when the parasite begins rapid reproduction. Eosinophils also appear early in infection, but then abate to lower levels that persist. In late infections, when the mass of cysticerci equals that of the mouse, the cysticerci grow among surprisingly few inflammatory cells. Mingling with the peritoneal inflammatory cells is a number of odd-looking cells which could correspond to host's metaplastic mesothelial cells or be of parasite origin. These cells are multinucleated, to aggregate in varigerated clusters, and form cystic structures in vitro; they also bind specific anti-*T. crassiceps* antibodies and specific *T.*

crassiceps DNA-probes in their nuclei. When the peritoneal cell exudate is reinjected intraperitoneally into naive mice, the odd-looking cells subsist for months, inducing in the host the synthesis of specific anti-*T. crassiceps* antibodies and immune resistance to challenge, but do not reassemble into cysticerci even after 6 mo of inoculation. The early appearance and the immunogenic and antigenic properties of these odd-looking cells suggest they are important protagonists in the early host-parasite confrontation when the outcome of infection is set.

Taenia crassiceps (Zeder 1800, Rudolphi, 1810) is a tapeworm whose adult form is usually found in the intestine of European and North American red foxes. In natural infections, larval stages, or cysticerci, develop subcutaneously near the axillae, the rib cage, neck, and, less frequently, between the scapulae and in the inguinal region. Infection of peritoneal or pleural cavities are usually accompanied by infection at another site (Freeman, 1962). The cysticercus reproduces asexually by budding. This has greatly facilitated the study of *T. crassiceps* since the cysticercus can be maintained in the laboratory by serial intraperitoneal (i.p.) inoculation of cysts into mice (Freeman, 1962; Dorais and Esch, 1969; Culbreth et al., 1972). The experimental i.p. murine infection with *T. crassiceps* is a plentiful source of cross-reacting antigens useful in immunodiagnosis of human cestode diseases (Gottstein et al., 1986; Larralde et al., 1990; Vaz et al., 1997) and is also practical for testing candidate vaccines against porcine *Taenia solium* cysticercosis (Sciutto et al., 1995; Manoutcharian et al., 1996). Murine cysticercosis is also a manageable experimental system to

explore the role of biological factors involved in host susceptibility (Chernin, 1975), to assess the role of genetic background in infections (Fragoso et al., 1998), to study the modulation of cellular and humoral immune mechanisms (Hermanek and Prokopic, 1989; Seifert and Geyer, 1989; Bojalil et al., 1993) as well the nature of inflammatory and immunocompetent cells (Toenjes et al., 1999), and to examine the endocrinological changes occurring in the host during infection (Larralde et al., 1995). These notable features make experimental *T. crassiceps* murine cysticercosis an increasingly interesting laboratory model with which to explore basic questions of cestode parasitic diseases.

There is, however, not much information regarding the very early period after experimental infection of the murine peritoneal cavity with *T. crassiceps* metacestodes, when important interactions between host and parasite probably take place. Previous studies report slow parasite development during the first 10 days or so of experimental infection, but thereafter the parasites quickly reproduce to reach huge masses equaling the weight of the host in about 6 mo (Freeman, 1962; Dorais and Esch, 1969; Culbreth et al., 1972; Chernin, 1975; Kroeze and Freeman, 1982; Larralde et al., 1995). Recent studies of the infected peritoneal cavity 10 days after infection, identified several subsets of B and T cells ($B220^+CD5^+$, $B220^+CD5^-$, $\alpha\beta TCR^+CD4^+$ and $CD8^+$) that dynamically change during the course of a successful infection in relation to changes in IL-10, INF- γ , and IL-4 (Toenjes et al., 1999), supporting the idea of a decline in Th1/Th2 modulation involved in this host-parasite relationship (Terrazas et al., 1998).

However, in vaccination experiments, it was noted that immunity either restrains parasite reproduction during early infection (first 10 days or so) or not at all, as if a single or a few cysts capable of evading destruction during early infection would suffice to eventually colonize the host massively (Sciutto et al., 1991). Based on a description of the cellular composition present in the challenged i.p. compartment, when the outcome of infection is still undecided, we undertook a study of the cell numbers and composition inside the infected peritoneal cavity beginning on the very first day of infection; we expected the cells would be numerous and essentially leukocytic in nature. We were, however, surprised at what we observed. Initially, inflammation is rather scant and transient; eosinophils predominate. Moreover, there was a prominent population of odd-looking cells of obscure host or parasite origin that is immunologically functional and potentially decisive for the outcome of infection. Here, we describe these cells and attempt to define their origin and possible function/role in the early infection by larval *T. crassiceps* in mice.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Adult, 4-6 wk old, inbred BALB/cAnN mice of both sexes were used. They were originally purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) in 1982, and have been raised and kept in controlled conditions at our animal facilities for more than 20 generations.

Experimental infections

T. crassiceps metacestodes, ORF strain, were used in all experiments. They were maintained by serial i.p. inoculation in donor BALB/c female mice. Larvae for experimental infections were obtained from donor BALB/c female mice after 4-6 months of infection; motile, small (2 mm), complete cysticerci without visible buds were always selected for use. Two procedures were used to inoculate parasites into groups of three male and three female mice: a) Injection: this procedure consists in percutaneous i.p. inoculation of each mouse with 10 parasites suspended in PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate-buffer, pH 7.2) through a syringe equipped with a 25x16 mm needle, a procedure which usually disrupts most parasites; i.p. metacestodes were then recovered by peritoneal washes with PBS and counted after 0, 1, 4 days and 1, 2, 3, 4, 8, 16 y 24 wk of infection; b) Implantation: this procedure consists in the i.p. inoculation of 1 parasite (5 mm) through a syringe equipped with a number 16 needle of 3 mm in diameter in the anesthetized mouse (with 25 mg/Kg sodium pentobarbital (Smith Kline, Mexico)), a procedure that does not disrupt the parasite. I.p. metacestodes were recovered and counted after 0, 1, 4 days and 1, 2, 3, 4 wk of infection.

Differential counts of intraperitoneal cells

Three male and three female mice per group were infected by the injection

procedure. After 0, 1, 4 days and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16, 24 wk of infection, i.p. cells were extracted from mice after euthanasia with ether. The abdomen was surgically opened and the peritoneal walls were elevated with forceps to facilitate manipulation. The peritoneal cavity and all its organs were washed 3 times with 4 ml of PBS and the liquid washings were collected in 15 ml tubes. All cysticerci and visible debris were carefully removed. Immediately afterwards, the tubes were centrifuged at 1,200 rpm for 10 min, at 4°C and the cell pellet was resuspended in 1 ml PBS. I.p. cells were stained and counted with trypan blue (Gibco, Chagrin Falls, Ohio). Giemsa stained smears were prepared for all mice and differential counts were done in randomly chosen fields in 300 to 400 cells per triplicate in each slide. The morphologic identification of inflammatory i.p. cells was done as described by Kapff and Jandl, 1984.

Parasite antigens

Total antigens were collected from cysticerci that were harvested from the peritoneal cavity of infected mice by aspiration with a syringe and exhaustively washed with PBS. Excess PBS was eliminated and samples were centrifuged at 20,000 rpm at 4°C for 1 hr to obtain the clear and cell free supernatant vesicular fluid. The supernatant fraction was collected and its protein concentration measured by Lowry's method (Lowry et al., 1951) and frozen at -70°C until used (Larraide et al., 1990).

Polyclonal anti-serum

Polyclonal serum was obtained from a rabbit immunized 5 times, at intervals of two wk, with 1 mg of total protein/kg of *T. crassiceps* cysticerci's vesicular fluid. The first two immunizations were done intramuscularly using Freund's Complete Adjuvant (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), and the last three times with Freund's Incomplete Adjuvant (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) as described in detail elsewhere (Dominguez et al., 1998).

Immunofluorescence studies

An indirect immunofluorescence assay was performed on i. p. cells obtained from control as well as parasitized mice. Smears were prepared in slides with drops containing 10^4 i.p. cells. They were fixed in a mixture of 50% methanol /50% acetone for 2 minutes and rinsed once with PBS. (Spector et al., 1993). Preparations were incubated independently with 50 μ l of normal rabbit serum or polyclonal rabbit antiserum against *T. crassiceps* vesicular fluid (diluted 1:20 in PBS containing 3% bovine serum albumin BSA (Sigma, St. Louis, MO)). Cell preparations were incubated at room temperature in a humid chamber for 30 min and were subsequently washed 5 times with PBS. Antibodies attached to the i. p. cells were identified by adding a second antibody coupled to fluorescein isothiocyanate directed against rabbit IgG (Sigma, St. Louis, MO) diluted 1:100 in 3% BSA/PBS and incubated as done for antiserum. Subsequently, slides were washed 3 times with PBS and were analyzed in an Olympus fluorescence

microscope with a blue filter (Olympus U-MNB; excitation wavelength at 470-490 nm). Antibody specificity was tested by inhibition of the immunoreaction by pre-incubating 100 μ l of polyclonal rabbit antiserum with 100 μ l of *T. crassiceps* cysticercus vesicular fluid (200 μ g/ml) for 30 min at room temperature.

***In situ* DNA hybridization**

This method is based on the specific identification of DNA sequences by a fluorescence-labeled DNA sequence (Ramirez et al., 1997). I.p. cells were obtained by peritoneal washing using 3 ml of PBS-heparin (10 u/ml) from mice after 4 wk of infection, and from healthy mice. Cells were centrifuged at 1,200 rpm for 10 min at 4 °C and fixed by resuspending them in 5 ml cold methanol-acetic acid (3:1v/v). Subsequently, one drop from each group of i.p. cells were placed on a slide, left to dry and kept in liquid nitrogen until used. KETc7 sequence was used as a probe to specifically detect cysticercal cells. KETc7 is a gene segment of 485 bp, isolated from a complementary DNA library prepared from *T. crassiceps* cysticerci (Manoutcharian et al., 1996) that specifically reacts with cysticercal cells but not with cells from different mouse tissues (Uribe, 1998) and induce some degree of protection to experimental challenge (Rosas et al., 1998). The cDNA probe was labeled with ¹⁴dATP-biotin by nick translation at our laboratory (BioNick Labeling System, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Hybridization was performed following the procedure by Ramirez et al. (1997) which consists in submerging the prepared slides in a denaturing solution (70%

formamide, 2x SSC: 0.3M NaCl, 0.03M sodium citrate, pH=7) for 3 min at 70°C. The slides were then dehydrated by 2 min serial submersions in methanol 70, 85 and 100%, and then prepared for hybridization, pre-incubating them at 37°C. Hybridization cocktail (20 ng DNA probe, 1 mg sonicated salmon sperm DNA, 55% formamide, 1x SSC and 10% dextran sulfate in a 10 µl volume) was heated at 70°C for 3 min to denature the probe and then placed on the hybridization slides overnight at 37°C in a humid chamber. Subsequent washings were done with 60% formamide, 2 x SSC, three times for 5 min each and placed once in 2x SSC, at 45°C for 5 min. Slides were washed with PN buffer (0.1 M phosphate buffer, pH=8, containing 0.5% Nonidet-P40) at room temperature. The hybridization signal was detected using fluorescein-conjugated avidin (2.5 µg/ml in PNM; PN buffer containing 5% milk supernatant), followed by a fluoresceinated and biotinylated monoclonal antibody directed against avidin (3 µg/ml in PNM). This reaction was magnified by the final addition of fluorescein-conjugated avidin. To contrast the fluorescent signal 1% propidium iodide was used. Hybridizations were analyzed in a Olympus fluorescence microscope with a blue filter (Olympus U-MNB; excitation wavelength at 470-490 nm).

