



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Valoración de la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de huevos
de *Taenia solium* obtenidos de *Chinchilla laniger*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
BENJAMIN GOMEZ DIAZ



DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. JOSE PABLO MONTEVILLA CAMPILLO





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



REPUBLICA NACIONAL
DE CHILE
SANTO DOMINGO DE LOS ANDES

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**“Valoración de la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de huevos
de *Taenia solium* obtenidos de *Chinchilla laniger*”**

realizado por **Gómez Díaz Benjamín**

con número de cuenta **9022907-5**, quién cubrió los créditos de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario **QFB. José Pablo Maravilla Campillo**
Propietario **Dra. Ana Flisser Steimbruch**
Propietario **Dra. Guillermina Avila Ramírez**
Suplente **M. en C. María de Lourdes Barbosa Saldaña**
Suplente **Dra. Laura del Carmen Vargas Parada**

Consejo Departamental de **Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Fliser Steimbruch por el recibimiento en su grupo de trabajo y la oportunidad de permitirme conocer de una manera más amplia el campo de la investigación.

Al Dr. Pablo Maravilla por su infinita tolerancia y dirección a lo largo de mi incursión en la parasitología.

A Mirza Romero, Joel Martínez, Angélica Olivo y Laura Aguilar por sus enseñanzas paciencia y apoyo.

A los miembros del jurado por sus correcciones y apoyo en el trabajo escrito.

Al Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por la subvención económica, reactivos, equipo y animales proporcionados para la realización de este estudio.

Al Dr. Simón Kawa, MVZ Ramón García, y MVZ Pedro Palomares gracias por sus aportaciones y consejos.

RESUMEN

La *Chinchilla laniger* se ha reportado como un modelo experimental de teniosis por *Taenia solium*, sin embargo, aún se desconocen múltiples factores que afectan el desarrollo del parásito. El propósito de este trabajo fue valorar la viabilidad de huevos maduros de *T. solium* recuperados del modelo experimental de *Ch. laniger* por medio de cinco métodos *in vitro* y compararla con la infección en cerdos europeos híbridos y vietnamitas. Para esto se infectaron por vía oral a 11 chinchillas con 4 cisticercos de *T. solium* cada una y se inmunodeprimieron por vía intramuscular cada 14 días con acetato de metil prednisolona (depomedrol). El seguimiento de la infección fue mediante el ELISA para la detección de coproantígenos de *Taenia sp* y por recuperación de proglótidos en tamizado de heces.

De los proglótidos grávidos recuperados de las chinchillas infectadas se extrajeron huevos, los cuales fueron divididos en dos grupos, uno se utilizó para infectar oralmente a 5 cerdos (3 europeos híbridos y 2 vietnamitas) con 50,000 huevos cada uno; y otro se dividió en 5 conjuntos, los cuales se eclosionaron con hipoclorito de sodio al 0.5 % en una dilución 1:10 para posteriormente valorar su viabilidad mediante uno de los siguientes métodos: activación de oncosferas, registrando su movilidad bajo un microscopio invertido; tinción con Azul Tripano (AT); reducción del bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT); tinción con Rojo Neutro (RN) y tinción con Yoduro de Propidio (YP).

Por Western blot dos cerdos vietnamitas y dos cerdos europeos híbridos resultaron positivos a la infección experimental y su diagnóstico se confirmó por tomografía computarizada (TC). Tras la necropsia de los animales los porcentajes de establecimiento para los cerdos vietnamitas fueron de 0 y 0.09 cisticercos recuperados mientras que para los cerdos europeos híbridos fueron de 0.32 y 0.39.

Los porcentajes de viabilidad obtenidos para los diferentes métodos fueron de 29.6% en activación, 54.7% en AT, 6.5% en MTT, 33.2% en RN y 61.6% en YP.

Numerosos problemas y variables técnicas se presentaron con los métodos de activación, reducción de MTT y RN, recomendamos el empleo de las tinciones con AT y YP para cuantificar la viabilidad de los huevos de *T. solium*, estas técnicas mostraron valores de viabilidad más altos y más cercanos entre sí, además de ser técnicas de fácil aplicación. Por otra parte, si se extrapola la viabilidad obtenida por AT y YP los resultados sugieren que la mitad de los embriones estaban viables, entonces los porcentajes de infección fueron de 0.64, 0.78 y 0.18. Finalmente, se observó que los cerdos vietnamitas son susceptibles de infectarse con *T. solium* por lo que puede recomendarse su uso como modelos de cisticercosis porcina.