Flow cytometry studies

Unlabeled i. p. cells were analyzed by flow cytometry. I. p. cells were obtained from 3 male and 3 female mice per group after 0, 2, 4, 8, 16 and 24 wk of infection with cysticerci and studied individually. Control i. p. cells were obtained

from intact mice and from mice stimulated with 100 µg FCA two wk earlier. I. p. cells were washed 5 times with cold PBS and fixed with 1% para-formaldehyde in PBS. All i. p. cells were analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson, equipped with a laser beam (15 mW argon ion), excitation wavelength at 488 nm and emission filter at 585 ± 26 nm). A total of 10,000 cells per sample were analyzed with the FACscan software (Becton Dickinson).

Effect of i.p. cell transplantation

I.p. cells were extracted from mice after 1 to 6 months of infection. These cells were then filtered through a 250µ mesh, and their viability assessed by trypan blue exclusion. 15×10^6 viable cells in 400 µl of PBS were then inoculated i. p. to groups of 10 BALB/c female mice, 4 wk old. After 1 and 6 months, the recipient mice were bled under ether anesthesia and serum levels of anti-*T. crassiceps* antibodies measured by ELISA (Larralde et al., 1990). Later on, mice were sacrificed by cervical dislocation to search for cysticerci in the peritoneal cavity and to obtain i.p. cells. Morphologic and flow cytometry studies were carried on recovered i. p. cells. To assess the i. p. cells' immunological activity they were injected i. p. into normal female mice previous to a standard challenge infection (10 cysticerci per mouse injected i. p. as described above). Three groups each of six BALB/c female mice 4 wk old were tested in protection studies. A control group received 15×10^6 i.p. cells obtained from infected mice and was not challenged. Another control group was inoculated with PBS and was challenged

10 days later. The experimental group received 15×10^6 i.p. cells from infected mice and was challenged 10 days later. Four wk after challenge, all mice were sacrificed by cervical dislocation under ether anesthesia, and the number of parasites in their peritoneal cavities was counted.

***In vitro* studies**

Cell aggregation and vesicle formation by i.p. cells from infected mice were studied under tissue culture conditions. I. p. cells collected from peritoneal cavity of mice after 4 wk of infection were centrifuged at 1,200 rpm. 15×10^6 i. p. cells were placed in sterile tubes with 10 ml of RPMI medium (Gibco BRL, Grand Island, New York) supplemented with amino acids and 10% bovine fetal serum (BFS) (all Gibco, BRL), and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. I. p. cells sedimented at the bottom of the tubes in a few minutes but were collected after 2 and 12 hrs of incubation, when smears were prepared for microscopic observation by fixation with absolute methanol for 2 min and staining with Giemsa (Stevens, 1992). Cell-shedding by cultured cysticerci were studied as follows: *T. crassiceps* cysticerci were extracted from BALB/c female mice after 4 wk of infection and were thoroughly washed with sterile PBS (6 times with 40 ml each washing) to minimize the number of host's cells possibly adhering to the surface of metacestodes. Subsequently, 100 washed parasites were placed in culture tubes and supplemented with RPMI medium to reach a 10 ml volume. Tubes were then incubated at 37°C and 5% CO₂. After 2, 4, 5 and 24 hrs, tubes were gently shaken and cysticerci allowed to sediment before 5 ml of the

supernatants were taken and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min at 4°C to recover shed cells and analyze them without labeling, by flow cytometry and by optical microscopy after smearing and staining (Giemsa) the cell suspensions on glass slides.

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed by *t*-test or analysis of variance and the *post-hoc* Tukey's test as required by each experimental design (Milliken and Johnson, 1984).

RESULTS

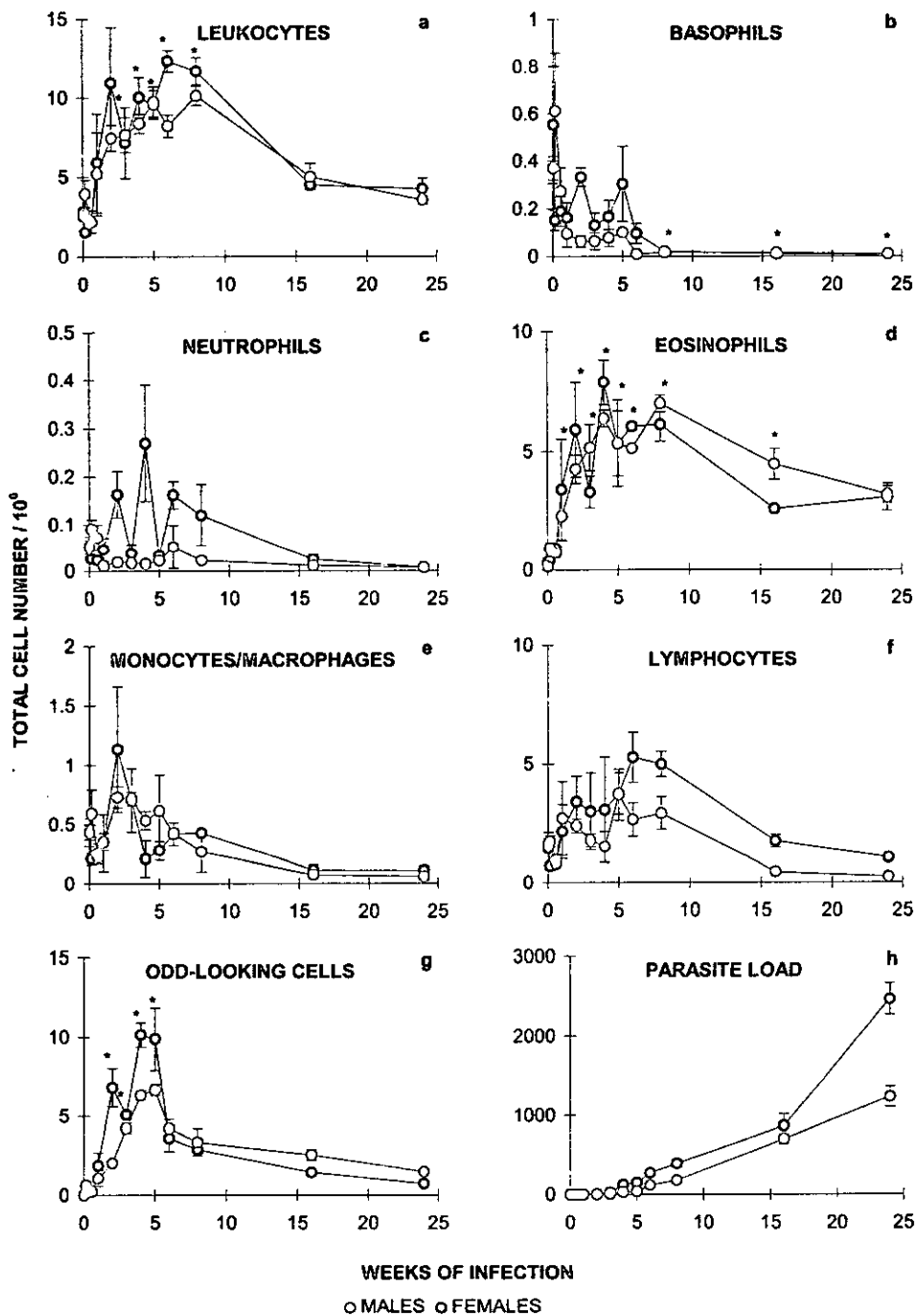
Dynamics of cellular infiltrate in the peritoneal cavity

Differential counts of *T. crassiceps* infected mouse i.p. cells were made to identify the type of inflammatory cells infiltrating the peritoneal cavity at different times after infection (Fig. 1). Total leukocytes fluctuate through time of infection in both male and female mice; they increase from normal levels (2.7×10^6) to reach a maximum (10.9×10^6) 4-8 wk after infection and then progressively decrease, reaching close to their initial levels at 16 wk. Eosinophils (the most abundant leukocytes in this infection) increase rapidly (in the first couple of days) from close to zero to about 7.1×10^6 cells by the 4th wk, and then decrease to about half of the maximum levels (3.1×10^6 cells at 24th wk). Monocytes and

macrophages behave similarly in both genders, increasing slightly after 2 wk (from 0.4 to 0.9×10^6) of infection and then declining again to initial levels by 4 wk. Lymphocyte kinetics are the same for male and female mice, but cell numbers are slightly greater in females than in males, reaching a maximum (5.1×10^6) 6-8 wk after infection and then returning to normal levels (1.7×10^6) 16 wk after infection. Basophils and neutrophils are very scarce in normal mice (0.5×10^6), but they decrease notably and remain low during infection (Fig. 1). In contrast, the counts of i.p. inflammatory cells stimulated with $100 \mu\text{g}$ of FCA reach 125×10^6 and 99.7×10^6 i.p. cells in female and male mice, respectively, 1 wk after injection.

Microscopic inspection of i.p. cell-smears from infected mice readily allowed the identification of a population of odd-looking cells mingling with the leukocytes. These odd-looking cells are round, large (10-20 micron), and basophilic, with abundant cytoplasm, few vacuoles, and non-lobulated single, or multiple, nuclei (Fig. 3). Many are single cells, but they are frequently found forming small aggregates as pallisades or quasi-tubular structures around a centrally-located larger cell. The odd-looking cells were found regardless of the inoculation method, e.g., injection or implantation of cysticerci, and they increased progressively in number until the 5th wk, when their number began to decrease, but without totally disappearing (Fig. 1). After 4 wk of infection, the odd-looking cells became the main population inside the peritoneum (40%-50% of the total cell counts).

Figure 1. Differential counts of inflammatory cells, odd-looking cells and parasites recovered from the peritoneal cavity of female (◻) and male (◊) mice injected with *T. crassiceps* in i.p. exudate samples collected at different times in the first six months after infection: a) total number of leukocytes; b) basophils; c) neutrophils; d) eosinophils; e) monocytes and macrophages; f) lymphocytes, g) counts of odd-looking cells increased in the six first wk after infection in both male and female mice, and subsequently decreased, without disappearing. h) number of parasites. Observe that 4 and 7 days of infection there are no cysticerci in non of the mice analyzed, the cysticerci progressively increased from the second wk after infection to reach thousands of metacestodes per mouse after six months. Values plotted are cell mean counts \pm SE in 3 mice at each time. * $P < 0.05$ with respect to normal values (0 wk).



Parasite counts

Two different forms of parasite inoculation were tested in an attempt to minimize physical damage to the inoculated cysticerci during collection and implantation procedures. The inoculation of cysticerci by syringe injection tore the metacestodes, and parasite fragments were easily visible to the naked-eye. One day after infection, the analysis of the peritoneal content showed a decrease in number and size of the parasite fragments, which revealed attached cell clusters apparently separating from the fragments (Fig. 2). During the first wk of infection, the macroscopic parasite fragments completely disappeared and the first parasites were macroscopically evident at the end of the second wk in females (6.3 cysticerci ± 5.5 S.D), whereas in male mice the cysticerci were evident at the end of third wk of infection (5.3 cysticerci ± 1.5 S.D). Thereafter, the cysticerci reproduced massively by budding (Fig. 1). Likewise, 1 day after implantation of a single complete cysticercus, parasites could not be found in 5 (3 male and 2 female) of the 6 mice observed, whereas the cysticercus in the remaining female mouse had decreased in size. Four days later, the infecting metacestode was not visible to the naked-eye and the microscopic analysis of the peritoneal exudate revealed small fragments of the cysticercus, with abundant attached, apparently shed, cells (Fig. 2). The complete metacestodes were evident to the naked-eye by the end of the second wk in female mice (7.3 ± 4.2 S.D cysticerci per mouse) and at the end of the third wk in male mice (1.7 ± 2.1 S.D cysticerci per mouse); then

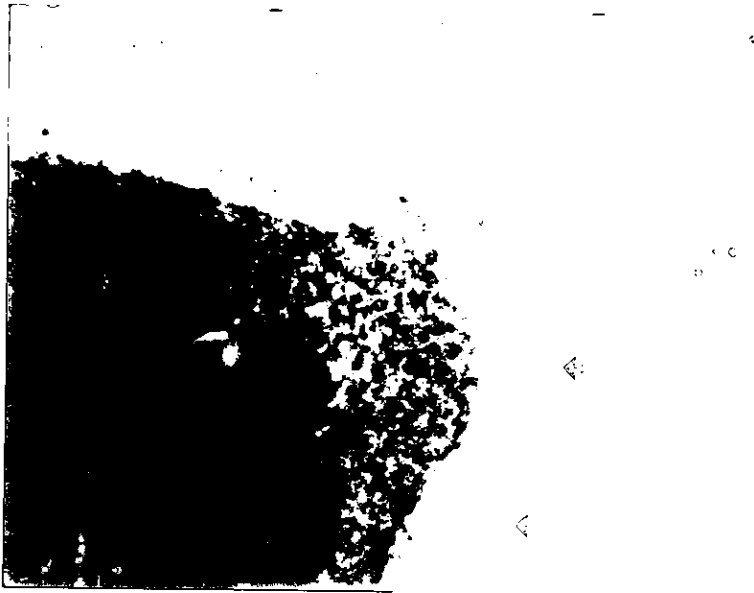


Figure 2. a) I.p. fragment from cysticercus stained with Giemsa stain, collected one day after infection. Notice the numerous adjacent and separating cells, which are round, large (20 micron), eosinophilic, with abundant cytoplasm, few vacuoles, and non-lobulated single or multiple nuclei.