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción de la especie	2
1.2. Morfología de <i>T. solium</i>	3
1.3. Transmisión y biología del desarrollo	4
1.4. Diagnóstico	6
1.5. Modelos experimentales de teniosis por <i>T. solium</i>	7
1.6. Los huevos de <i>T. solium</i>	8
1.7. Métodos de viabilidad celular	10
1.8. Viabilidad de los huevos de <i>T. solium</i>	12
1.8.1. Método de activación	13
1.8.2. Método de azul tripano	13
1.8.3. Método de reducción de bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio	13
1.8.4. Método de rojo neutro	14
1.8.5. Método de yoduro de propidio	14
1.8.6. Infección de cerdos	14
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1. Aclimatación de las chinchillas	18
4.2. Obtención y viabilidad de los cisticercos	18
4.3. Infección e inmunodepresión de chinchillas	18
4.4. Seguimiento de la infección por captura de coproantígenos	19
4.5. Recuperación de proglótidos	20
4.6. Recuperación de parásitos adultos	21
4.7. Recuperación de los huevos de <i>T. solium</i>	21
4.8. Infección experimental de cerdos con huevos de <i>T. solium</i>	22
4.9. Eclosión de huevos	22
4.10. Métodos de viabilidad	23
4.10.1. Método de activación	23
4.10.2. Método de azul tripano	24

4.10.3.	Método de reducción de bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio	24
4.10.4.	Método de rojo neutro	24
4.10.5.	Método de yoduro de propidio	25
4.11.	Diagnóstico de cisticercosis en los cerdos infectados	25
4.12.	Necropsia de cerdos y recuperación de cisticercos	25
4.13.	Análisis estadístico	26
5.	RESULTADOS	27
5.1.	Viabilidad de los cisticercos usados en la infección y su establecimiento en las chinchillas	27
5.2.	ELISA para detección de coproantígenos de <i>T. sp</i> en chinchillas	27
5.3.	Proglótidos recuperados de tamizados	27
5.4.	Parásitos adultos recuperados y porcentaje de infección	29
5.5.	Recuperación de huevos, eclosión y viabilidad de oncosferas	29
5.6.	Diagnóstico de cisticercosis en los cerdos infectados	34
5.7.	Recuperación de cisticercos de cerdos infectados experimentalmente	37
6.	DISCUSIÓN	39
7.	CONCLUSIÓN	43
8.	BIBLIOGRAFÍA	44

1. INTRODUCCIÓN

Taenia solium (Linnaeus, 1758) es un gusano aplanado, responsable de dos enfermedades: teniosis en los seres humanos y cisticercosis en el cerdo y accidentalmente en las personas (Aluja *et al*, 1987). La cisticercosis cerebral humana o neurocisticercosis (NCC) es el problema de salud mas serio que genera este parásito (Tsang y Wilson, 1995) y en busca de solucionarlo, se estudia la relación hospedero-*Taenia* usando modelos experimentales, los cuales son de gran utilidad ya que las tenias pueden implantarse y crecer. En el modelo experimental de teniosis en chinchilla de cola larga (*Chinchilla laniger*), se da el desarrollo de parásitos grávidos de *T. solium*. Sin embargo, debido a los porcentajes de infección tan bajos e irregulares registrados cuando se han empleado huevos de las tenias recuperadas tanto de humanos como de chinchillas (Cuadro 1), así como la dificultad en el manejo de cerdos europeos híbridos York-Landrace (EHY-L) empleados en las infecciones experimentales, surge la necesidad de establecer un método de evaluación de viabilidad *in vitro* para los huevos de *T. solium* recuperados de chinchilla y la de emplear cerdos vietnamitas que, por ser de menor tamaño, se facilita su manejo e infección con *T. solium*, ya comprobada en cerdos similares (Fan *et al*, 2001).