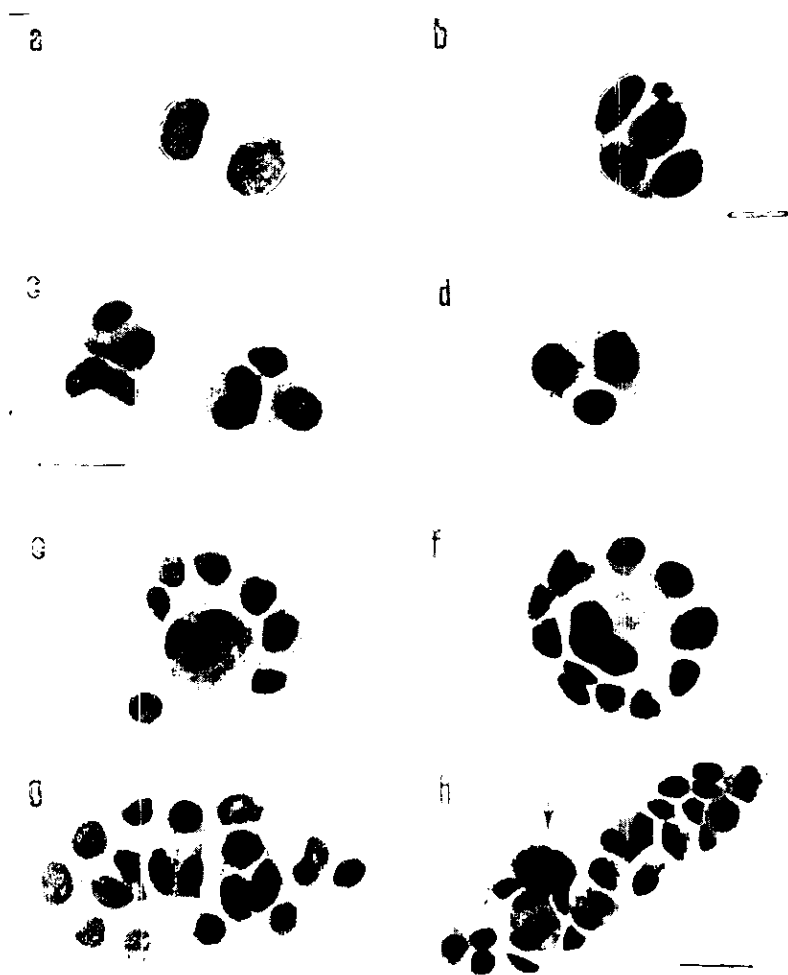


Figure 3. Light micrograph of various odd-looking cells found in the peritoneal cavity of mice infected with *T. crassiceps*: a-b) characteristic morphology of the odd-looking cells; c-d) odd-looking cells forming small aggregates; e-g) mononucleated, binucleated and trinucleated odd-looking cells forming different sorts of aggregates; h) the arrow indicates to a basophil adhered to an aggregate of odd-looking cells (scale bar =5 μ).

the metacestodes reproduced massively by budding (data not shown).

Immunofluorescence studies

Inside the peritoneal cavity of *T. crassiceps*-infected mice, i.p. cells (Fig. 4b) and cellular aggregates (Fig. 4a) reacted strongly with rabbit-polyclonal antibodies against total *T. crassiceps* antigens. This reactivity was observed from the first day of infection until 4 wk after injection. The specificity of the reaction was demonstrated by inhibition of a positive reaction when the polyclonal serum was pre-incubated with *T. crassiceps* antigens (Fig. 4c) and negative control cells isolated from normal mice (Fig. 4d).

Immunological studies

The immunogenicity of i.p. cells was tested by inoculating i.p. viable cells (the cell viability of cells was determined immediately after their collection, and nearly 100% were alive by trypan blue assay) from parasitized mice into naive normal female mice. High levels of circulating antibodies against *T. crassiceps* antigens were found in recipient mice. Antibody titers increased progressively and substantially along the 6 mo of the study (data not shown). Moreover, these transplanted mice were subsequently challenged with 10 metacestodes, and developed 23 ± 14.53 cysticerci 1 mo after challenge, a significantly lower parasite number when compared to the control naive female mice which

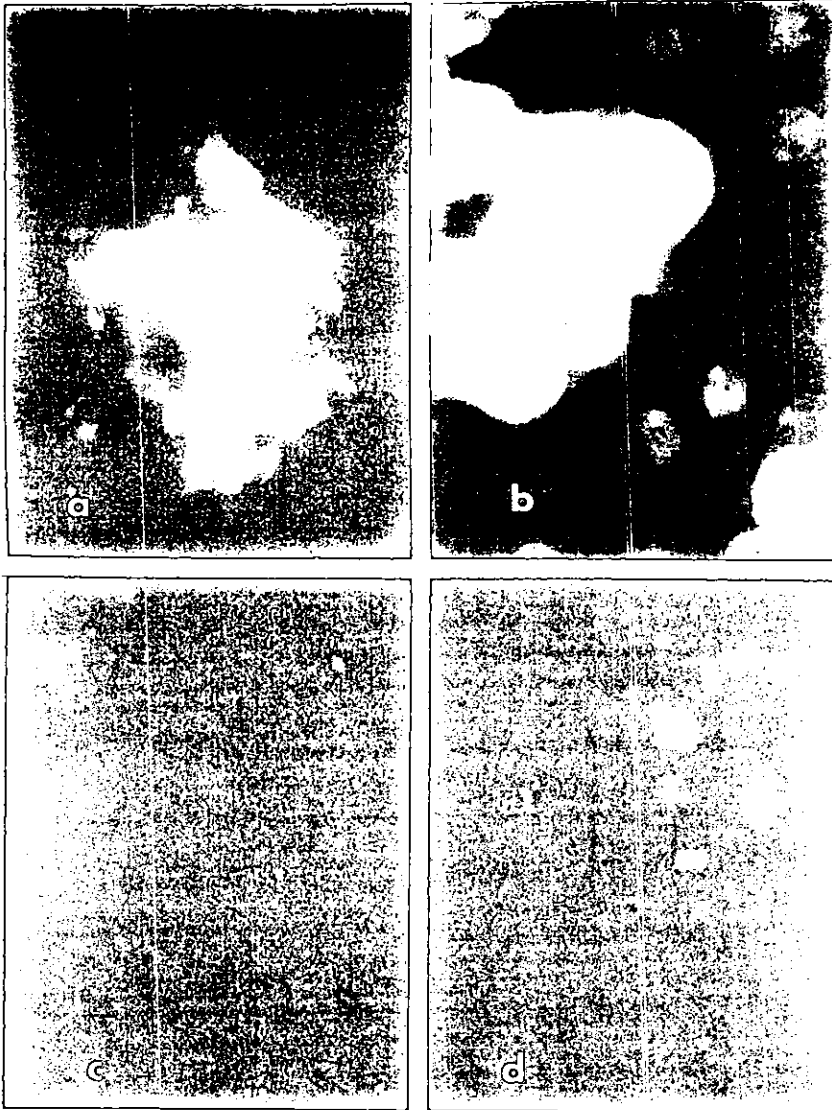


Figure 4. Indirect immunofluorescence of i.p. cells and cellular aggregates using rabbit polyclonal serum against *T. crassiceps* cysticerci. Peritoneal cells obtained from infected mice: a) illustrates a fluorescence cellular fragment with separating cells (magnification 10X); b) shows free fluorescent mixed with non fluorescent cells (magnification 20X); c) fluorescence inhibition pre-incubated the rabbit polyclonal antibodies against *T. crassiceps* with total antigens of *T. crassiceps* cysticerci; d) No fluorescent i.p. cells obtained from healthy mice (magnification 20X).

developed 73 ± 48.55 cysticerci per mouse when challenged with 10 metacestodes ($P < 0.05$, $n = 12$). The cell transplantation experiments also showed that none (0 of 20) of the healthy mice inoculated with suspensions of i.p. cells (98% viability) obtained from infected mice developed cysticercosis during the 6 mo of the study. However, morphologic and flow cytometry studies of the peritoneal cells of these transplanted mice showed abundant odd-looking cells surviving in the peritoneal cavity up to 6 mo after inoculation (24.3% at 1 mo and 18.2% at 6 mo of infection).

In situ DNA hybridization

Many (about 25%), but not all, nuclei of i.p. cells of infected mice showed positive in situ DNA hybridization using the KETc7 cDNA fragment a *T. crassiceps* cysticercus' probe. The positive nuclei were initially observed 1 wk after infection, when no metacestodes were found in peritoneal cavity, and 4 wk after infection, when there were many metacestodes inside the peritoneal cavity. Positive nuclei showed a fluorescence pattern with multiple hybridization sites (Fig. 5a). The cysticercus cDNA probe did not hybridize with the DNA of nuclei obtained from healthy mice (Fig. 5b) or with inflammatory i.p. cells collected in peritoneal cavities of mice previously injected with Freund's Complete Adjuvant.

Flow cytometry (autofluorescence)

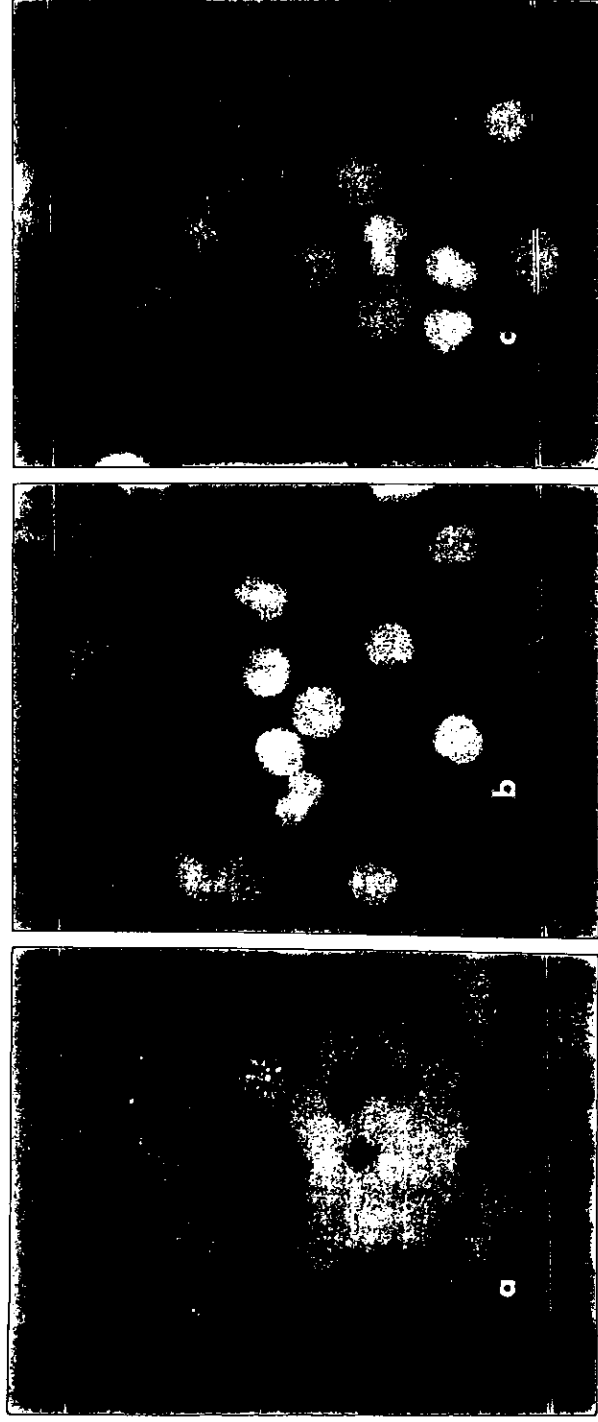


Figure 5. *In situ* DNA hybridization of i.p. cells, using KETc7 cDNA isolated from *T. crassiceps* cysticerci. a) The cDNA probe showed positive (green fluorescence) hybridization with many nuclei of i.p. cells of *T. crassiceps* infected mice, with multiple hybridization points. b-c) The cDNA probe did not hybridize with nuclear DNA of neither i.p. cells obtained from healthy mice nor i.p. cells elicited with FCA. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red fluorescence).