Llama la atención que hasta ahora son pocas las publicaciones donde se mencionan controles de viabilidad en huevos de céstodos empleados en infecciones experimentales y en sólo dos de estos artículos se refieren a huevos de *T. solium*: Rhoads *et al* (1987) quienes emplearon 10,000 y 20,000 huevos con 20% de viabilidad determinado mediante la técnica de activación, consiguieron 0.13 y 0.33 % de infección respectivamente y Santamaría *et al* (2002), quienes infectaron con 10, 100, 1,000, 10,000 y 100,000 huevos con un 80% de viabilidad calculada mediante la tinción con azul tripano (en este caso para calcular el número de huevos se tomó en cuenta que el 80% de ellos eran viables) obtuvieron porcentajes de infección de 10, 2.2, 0.45, 2.5 y 0.75 respectivamente. Por lo

tanto, tener un control de viabilidad con métodos *in vitro* es de suma importancia para calcular la eficiencia del establecimiento de infecciones por huevos de *T. solium*, así como para estudios que requieren de oncosferas viables de este céstodo.

Cuadro 1. Porcentaje de establecimiento de cisticercos de *T. solium* en diferentes infecciones experimentales en cerdos. Reproducida de Flisser, 2002 con modificaciones.

Autor	Núm. de cerdos	Núm. de huevos	Promedio de cisticercos	Porcentaje de establecimiento (%)
Santamaria	4	10	1	10.00
Santamaria	5	100	2.2	2.20
Santamaria	4	1,000	3.6	0.45
Hebert	3	4,300	146	3.40
Molinari	5	8,400	79	0.94
Rhoads	2	10,000	13	0.13
Santamaria	5	10,000	255.6	2.50
Manoutcharian	6	10,000	5	0.05
Pathak	8	15,000	369	2.50
Rhoads	2	20,000	65.5	0.33
Plancarte	5	25,000	172	0.68
Garza	1	48,750*	5	0.01
Santamaria	5	100,000	751.6	0.75

* Obtenidos de chinchilla

1.1. Descripción de la especie

T. solium es un organismo perteneciente al Phylum Platyhelminthes. Los representantes de este Phylum presentan las características más simples entre los animales con cefalización. Los platelmintos son gusanos planos con cuerpo blando y en forma de cinta. Son organismos triblásticos, acelomados con simetría bilateral, conformados por tejidos y organizados en sistemas (Brusca y Brusca, 1990), su excreción es protonefridial y su sistema nervioso es ganglionar. Pueden ser de vida libre, comensales o parásitos. La tenia pertenece a la Clase Cestoda que incluye organismos con un cuerpo generalmente multisegmentado; con aparato reproductor hermafrodita en cada segmento o proglótido; presentan un aparato fijador denominado escólex en el extremo anterior y todos son endoparásitos intestinales en etapa adulta (Cheng, 1978).

La posición taxonómica de *T. solium* es la siguiente (Brusca y Brusca, 1990):

REINO: Animalia

PHYLUM: Platyhelminthes

CLASE: Cestoda

SUBCLASE: Eucestoda

ORDEN: Cyclophyllidea

FAMILIA: Taeniidae

GÉNERO: *Taenia*

ESPECIE: *Taenia solium* (Linnaeus, 1758)

1.2. Morfología de *T. solium*

T. solium presenta tres estadios: el huevo, la larva o metacéstodo y el adulto o tenia, siendo el huevo el único estadio de vida libre del parásito. El adulto de *T. solium* es de color blanco y puede dividirse en tres regiones: el escólex o extremo anterior del cuerpo, la región del cuello, situada inmediatamente debajo del escólex y el estróbilo, que constituye la mayor parte del cuerpo y está formado por una cadena de segmentos pequeños denominados proglótidos. El escólex es el órgano de adhesión del parásito, es piriforme, mide alrededor de 1 mm de diámetro, está provisto de dos pares de ventosas situadas de manera dorsoventral y un apéndice apical retráctil denominado rostelo, que posee de 22 a 32 ganchos dispuestos alternadamente formando dos coronas, la interna constituida por ganchos largos (160-180 μm) y la externa por ganchos cortos (110-140 μm) (Cheng, 1978). La región del cuello es un área no segmentada, más estrecha que el escólex, contiene una masa central de células germinativas con alta actividad mitótica ya que a partir de esta zona se desarrollará la tercera región que es el estróbilo; los primeros signos de segmentación que presenta el cuello para formar los proglótidos son surcos transversales. A medida que progresa el desarrollo, éstos se vuelven más evidentes hasta formar proglótidos individuales claramente definidos. El estróbilo está formado por cientos de proglótidos que se desarrollan de inmaduros a maduros y finalmente a grávidos conforme

avanzan a la porción distal de la tenia. El estróbilo puede estar constituido por 700 a 1,000 proglótidos llegando a medir generalmente 2 metros. los proglótidos son unidades reproductoras del parásito con órganos masculinos y femeninos, donde los 10 a 30 proglótidos terminales son grávidos, los que llegan a medir de 5 a 6 mm de ancho por 7 a 12 mm de largo y contienen hasta 60,000 huevos cada uno (Flisser, 1994). La larva, metacéstodo o cisticerco de *T. solium* es una vesícula ovoide o esférica, blanquecina (de 0.5 a 2 cm o más, de diámetro), semitransparente y tiene un escólex esférico invaginado (Aluja *et al*, 1987).

1.3. Transmisión y biología del desarrollo

Cuando el ser humano come carne de cerdo mal cocida que contiene cisticercos vivos, las sales biliares y las enzimas gástricas e intestinales activan al metacéstodo para que evagine el escólex y se fije en la parte alta del yeyuno con ayuda de sus cuatro ventosas y rostelo (Laclette *et al*, 1982). Este ambiente favorable asegurará el desarrollo del cestodo hasta su estado adulto donde producirá proglótidos grávidos, los que se desprenden periódicamente del resto del cuerpo, y salen al ambiente en la materia fecal (Flisser, 1994; Flisser *et al*, 1997). La primera expulsión de proglótidos ocurre entre los tres y cuatro meses después de la infección y se considera, que en general, se liberan de 2 a 5 proglótidos de dos a tres veces por semana (Flisser *et al*, 1997). En lugares donde la eliminación de excretas es inadecuada, los cerdos se alimentan con heces humanas e ingieren los huevos de la *T. solium*. Una vez ingeridos por el cerdo, en el tracto digestivo, la pepsina, pancreatina y otras enzimas inician la disgregación del embrióforo, posteriormente la acción de las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal necesaria para la activación de la oncosfera (Laclette *et al*, 1982). La oncosfera activada inicia movimientos de sus tres pares de ganchos hasta deshacerse de la membrana oncosferal y atraviesa la mucosa intestinal con ayuda de secreciones líticas

así como por acción mecánica hasta alcanzar los capilares sanguíneos y linfáticos que la llevan a diferentes órganos dentro del hospedero en donde se desarrolla hasta convertirse en un metacéstodo. En el cerdo, la oncosfera requiere de 60 a 70 días para convertirse en un cisticerco completamente desarrollado (Yoshino, 1933).

El hombre accidentalmente puede convertirse en hospedero intermediario de *T. solium* al ingerir huevos (Figura 1), desarrollando la cisticercosis humana (Flisser *et al*, 1997). El mecanismo por el cual los embriones entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos del hombre es similar al descrito en los cerdos. Las formas principales de contagio humano incluyen ingestión de comida contaminada con huevos de *T. solium* y contaminación ano-mano-boca en individuos portadores del adulto de *T. solium* en su intestino, los que pueden auto-infectarse o infectar a otras personas, sobretodo a sus convivientes domésticos (Sarti *et al*, 1988). La transmisión aérea de huevos de *T. solium* y la regurgitación de proglótidos desde el intestino delgado hacia el estómago (auto-infección interna) no han sido adecuadamente demostradas como fuentes importantes de adquisición de la enfermedad (Del Bruto *et al*, 1996).