Flow cytometry analysis (excitation wavelength at 488 nm and emission wavelength at 585 nm) detected 2 main populations of autofluorescent cells among the i.p. cells from infected mice. The first was a population of low intensity, which comprised 52% of the cells. The second possessed a greater fluorescence intensity (the remaining 48%), and varied in size and granularity (Fig. 6c). The i.p. cells from healthy mice and those stimulated with FCA showed a single population of low-intensity fluorescent cells, which comprised almost 100% of the cells (Figs. 6a, b, respectively). The highly fluorescent i.p. cell population from the infected mice was found during all mo of infection, but it reached its maximum (60% of cell population) at 8 wk of infection (Figs. 7a-f).

In vitro cell behavior

Cell aggregation and vesicle formation of i.p. cells from infected mice was studied under tissue culture conditions. After 2 hr of incubation, some of the i.p. cells obtained from *T. crassiceps* cysticercus-infected mice formed cell aggregates, with the appearance of syncytia and, by 12 hr, cystic structures of variable size (0.5-10 mm) were visible to the naked eye, floating free in the culture medium (Figs. 8b, c). In vitro culture of cysticerci revealed that metacestodes can also spontaneously shed odd-looking cells, morphologically similar to those found in vivo in the peritoneal cavity (Fig. 8d), and also with autofluorescent properties similar to those collected in the i.p. exudate (Figs. 9 b-d).

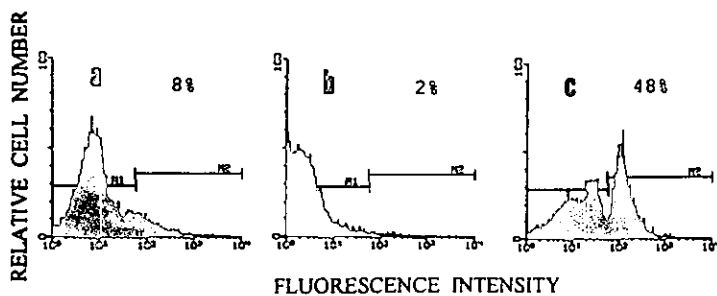


Figure 6. I.p. cells analyzed by flow cytometry (emission wavelength 585 ± 26 nm): a) i.p. cells from a normal mouse, 92% of the cells clustered in M1 region; M1 region was previously determined with the histograms of 3 female and 3 male normal mice; b) i.p. cells elicited with FCA, 98% of the cells were clustered in the low fluorescence intensity region; c) i.p. cells from *T. crassiceps* infected mice showed several cellular populations, the first clustered in the M1 region and comprised 52% of the cells, whilst the second population with high fluorescence intensity clustered in the M2 region and comprised the remaining 48%.

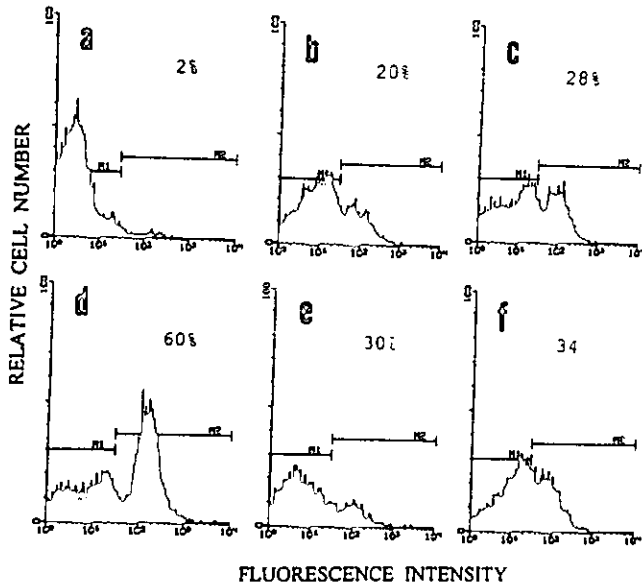


Figure 7. Peritoneal cells of infected mice analyzed at different times of infection by flow cytometry: a-f) i.p. cells recovered after one day, 2, 4, 8, 16 and 24 wk of infection, respectively. Note the progressive appearance of the population of high fluorescence intensity and a shift of the low intensity population to a higher intensity level.

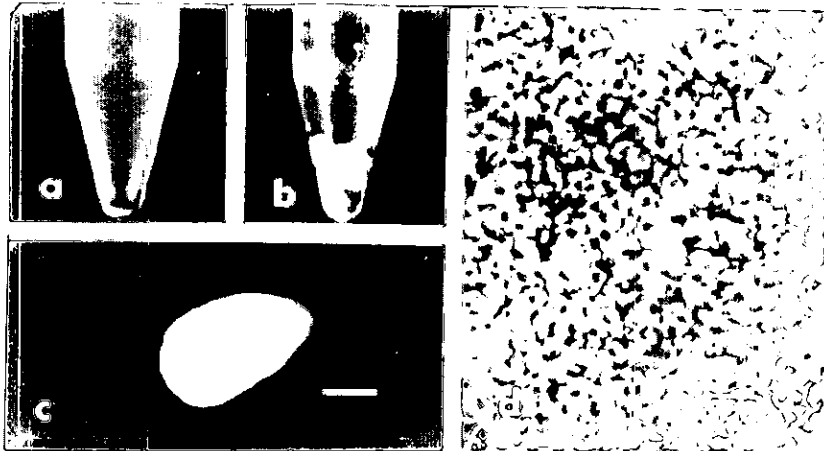


Figure 8. *In vitro* cell aggregation and vesicle assembly: a) tube containing i.p. cells immediately after extraction from an infected mouse; b) the same tube after 12 hr incubation, vesicles resembling cysticerci are visible; c) *in vitro* formed vesicle as viewed in stereoscope microscope (scale bar = 250 μ); d) i. p. cells after two hours *in vitro* incubation form large scintillal-like aggregates (scale bar = 500 μ).

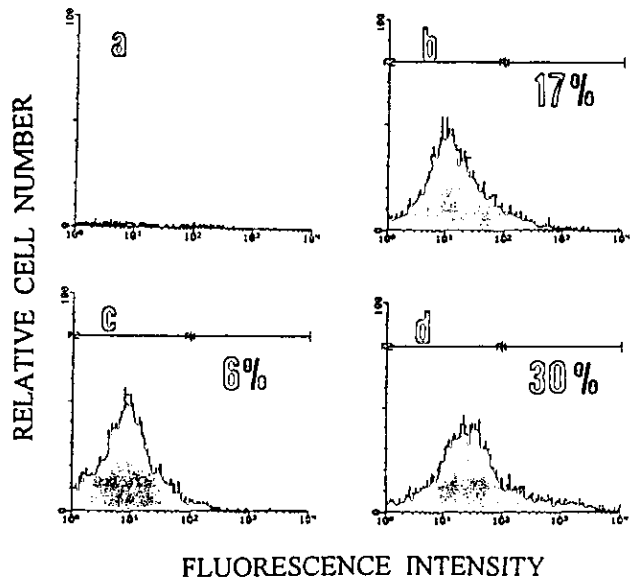


Figure 9. Flow cytometry analysis of odd-looking cells shed *in vitro* by live cysticerci:

a) culture medium; b) shed cells after two, six and sixteen hours incubation period.

Note that shed cells increase in number and in fluorescence intensity along the incubation period. In each graph the percent of high fluorescent (more than 10^2) cells is shown.

DISCUSSION

The host's intraperitoneal inflammatory exudate and the development of intraperitoneal experimental *T. crassiceps* murine cysticercosis were studied concomitantly from the very first day of infection to 24-wk later. We observed 2 prominent phenomena. First, the inflammatory process starts within the first day, but then falls to almost insignificant levels during late infections, the decline coinciding with a notable increase of the parasite's reproduction rate and numbers at 6 wk of infection. Second, the intraperitoneal inflammatory cell infiltrate is contaminated with a set of odd-looking cells that persist throughout the infection period (6 mo); these cells are endowed with antigenic and immunogenic capacities that could enable them to decisively participate in the early host-parasite interactions and the eventual outcome of infection.

As for the kinetics of inflammation in the intraperitoneal cavity of infected mice, all types of leukocytes eventually decrease in numbers, with the exception of eosinophils. These cell numbers do not fall to low values, but rather linger for mo at significantly higher than normal levels, although not quite as high as in the first 2 wk. Local i.p. eosinophilia could be of significance either against, or in favor, of the parasite, since eosinophils have been related with the number of parasites (Riley and Cherny, 1994), and have been implicated in immunosuppression by their production of transforming growth factor beta (Weller, 1994). They are, however, also classically suspected of having 'cysticidal' effects (Freeman, 1964; Good et al., 1982), especially if associated with

antibodies and complement (White et al., 1992). What is new and impressive in the peritoneal cell exudate is not only the scant number of intraperitoneal cellular dwellers in such a heavily parasitized compartment, but their trafficking during infection, e.g., their quick entrance and hurried exit in the challenged compartment while the cysticerci grow apparently undisturbed. This suggests that the cysticercus has developed a way of calling for, and allowing for, only a rather small and transient inflammatory response. Thus, it would seem that the cysticercus first resists the meager early inflammatory attack and then blocks stronger inflammatory events through unknown mechanisms with potent effects that influence all leukocytes. A number of possible molecular and cellular mechanisms involving inflammation, pathogenesis, and immunologically relevant molecules, like IL-6 (Lucey et al., 1996) or chemokines (Hall and Perlman, 1999), are possibly involved here. Toenjes et al. (1999) have recently studied the lymphocyte cell types and cytokine response of mice infected with cysticerci and found that in the peritoneal cavity there is an early expansion of B220⁺ CD5⁺, B220⁺ CD5⁻, and $\alpha\beta$ TCR⁺ CD4⁺ and CD8⁺ cells coincident with a transient increase in IL-10 production. After the initial increase, the percentage of B220⁺ CD5⁻ and helper T cells decreased concomitant to a decrease in IL-10 production, whereas CD8⁺ T cells continued to increase throughout infection and $\gamma\delta$ TCR⁺ increased after 10 days of infection. Their data strengthens the idea that IL-10 acts to suppress TH1-type anti-larval immune response. These findings could account for larval survival and for TH1-TH2 shift in cysticercosis (Terrazas et al., 1998), but do not provide an insight as to the reasons behind the slight

inflammatory process in the infected peritoneal cavity and the quick trafficking of inflammatory cells. Some very potent anti-inflammatory events or cells or molecules are possibly involved here that merit a closer look and elucidation.

Our studies also show that inside the peritoneal cavity of mice infected with *T. crassiceps* cysticerci, there are large numbers of odd-looking cells which do not resemble normal inflammatory cells. These odd-looking cells could be of parasite or host origin (Rausch et al., 1987,1999). Morphologically, mesothelial cells most closely resemble the odd-looking cells and it is possible that they could adsorb parasite antigen components onto their surface which would account for specific immunofluorescence. If so, mesothelial cells could be of consequence to cysticercosis as they possess the molecules required for immune recognition and can behave as antigen-presenting cells, i.e., they have ICAM-1, MHCII-DR, B7-1 and B7-2, all of which increase following pre-activation with interferon-gamma (INF- γ). Further, mesothelial cells can induce lymphocyte proliferation after a pulse with antigen and can present antigen to CD4⁺ lymphocytes (Mutti et al.,1998). Thus, the mesothelium could mediate the immune response against peritoneal cysticercosis, behaving as antigen-presenting cells, which recruit and activate the immune cells, or they could act to inhibit the host's inflammatory and immunological attacks upon the parasite.

On the other hand, if the odd-looking cells are from the parasite as the DNA hybridization experiments suggest, this would amount to there being a cellular

level of cestode infection accompanying or devoid of more organized complex parasite structures. Metacestodes having a cellular escort of their own, capable of mingling and dealing with the inflammatory cells coming from the host and perhaps influencing the outcome of inflammation and infection, is quite an unheard-of proposal in murine and other forms of cysticercosis. If true, the detachment of active cells by both host and parasite to the peritoneal cavity would appear as a clever strategy of both parts to avoid the potentially harmful after-effects of their confrontations. Lastly, the presence of escort cells among peritoneal cell collections in *T. crassiceps* would complicate the interpretation of functional data of the collected i.p. cells, so far presumed to be only of host origin, and would provide an additional approach to vaccine design using cells rather than molecules.

Based on the data available, we can not be certain of the origin of the odd-looking cells. We favor their parasite origin because of their bizarre appearance, because of the cell-shedding by cysticercus in vitro and during the early infection in vivo, and because they possess so many features of the parasite, i.e., DNA homology, antigenic content, immunogenic capacities, and curious fluorescent properties when compared with inflammatory cells present in normal and FCA stimulated mice.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Victoria Dominguez, Claudia Garay and Ignacio Terrazas for specialized technical assistance. Marta Romano for their interest and advise

during this work and for comments.

This project was partially supported by grant 88024 and G25955M from CONACyT México.

+ Corresponding author.

Carlos Larralde

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70228, 04510
México D.F., México

*Laboratorio de Microscopía, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional
Autónoma de México A.P. 04510 México D.F. México

MATERIAL Y MÉTODOS:

Observación de la fluorescencia en los cisticercos de *T. solium*.

Se utilizó un cerdo infectado naturalmente, al que se le extirpó el cerebro por cirugía cortando el cráneo manualmente. Con la finalidad de observar la fluorescencia por porfirinas en los cisticercos de *T. solium* de la superficie del cerebro, se iluminaron con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga.

Identificación de porfirinas

Para conocer si los cisticercos de *T. crassiceps* contienen porfirinas, se realizó un espectro de fluorescencia en 3 ml de fluido vesicular, extraído por centrifugación (Larralde *et al.*, 1990), para conocer las longitudes de onda de excitación y emisión se usó un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS-5. También se investigaron la presencia de porfirinas en las CIP obtenidas de ratones infectados. Se usaron como control CIP de ratones sanos y CIP obtenidas dos semanas después de haberse estimulado con 100 µg de adyuvante completo de Freund's (ACF) (Sigma St. Louis MO). Se usaron 2×10^6 CIP se resuspendieron en 3 ml de agua desionizada para lisarlas, posteriormente se sonicaron por 5 minutos a 60 Hz en un baño de ultrasonido, posteriormente se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se usó para realizar el espectro de fluorescencia.

Visualización de las células auto-fluorescentes

Una gota de las suspensiones de CIP de ratones infectados, control sanos y estimuladas por ACF (usadas en los experimentos de análisis de porfirinas) sin ningún marcaje fluorescente, fueron analizadas por microscopia confocal con la finalidad de observar la fluorescencia por porfirinas (Nihon, con un rayo láser, que excita a una longitud de onda de 488 NM y emite a 520 y 576 NM).

RESULTADOS

Visualización de los cisticercos de *T. solium*

A simple vista se observan fácilmente varios cisticercos en la corteza del cerebro del cerdo (Fig. 10a), estos cisticercos son más fácilmente visibles cuando son iluminados por luz ultravioleta, observe como los cisticercos fluorescen con diferente intensidad y con el característico color rojo de las porfirinas (Fig. 10b).

Identificación de porfirinas

En trabajos previos se demostró que los cisticercos de *T. solium* contienen grandes cantidades de porfirinas (Larralde *et al.*, 1986, 1987). Aquí investigamos si los cisticercos de *T. crassiceps* y las CIP de la cavidad peritoneal de ratones infectados contienen porfirinas. El espectro de fluorescencia del fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* mostró un pico de excitación a 402 nm y emisión a 575 y 624 nm, indicativo de porfirinas (Fig. 11 a-b).

El espectro de fluorescencia de los lisados de las CIP de los ratones infectados mostró un pico de excitación a 403 nm y emisión 548, 575, 600 y 635 nm (Fig. 11 c), documentando que estas células contienen porfirinas. Las CIP de los ratones sanos y el control de inflamación con ACF no contienen apreciables cantidades de porfirinas ya que no hubo pico de excitación en el rango analizado (340-430 nm), y el espectro de emisión (excitando a 403 nm) solo muestra un

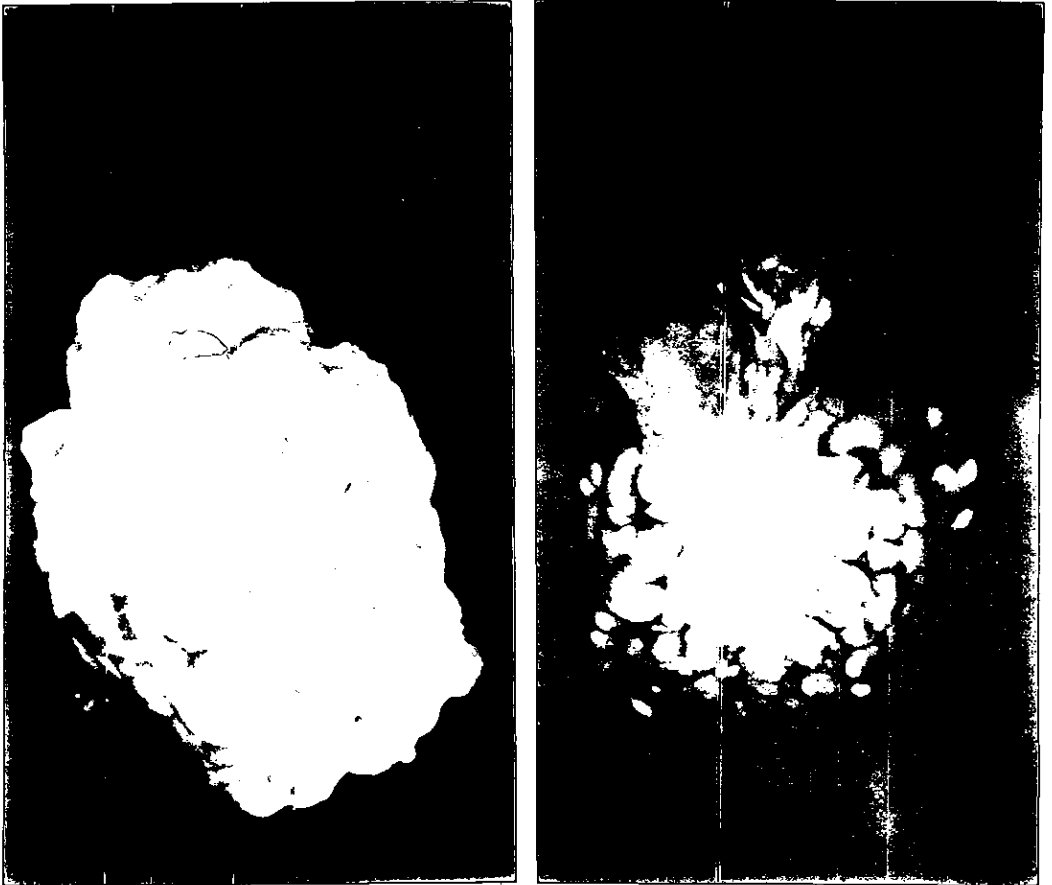


Figura 10. a) Cerebro extirpado de un cerdo infectado naturalmente con cisticercos de *T. solium*. b) Iluminación del cerebro de cerdo con luz ultravioleta de onda larga, observe que los cisticercos fluorescen de color rojo por el gran contenido de porfirinas en su interior.

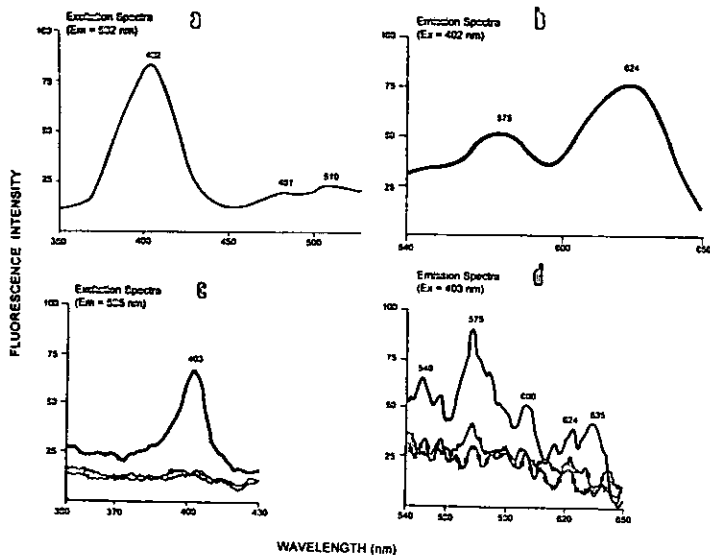


Figura 11. Análisis de porfirinas en el fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* a) Espectro de excitación (emisión 582 nm), observe el pico de excitación esta 402 nm. b) Espectro de emisión (excitación 402 nm), emite a 575 y 624 nm. Análisis de porfirinas en las células peritoneales, (o) ratones sanos, (x) ratones tratados con ACF, (—) ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*. c) Espectro de excitación (emisión 582 nm), el principal pico de excitación se encontró a 402 nm, en ratones infectados. d) Espectro de emisión (excitación 403 nm), la principal emisión ocurrió en 575 nm en células de ratones infectados.

pequeño pico de emisión a 575 nm (Fig. 11 d).

Ensayos de microscopia confocal

Las CIP de ratones infectados fueron estudiadas por microscopia confocal (excitación 488 nm y emisión a 520 y 576 nm), se encontró que los ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* tienen en la cavidad peritoneal un grupo de células autofluorescentes, que fluorescen principalmente en rojo, y presentan algunos puntos verdes. Las células de ratones sanos y las de los controles de inflamación por ACF no mostraron fluorescencia (Fig. 12 a-b).

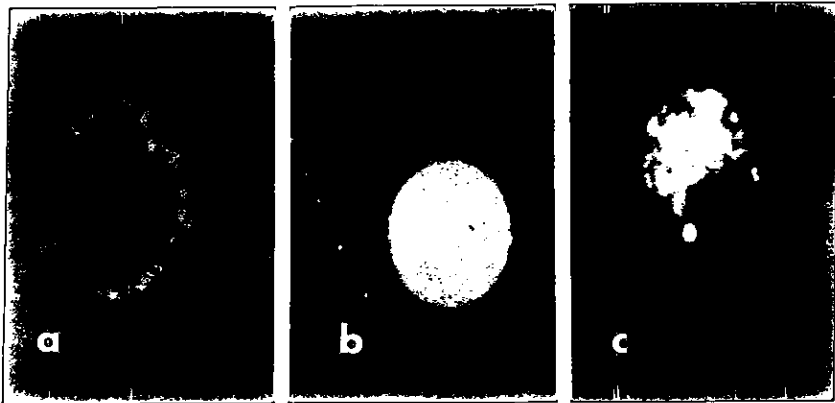


Figura 12. Análisis por microscopia confocal de células peritoneales sin marcar, para apreciar la fluorescencia natural. a) ratón sano. b) células inflamatorias estimuladas con adyuvante completo de Freund's. c) células de ratón infectado con cisticercos de *T. crassiceps*, obsérvese la gran fluorescencia roja.

DISCUSIÓN ADICIONAL

A continuación se amplia la discusión del artículo y de los resultados adicionales.

Durante la infección temprana, los cisticercos inyectados o implantados en la cavidad peritoneal tendieron a disgregarse, liberando las células hasta desaparecer a la inspección visual (Fig. 1), alrededor de la segunda semana de infección surgieron nuevos cisticercos, que se reprodujeron rápidamente por gemación exógena hasta alcanzar masas que igualan el peso del ratón (Fig. 1). La novedad de estos resultados es la disgregación de los cisticercos en la infección temprana (Figs. 1-2) este fenómeno puede ser un mecanismo del parásito para instalarse en el huésped, pasando por una fase celular en la que puede reproducirse rápidamente antecediendo la forma macroscópica de la cisticercosis. Sin embargo esta disgregación temprana, también puede ser el resultado de los mecanismos de defensa del huésped, que combate a los parásitos destruyendo la membrana y tegumento liberando células de origen parasitario que son capaces de resistir los embates del huésped antes de formar los metacéstodos o bien podrían distraer los mecanismos de defensas del huésped, para permitir el desarrollo de pequeñas gemas que forman los cisticercos.

Los ratones sanos que se transplantaron con CIP de ratón infectado no formaron cisticercos, sin embargo las células extrañas permanecieron en la cavidad peritoneal durante los siguientes 6 meses (Fig. 9), indujeron la síntesis de anticuerpos en contra de los antígenos de *T. crassiceps*, y resistencia parcial a posteriores desafíos. La presencia de anticuerpos circulantes en estos ratones,

podría explicar algunos casos de serología positiva en población abierta y en pacientes con enfermedades neurológicas (Ramos-Kuri *et al.*, 1992) que no tienen NCC, en los que se atribuye la presencia de anticuerpos a contactos resueltos con *T. solium*, con ciertas posibilidades de reacción cruzada con otros céstodos.

Observamos que una suspensión de CIP obtenidas de ratones infectados y mantenida en condiciones de cultivo de tejidos, se agregaron formando sincitios y finalmente formaron vesículas macroscópicas de diferentes tamaños, parecidas a cisticercos (Fig. 8). La agregación celular sugiere otro posible origen del cisticercos racemoso (una membrana llena de líquido, algunas veces con vestigios de escólex, alcanza un gran tamaño 10 cm., se ha hipotetizado que es una forma mutante del cisticercos de *T. solium* (Escobar 1983; Rabiela *et al.*, 1989)), siempre y cuando los parásitos de humanos, estuvieran también, acompañados por células capaces de formar estructuras quísticas, como las formadas *in vitro* por las CIP de ratones infectados.

La característica fluorescencia roja de las porfirinas de los cisticercos de *T. solium* fue claramente visible al iluminarlos con luz ultravioleta. Algunos cisticercos fluorescieron más intensamente y otros no fluorescieron, mostrando que hay una heterogeneidad del metabolismo de las porfirinas en los parásitos, que podría utilizarse como un marcador del estado metabólico de los mismos (Fig. 10).

La caracterización de las porfirinas que contienen los cisticercos de *T. solium*,

ha sido bien documentada en los trabajos de Larralde *et al.*, (1986, 1987), estas moléculas se excitan a una longitud de onda de 400-410 nm y emiten de 575-585 y 630 nm. El espectro de fluorescencia realizado al fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* mostró un pico de excitación a 402 nm y emisión a 575 y 624 nm (Fig. 11 a-b) que son indicativos de porfirinas (Larralde *et al.*, 1986). Este hallazgo apoya el uso de porfirinas como un marcador para identificar células producidas y liberadas por los cisticercos de *T. crassiceps* en la cavidad peritoneal.

El espectro de fluorescencia realizado a los lisados celulares de las CIP de ratones infectados, mostró un pico de excitación a 403 nm, excitando a esta longitud de onda se emitió principalmente a 575 nm, además mostró otros picos menos importantes a 548, 600 y 635 nm. Las CIP de los controles sanos e inflamación con ACF no tuvieron apreciables cantidades de porfirinas ya que no hubo pico de excitación en el rango analizado (340-430 nm), y el espectro de emisión (excitando a 403 nm) mostró un pequeño pico de emisión a 575 nm (Fig. 11 d). Los resultados de estos espectros sugieren que en las CIP de los ratones infectados hay un grupo de células que contienen porfirinas (Fig. 11 c).

La fluorescencia roja también fue apreciada en las células peritoneales al observarlas por microscopía confocal. La fluorescencia fue distribuida en pequeños compartimentos en el citoplasma, que bien podrían corresponder a las mitocondrias donde normalmente se encuentran las porfirinas (Fig. 12 c).

El análisis por citometría, mostró que una fracción importante de las CIP fluorescieron intensamente en los ratones infectados, aparecieron después de 4 días de infección, llegó al máximo 8 semanas y después disminuyeron, sin desaparecer de la cavidad peritoneal (Fig. 6-7).

La presencia de porfirinas en las CIP sugiere que las células fluorescentes se originan del cisticerco (Fig. 6,7,11,12), descartamos que sean células fagocíticas del huésped (Park *et al.*, 1996), porque los estudios en los cisticercos de *T. solium* revelaron que los cisticercos acumulan las porfirinas en su interior y no las liberan (Larralde *et al.*, 1987), por lo tanto no son fácilmente accesibles a células fagocíticas, a menos que haya destrucción parasitaria. No creemos que sean células del huésped fluoresciendo, ya que no existen registros en la literatura, exceptuando a la porfiria de humanos, de fluorescencia basal roja tan intensa (Thadani *et al.*, 2000). Además el control de células inflamatorias estimuladas con ACF, que contiene abundantes macrófagos activados y otras células peritoneales también activadas, no mostró aumento significativo de la fluorescencia basal (Figs. 6,11,12).

El DNA del cisticerco de *T. crassiceps* (KETc7) que usamos como sonda, para identificar células liberadas por el cisticerco, específicamente híbrido con el DNA de muchos núcleos de las CIP de ratones infectados, y no híbrido con las CIP del control sano, ni con las CIP inflamatorias estimuladas con ACF. La secuencia deducida de aminoácidos, realizada a partir de la secuencia de DNA del fragmento del gene KETc7 tiene homología con las extensinas, que son una

familia de proteínas presentes únicamente en plantas e invertebrados inferiores (John *et al.*, 1992). Se conoce que existen varias copias de este gene en los genomas reportados (Kieliszewski *et al.*, 1994). Nosotros encontramos varios puntos de hibridación de KETc7, sugiriendo que los genes con los que híbrido en las CIP de ratones infectados tienen múltiples copias similarmente a las extensinas de otras especies. El patrón de hibridación mostrado por KETc7 apoya la existencia de células del parásito en la cavidad peritoneal. La reacción de KETc7 no fue inespecífica ya que no híbrido con las CIP de ratones sanos e inflamación, como era esperado ya que las células de mamíferos no contienen genes de extensinas.

Otra insólita explicación acerca de las células de la cavidad que fijaron DNA del cisticerco de *T. crassiceps* en su núcleo, es que fueran células del huésped que a consecuencia de la infección adquirieran la capacidad de incorporar DNA del parásito a su núcleo causando la hibridación de DNA.

Aunque tenemos suficientes evidencias para apoyar el origen parasitario de las células extrañas, no podemos negar su gran parecido morfológico a las células mesoteliales, que pudieran participar en el rechazo del parásito (para más información ver la discusión del artículo de esta tesis). Sin embargo pudiera darse el caso de la participación de ambos fenómenos en esta infección, células del parásito y células mesoteliales.

APÉNDICE I

ESTRUCTURA DEL CISTICERCO DE *Taenia solium*.

De los platelmintos los céstodos son el grupo más especializado, todos son endoparásitos, y el cisticerco de *T. solium* es el de mayor complejidad, su longitud varía desde 0.5 mm milímetros hasta 2 cm de diámetro, está formado por un escólex y una membrana. A simple vista los cisticercos asemejan una bolsita membranosa llena de líquido con un escólex en su interior, al igual que la *Taenia* adulta el escólex del cisticerco posee 4 ventosas y un rostelo armado con 2 hileras de ganchos. Cuando un cisticerco viable es ingerido por el ser humano, el contenido del tubo digestivo activa al escólex para que evagine y se fije a la pared intestinal, permitiendo el desarrollo de la larva hacia el estado adulto (Slais 1982).

La membrana del cisticerco de *T. solium* es un órgano complejo que cumple la función de proteger y mantener la larva invaginada, esta estructura interactúa con el huésped y realiza funciones de relación con el medio como son la alimentación, eliminación de excreciones y defensa del sistema inmunológico del huésped (Cárdenas-Ramírez *et al.*, 1982).

La superficie del cisticerco se incrementa cerca de 136 veces por la gran cantidad de microtricos que poseen alrededor de la membrana. La superficie en contacto con el huésped, es una membrana plasmática que como tal debiera ser susceptible al daño por los diversos mecanismos defensivos del huésped, pero al

parecer el sistema inmune de los pacientes no la afecta. La membrana citoplásmica de las células externas del cisticerco esta protegida por una capa de glicocálix, secretado en vesículas provenientes del tegumento. Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de tejido muscular liso, así como las llamadas células subtegumentales. Estas células sintetizan activamente proteínas y otros componentes, que son transportados hacia el tegumento a través de puentes citoplásmicos. A mayor distancia de la superficie se encuentra una serie de conductos o canales aparentemente relacionados con células ciliadas, llamadas células flama que constituyen un sistema protonefridial (Ramírez-Bon *et al.*, 1982).

La división del cuerpo de la larva en una membrana y en un escólex invaginado es típica del cisticerco de *T. solium*. La estructura histológica de la pared del escólex, difiere de la porción parenquimatosa que lo contiene invaginado. El parénquima está compuesto de un complicado sistema de células, fibras y canales. El escólex invaginado forma un canal espiral, las ventosas están presentes en un extremo en el que surgen un rostelo con ganchos, el parénquima es más denso en el extremo cercano a la membrana donde surge el canal espiral. El parénquima consiste de fibras paralelas relativamente pequeñas con conspicuas células en forma de uso, y de un sistema de fibras musculares, que ayudan a la evaginación del escólex. La pared fuertemente doblada del canal espiral mantiene el escólex invaginado con un tegumento grueso y plegado.

En los dobleces del parénquima se encuentran los corpúsculos calcáreos, en la

superficie de la región invaginada se encuentra la cavidad de la pared que es bordeada por una capa bien organizada de tejido conectivo. Este tegumento es contiguo con el sitio de abertura del canal de invaginación y con la membrana.

ESTRUCTURA DEL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*.

El tegumento del cisticerco de *T. crassiceps* se compone de una capa externa bordeada de microtricos y otra capa inferior que es un sincitio vesicular. Cada microtrico es una estructura larga y delgada, que tiene dos porciones, una próximal gruesa y una porción distal delgada. En el centro de cada microtrico se encuentra un cilindro de microfilamentos. Se ha observado una clara variación morfológica en diferentes regiones del tegumento, sobre todo en la distribución de los microtricos (Threadgold *et al.*, 1983). A partir del tegumento surgen gemas que se desarrollan en gradiente, la mayor cantidad de gemas se desarrolla en el extremo posterior y el número disminuye gradualmente através del extremo anterior (Bilqeess 1968). En el tegumento encontramos células flama, que constituyen el sistema excretor de tipo protonefridial. La contracción muscular es probablemente propiciada por movimientos de fluidos en los intersticios de las fibras del parénquima (Baron 1968).

El escólex, se encuentra en el extremo anterior, se caracteriza por tener 4 ventosas, y un rostelo armado con 32 ganchos en dos círculos concéntricos, que le sirven para fijarse a la pared intestinal del huésped definitivo. En el tegumento del escólex se encuentran fibras nerviosas y células situadas profundamente, que son similares a las vesículas sinápticas de las neuronas de vertebrados (Bilqeess 1967).

REPRODUCCIÓN DE HELMINTOS PARÁSITOS

La palabra helminto deriva del griego *elmis* o *helmis* gusano, es una denominación genérica en la que se incluyen básicamente tres fila de invertebrados: platihelminos o platemintos, acantocéfalos, y nematodos.

Muchos helmintos parásitos dependen de la fertilización cruzada para mantener la flexibilidad genética de su descendencia, necesaria para que los organismos se adapten rápidamente a nuevas cepas de huéspedes. La autofertilización en helmintos hermafroditas es probablemente muy rara. Nemátodos y acantocéfalos parásitos tienden a tener sexos separados, aunque hay algunas excepciones. Los platemintos incluyendo las formas de vida libre son fundamentalmente hermafroditas, pero *Schistosoma mansoni* es la principal excepción.

El hermafroditismo ofrece ventajas a los parásitos, animales sedentarios y animales sesiles aislados, que necesitan una alta tasa de reproducción: Primero, aumentan las posibilidades de aparearse, segundo aumenta la producción de huevos fertilizados, tercero existe la posibilidad de la autofertilización como una medida segura y no depende de que otros organismos de la misma especie estén presentes para aparearse y conservar la estabilidad genética. Se ha sugerido también que el hermafroditismo pueda llevar a una rápida expresión de los caracteres recesivos o mutados ya que las mutaciones que se desarrollan

tempranamente en los ovarios y testículos, al ocurrir la autofertilización, pueden ser inmediatamente expresadas, ya que ambos gametos masculino o femenino pueden llevar el carácter. Como una regla, la protandria, que es el desarrollo temprano de los testículos antes que el de los ovarios, favorece la fertilización cruzada y reduce el riesgo de la autofertilización en algunos organismos hermafroditos, ya que los espermatozoides pueden permanecer en el receptáculo seminal hasta que los huevos han madurado.

Encontrar un organismo del sexo opuesto para el apareamiento en el interior del intestino delgado o en otro sitio puede ser un problema, existen evidencias de que algunas especies producen feromonas sexuales para atraer el sexo opuesto. Esquistosoma no se desarrolla completamente hasta que el apareamiento suceda, en los que ocurre la copulación permanente, así también en *Syngamus*, el gusano de las aves y en *Diplozoon paradoxum* un parásito de peces.

Los nemátodos muestra grandes estrategias reproductivas. Algunos nemátodos parásitos de raíces, por ejemplo *Meloydoigine sp.*, son capaces de reproducirse sexualmente y también por partenogénesis. Muchos nematodos parásitos de insectos y de plantas (además algunas formas de vida libre del suelo) pueden ajustar su relación de hembras y machos al mantenimiento del mejor balance de la economía biológica. Por ejemplo, en infecciones bajas por nemátodos mermetidos que parasitan insectos, todos se desarrollan en hembras, en infecciones moderadas se producen más machos, y en infecciones abundantes solo se producen machos. Esto puede ser controlado por la cantidad de alimento disponible. Las hembras

son más demandantes de una fuente de alimento para elaborar huevos, por lo que probablemente un número óptimo puede ser exitosamente soportado por una cantidad determinada de alimento.

En nemátodos parásitos de animales, opera un sistema de autocontención sobre la producción de huevos, que puede ser reducido al nivel de los gusanos presentes y también para sobre los gusanos machos, que tienden a ser de vida más corta que las hembras y pueden ser eliminados del huésped primeramente (Lyons 1978).

Muchos sino es que todos los parásitos tienden a ser muy prolíficos, producen una gran cantidad de huevos. *Ascaris* y *Fasciola* producen cerca de 20000 huevos diariamente. *Dyphyllobotrium*, parásito del hombre puede producir hasta dos millones de huevos diariamente durante 15 años. Esta vasta producción de huevos sirve para compensar las dificultades para encontrar un huésped apropiado y perpetuar su ciclo de vida.

La producción de descendientes puede aumentar por reproducción asexual en el estado larvario (poliembrionia). En parásitos del caracol que funciona como huésped intermediario, y que es notablemente tolerante al daño infligido sobre sus tejidos, una sola miracidia de *Schistosoma mansoni*, infectando un caracol puede producir hasta 200000 cercarias. Sin embargo la infección con varias miracidias no incrementa proporcionalmente el número de cercarias, debido a que ocurre alguna regulación de la población dependiendo de los recursos dentro del caracol. Las larvas de *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *E.*

oligarthus, y *E. vogeli* (Rausch R.L. 1968), compensan su limitada reproducción en el perro que es el huésped definitivo (los gusanos solo tienen 3 proglotidos de largo) por una vasta reproducción asexual en el huésped intermediario. El quiste hidatídico unilocular esta constituido por una vesicula madre, compuesta por dos capas: una externa no nucleada, y una interna nucleada y germinal, de la que se originan por gemación cápsulas primarias; las cápsulas pueden permanecer adheridas a esta capa por medio de un corto pedúnculo, o bien, desprenderse y caer a la cavidad del quiste. Los escólex, desarrollados a partir de la pared interna de cada una de las cápsulas primarias, presentan dos coronas de ganchos de diferente tamaño que aún no alcanzan la longitud que tendrán en el estadio adulto, midiendo 0.027 mm de largo los mayores y de 0.022 a 0.025 los menores. Otros céstodos que presentan reproducción en el estado larvario son *Multiceps multiceps* que presenta gemación endógena muy parecida a *E. granulosus*, y *T. crassiceps* que presenta gemación exógena.

La tasa reproductiva promedio o potencial biótico de cada parásito, depende no solo del número de huevos depositados y de la reproducción asexual, sino también del tiempo de generación. La estimación segura de la fecundidad de un parásito es difícil de calcular porque cambia de acuerdo a diversos factores como la estación del año, edad, sexo, y respuesta inmunológica del huésped.

BIBLIOGRAFÍA

- Arocker-Mettinger, E., V. Huber-Spitzy, H. Aver, G. Grabner and M. Sturm. 1992. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of human eye. A case report. Klin. Monatsbl Augenheild. 201: 34-37.
- Baron P.J. 1968. On the histology and ultrastructure of *cysticercus longicollis*, the cysticercus of *Taenia crassiceps* Zeder, 1800 (Cestoda, Cyclophyllidae) Parasitology. 58: 497-513.
- Bilqeis F.M. 1967. Abnormalities in the development of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800). Revista di Parassitologia. 38: 243-247.
- Bilqeis F.M. 1968. Observation on budding gradient in *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rud., 1810. Revista di parassitologia. 29: 261-264.
- Bojalil, R., L.I. Terrazas, T. Govezensky, E. Sciuotto, and C. Larralde. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). Journal of Parasitology 79: 384-389.
- Cardenas F., Plancarte A., Quiroz H., Rabiela M.T., Gomez-Leal A., Correa D., and Flisser A. 1989. *Taenia crassiceps*: Experimental model of itrocular cysticercosis. Experimental Parasitology. 69: 324-329.
- Chernin, J. 1975. The growth of the metacestodes of *Taenia crassiceps* in white mice. Journal of Helminthology 49: 297-300.
- Cruz-Revilla C., Rosas G., Fragoso G., Lopez-Casillas F., Toledo A., Larralde C., and Sciuoto E. 2000. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. Journal of Parasitology. 86: 67-74.
- Culbreth, K.L., G.W. Esch, and R.E. Kuhn. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda) III. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of ¹⁴C-leucine. Experimental Parasitology 32: 272-281.
- de Aluja A., Vargas G. 1988. The histopathology of porcine cysticercis. Veterinary Parasitology. 28: 65-77.
- Díaz-Camacho, S., Candil-Ruiz, A., Uribe-Beltrán, M. y Willms, K.1990. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 84: 583-586.
- Dixon, B.T. y Hargeaves, W.H. 1944. Cysticercosis (*Taenia solium*). A further ten years clinical study conving 284 cases Quatently. Journal of Medicine 13: 107-121.
- Dominguez, V., G. Gevorkian, T. Govezensky, H. Rodríguez, M. Viveros, G. Cocho, I. Macotela, F. Masso, M. Pacheco, J.L. Estrada, C. Lavalle, and C. Larralde. 1998. Antigenic homology of HIV-1 GP41 and human platelet glycoprotein GPIIa (Integrin β_3) Journal of Acquaired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 17: 385-390.
- Dorais, F. J., and G.W Esch. 1969. Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. Experimental Parasitology 25: 395-398.

- Dumas M., Bouteille, B., Kassankogno, Y., Catanzano, G. y Alexandre, M.P. 1990. Epidemiological study of cysticercosis and neurocysticercosis in North Togo. *Soc. Path. Exo. Fluliales*, **33**: 263-274.
- Escobar, A. 1983. The pathology of neurocysticercosis. In *cysticercosis of the central nervous system*, E. Palacios, J. Rodriguez-Carbajal, and J.M. Taveras (Eds.). Charles C. Thomas Publisher, Illinois U.S.A. pags. 27-54.
- Flisser A. 1997. Overview of immunology. *Archives of Medical Research*, **28**: 145-147.
- Flisser A., Madrazo Y., Delgado E. 1997. *Cisticercosis Humana*. Editorial el Manual Moderno. Mexico D.F.
- Flisser A., Rivera L. 1985. Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. *Journal of Parasitology*, **71**: 433-442.
- Flisser, A., Pérez, M.R. y Larralde, C. 1979. The immunology of human and animal cysticercosis. *Bull. World Health Organization*, **55**: 839-856.
- Flisser, A.; Rivera, L., Trueba, J., Espinoza, B., Yakoleff-Greenhouse, V., Sierra, A. y Larralde, C. 1982. Immunology of human cysticercosis. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A.; Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). Acad. Press. N.Y. pag. 560.
- Fragoso, G., E. Lamoyi, A. Mellor, C. Lomeli, M. Hernandez, and E. Sciutto. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* **66**: 760-764.
- Francois, A., L. Favennec, C. Cambom-Michot, I. Gueit, N. Biga, F. Tron, P. Brasseur, and J. Hemmet. 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Surgical Pathology* **22**: 488-492.
- Freeman, R. S. 1962. Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* **40**: 969-990.
- Freeman, R.S. 1964. Studies on responses of intermediate hosts to infection with *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* **42**: 367-385.
- Freeman, R.S., A.M Fallis, M. Shea, A.L. Marberley, and J. Walters. 1973. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). The parasite. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **22**: 493-495.
- Garcia-Albea E. 1989 Cysticercosis in Spain. Epidemiologic data. *Rev Clin Esp* **184**: 3-6.
- Garcia-Garcia M.L., Torres M., Correa D., Flisser A., Sosa-Lechuga A., Velasco O., Meza-Lucas A., Plancarte A., Avila G., Tapia R., Aguilar L., Mandujano A., Alcantara I., Morale Z., Salcedo A., Manon MD., Valdespino-Gomez J.L. 1999. Prevalence and risk of cysticercosis and teniasis in an urban population of soldiers and their relatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61**: 386-389.
- Good A H., Sieber A E., Robbins P., Zaun A. 1982 Modulation of the host immune response by larvae of *Taenia crassiceps*. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). Acad. Press. N.Y. pag. 593-610.

- Good, A.H., and K.L. Müller. 1976. Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infection and Immunity* 14: 449-456.
- Gottstein, B., and A. Hemphill. 1997. Immunopathology of echinococcosis. *Chemical Immunology* 66: 177-208.
- Gottstein, B., V.C. Tsang, and P. Schantz. 1986. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *T. solium* metacestode antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 308-313.
- Hall, L.R., and E. Pearlman. 1999. Pathogenesis of onchocercal keratitis (river blindness). *Clinical Microbiology reviews* 12: 445-453.
- Hermanek, J., and J. Prokopic. 1989. Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. *Folia Parasitologica* 36: 331-340.
- John M.E., Crow L.J. 1992. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber: cloning of the RNAs. *Proceeding of National Academic of Science*. 89: 5769-5773.
- Kapff, C.T., and J.H. Jandl. 1984. Atlas de Hematologia. Salvat. México, pag. 149.
- Kieliszewski M.J., Lamport D.T. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant Journal*. 5: 157-72.
- Klinker, H., K. Tintelnot, R. Joces, J. Muller, V. Gross, H. Schmidt Ratte, P. Lankaster, and E. Richter. 1992. *Taenia crassiceps* infection and AIDS. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 117: 133-138.
- Krocze, W.K., and R.S. Freeman. 1982. *Taenia crassiceps*: Fate of cysticerci following ingestion by the mouse. *Experimental Parasitology*. 54: 425-431.
- Kwa, B.H., Liew. 1977. Immunity in taeniasis-cysticercosis I. Vaccination against *Taenia taeniaeformis* in rats using purified antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 146: 118-131.
- Laclette J.P., Shomaekr C B., Richter D., Arcos L., Ponte N., Cohen C., Bing D., Nicholson-Weller A. 1992. Paramiosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology*. 148: 124-128.
- Larralde, C., A. Padilla, M.Hernandez, T. Govezensky, E. Sciutto, G. Gutierrez, R. Tapia-Conyer, B. Salvatierra, and J. Sepulveda. 1992. Seroepidemiologia de la cisticercosis en Mexico. *Salud Publica de Mexico* 34: 197-210.
- Larralde, C., G.M. Zedillo, D. Lagunoff, R. Ludowyke, R.M. Montoya, F. Goodsaid, G. Dreyfus, E. Sciutto, T. Govezensky, and M.L. Diaz. 1986. Porphyrin content of the cysticercus of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* 72: 569-577.
- Larralde, C., J. Morales, I. Terrazas, T. Govezensky, and M.C. Romano. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 52: 575-580.
- Larralde, C., J. Sotelo, R.M. Montoya, A. Palencia, A. Padilla, T. Govezensky, M.L. Diaz, and E. Sciutto. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 926-928.

- Larralde, C., S. Sassa, J.M. Vanderkooi, H. Koloczek, J.P. Lacleite, F. Goodsaid, E. Sciutto, and C.S. Owen. 1987. Analysis of porphyrin and enzymes in porphyrin synthesis in *Taenia solium* cysticercus from man and pig. *Molecular and Biochemical Parasitology* 22: 203-213.
- Lombardo, 1982. Cisticercosis cerebral en México Simposio. *Gaceta Medica de México* 118 No. 1
- Lucey D.R., M. Clerici, and G.M. Shearer. 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 9: 532-562.
- Lyons, K.M. 1978. *The biology of helminth Parasites*. University Park Press Baltimore. Printed in Great Britain.
- Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Hernandez, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L.F. Rodarte, and E. Sciutto. 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* 82: 250-254.
- Márquez, M.H y Austria, B. 1969. Cisticercosis en el Hospital General de México: Estudio anatomopatológico de 165 casos. *Revista Latino Americana de Patologia*. 8: 79-86
- Mazzoti L. 1974 Presencia de Huevecillos de la taenia en la región perianal. *Revista del Instituto Salud Tropical de Mexico*. 10:183-202.
- Milliken, G. A. and D.E. Johnson. 1984. *Analysis of messy data. Vol I: designed experiments*. Van Nostrand Reinhold. New York, pag. 473.
- Mutti, L., M.T. Valle, B. Balbi, A.M. Orengo, A. Lazarro, P. Alciato, E. Gatti, P.G. Betta, and E. Pozzi. 1998. Primary human Mesothelioma cells express class II MHC, ICAM-1 and B7-2 and can present recall antigens to autologous blood lymphocytes. *International Journal of Cancer* 78: 740-749.
- Nieto, D. 1982. Historical notes on cysticercosis. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleite, J.P., Larralde, C., Ridura, C., y Beltran F. (Eds.). Acad. Press. N.Y. pags. 1-7.
- Ostrosky-Zeichner L., Garcia-Mendoza E., Rios C., Sotelo J. 1996. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Archives of Medical Research*. 27: 513-517.
- Park S.H., Satoh Y., Kumagai S., Seyama Y. 1996. Localization of porphyrin in mouse in mouse Horderian glands. *Archives of Histology and Cytology*. 59: 189-195.
- Pokrovskii, S.N. y Zima, G.G. 1938. Files as carries of tape worm eggs under natural conditions. *Medicine Parasitology, Moscu*. 7: 262.
- Rabiela M.T., Rivas A., Flisser A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology Today*. 5: 357-359.
- Rabiela, M.T., Rivas, A., Rodríguez, I.J. 1979. Consideraciones anatomopatológicas de la cisticercosis cerebral como causa de la muerte. En: *Patologia*. 17: 119-136.
- Ramírez P., D.A. Eastmon, J.P. Lacleite, and P. Ostrosky-Wegman. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research* 386: 291-298.

- Ramirez-Bon, E., Merchant, M.T., Gonzalez-Del Pliego, M., Cañedo, L. 1982. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestodes of *Taenia solium*. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. in: Flisser, A., Willms A., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (Eds.) Academic Press New York N Y. pages 261-280.
- Ramos-Kuri, M., Montoya, A. Padilla, T. Govezensky, M.L. Diaz, E. Sciuotto, J. Sotelo, and C. Larralde. 1992. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis. Disappointing Performance of Serology (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) in an Unbiased Sample of Neurological Patients. *Archives of Neurology*. 49: 633-636.
- Rausch R.L. 1968. Taxonomic characters in the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Bulletin of the World Health Organization*. 39: 1-4.
- Rausch, R.L., and A. D'Alessandro. 1999. Histogenesis in the metacestode of *Echinococcus vogeli* and mechanism of pathogenesis in polycystic hydatid disease. *Journal of Parasitology*. 85: 410-418.
- Rausch, R.L., W.E. Giddens, Jr., and J.G. Bridgens. 1987. Mesothelial tumors associated with larval taeniid cestodes maintained by intraperitoneal inoculation in rodents. *Canadian Journal of Zoology* 65: 1755-1758.
- Restrepo, B.I., Llaguno P., Sandoval M.A., Encino K.A., y Teale K.M. 1998. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: Central Nervous System response to helminth appear Th1-like insteads. *Journal of Neuroimmunology*. 89: 64-72.
- Ridaura, C. 1989. Cisticercosis en observaciones en material postmortem. En: Cisticercosis Humana y Porcina su conocimiento e investigación en México. Flisser y Mondragón (Eds.), Editorial Limusa, México..
- Riley, S.L. and J. Chernin. 1994. The effect of the tetrathyridia of *Mesocestoides corti* on the livers and peripheral blood of three different strains of mice. *Parasitology* 109: 291-297.
- Sarti E., Schantz P.M., Plancarte A., Wilsom M., Gutierrez O.I., Aguilera J., Roberts J., Flisser A. 1994. Epidemiological investigation of *Taenia solium* teniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 88: 49-52.
- Sarti E., Schantz P.M., Plancarte E., Wilsom M., Gutierrez I.O., Lopez A.S., Roberts J., Flisser A. 1992. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* teniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 46: 677-685.
- Sciuotto E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Research*. 77: 243-246.
- Sciuotto, E., A. Aluja, G. Fragoso, L.F. Rodarte, M. Hernandez, M.N. Villalobos., A. Padilla, N. Keilbach, M. Baca, T. Govezensky, S. Diaz, and C. Larralde. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology*. 60: 53-67.
- Sciuotto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, M. L. Diaz, R.M. Montoya, T. Govezensky, C. Lomeli, and C. Larralde. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens

- against experimental murine cysticercosis. *Parasite Immunology* 10: 687-696.
- Seifert, B. and E. Geyer. 1989. Inhibition of *in vitro* and *in vivo* mast cell degranulation by *Taenia crassiceps* metacystodes in vitro incubation products. *International Journal Medicine and Microbiology* 271:521-531.
- Shea, M., A. L. Maberley, J. Walters, R.S. Freeman and A.M. Fallis. 1973. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). *Transactions of American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*. 77: 778-783.
- Shenome H., Villaroel F., Rojas A., Ramírez R. 1982. Epidemiology of Human Cysticercosis in Latin America En: Flisser A., Willms K., Lacleste JP., Larralde C., Ridaura C., Beltrán F. (Eds.). *Cysticercosis Present State of Knowledge and perspectives*. New York. Academic Press. pags. 25-38.
- Slais, J. 1982. Morphology of the escolex of *cysticercus cellulosa* in brain cysticercosis. in *cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. in:Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P.,Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (Eds.) *Academica Press New York N.Y* pags 235-269.
- Sotelo, J., Guerreo, V., Rubio, F. 1985. Neurocysticercosis: A New classification Based on active and inactive forms a study of 753 cases. *Archives of Internal Medicine*. 145: 442-445.
- Spector, D.L., R.T. O'Keefe, and L.F. Jimenez-Garcia. 1993. Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 58: 799-805.
- Terrazas I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. 1993. Immunoendocrine Interactions in experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*): a rol del 17 b-estradiol. *Journal of Paraitology*. 79: 384-389.
- Terrazas, L.I., R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde. 1998. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosys (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. 84: 74-81.
- Thadani H., Deacon A., Peters T. 2000. Diagnosis and management of porphyria. *Brithish Medicine Journal*. 320: 1647-1651.
- Threadgold L.T., Dunn J. 1983. *Taenia crassiceps*: Regional variations in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus' tegument. *Experimental Parasitology*. 55: 121-131.
- Toenjes S.A., Spolski R.J., Mooney K.A., Kuhn R.E. 1999. The systemic immune respose of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 118: 623-633
- Varma T.K., Alhuwalia S. S. 1989. Incidence of *cysticercus cellulosa* in slaughtered pigs and human taeniasis in Western and Central Utr Pradesh. *Indian Veterinary Journal* 66: 673-674.
- Vaz, A.J., C.M. Nunes, R.M. Piazza, J.A. Livramento, M.V. Da Silva, P.M. Nakamura, and A.W. Ferreira. 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *American Journal of Tropical Medicine*

and Hygiene 57: 354-357.

- Weller P.F. 1994. Eosinophils: structure and functions. *Current Opinion in Immunology* 6: 85-90.
- White, A.C. Jr., P. Tato, and J.L. Molinari. 1992. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infectious Agents Disease* 4: 185-193.
- Williams J F., Engelkirk P G., Lindsay M C. 1982. Mechanism of immunity in rodent cysticercosis. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). Acad. Press. N.Y. pags. 621-632.
- Williams J., Picone J., Engelkirk P. 1980 Evasion of immunity by cestodes. In *the host invader interplay*, van den Bossche, H ed. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press. pags. 205-216.
- Zenteno G. 1965. Aspectos quirúrgicos de 200 personas internadas en la unidad de neurología y neurcirugía del hospital general de México SSA. 1959-1963. *Revista de Medicina del Hospital General de Mexico*. 28: 515-525.