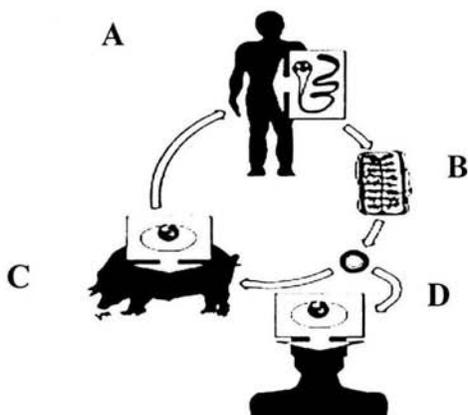


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*: **A)** huésped definitivo, **B)** eliminación de proglótidos llenos de huevos, los cuales pueden ser ingeridos por el cerdo **C)**, o por el hombre **D)** ocasionando la cisticercosis, cuando el cisticerco se aloja en el SNC produce la neurocisticercosis. Reproducido de Flisser *et al*, 1997.

1.4. Diagnóstico

La teniosis se diagnóstica por la identificación de proglótidos expulsados en el excremento, o bien, por el análisis de los huevos mediante técnicas coproparasitológicas de sedimentación o flotación, cuya sensibilidad no es mayor de 60% (Sarti, 1986; Sarti, 1989; Schantz y Sarti, 1989). Con la finalidad de desarrollar pruebas rápidas, sensibles y específicas se estandarizó un método inmunoenzimático o ELISA (por las siglas en inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) para la captura de antígenos de *Taenia sp* en heces de personas infectadas y de modelos experimentales en roedores, mostrando una alta sensibilidad (95%) y especificidad (94%) (Allan *et al*, 1990). Con esta técnica se ha logrado llevar a cabo el seguimiento de la infección y Garza (2001) la comparó con la liberación de proglótidos en el modelo de teniosis en *Chinchilla Laniger*.

En la actualidad el diagnóstico de la cisticercosis humana se apoya principalmente en estudios de imagen: la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM), desafortunadamente estas técnicas de imagen no son accesibles para la mayor parte de la población que padece la enfermedad; por ello se han desarrollado pruebas diagnósticas, económicas y prácticas, orientadas a la identificación de anticuerpos contra el cisticerco (Sarti, 1986). La técnica que actualmente ha mostrado mayor sensibilidad (98%) y especificidad (100%) es el Western blot descrito por Tsang *et al* (1989) y está basado en una inmunoelectrotransferencia (IET) la cual depende del reconocimiento a siete bandas antigénicas diagnósticas: GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13, donde el prefijo GP indica que es una glicoproteína y el número corresponde a su peso molecular. Si la prueba es utilizada en líquido cefalorraquídeo existe la certeza de que se trata de neurocisticercosis, pero si se realiza en suero, un resultado positivo no necesariamente indica la enfermedad, sino podría únicamente reflejar el contacto con el parásito (Sarti, 1986).

El diagnóstico de la cisticercosis porcina puede realizarse *antemortem* (en pie) o *posmortem* (en la canal). El diagnóstico *antemortem* se lleva a cabo mediante la palpación de la lengua en búsqueda de cisticercos, aunque es poco sensible. El diagnóstico *posmortem* se realiza generalmente en rastros, para lo que se hacen cortes en los músculos en búsqueda de cisticercos; aun cuando se realiza la inspección en forma esmerada, algunas infecciones leves pueden pasar desapercibidas, generalmente cuando hay menos de 10 cisticercos (González *et al*, 1990; González *et al* 1994). La IET tiene una sensibilidad y especificidad hasta del 100% en el caso de los cerdos (González *et al*, 1990; Tsang *et al*, 1991), sin embargo al igual que en humanos puede reflejar exposición y no infección. Los metacéstodos musculares en el cerdo desencadenan una reacción inflamatoria a su alrededor y se ha observado que a partir de los dos meses posinfección las células inflamatorias, generalmente neutrofilos y eosinofilos invaden al parásito y lo transforman de vesicular a calcificado (Aluja y Vargas, 1988). En cerdos rurales, el parásito puede persistir en su forma vesicular hasta un año (Sciutto *et al*, 1995). La rapidez de la destrucción depende probablemente de factores como el estado nutricional del animal y su capacidad de producir la respuesta inmunológica efectiva. Algunas observaciones sugieren que tal vez influyan factores genéticos (raza) en el proceso de implantación y destrucción del parásito (Sciutto *et al*, 1995).

1.5. Modelos experimentales de teniosis por *T. solium*

Se han llevado a cabo diversos estudios en animales de laboratorio infectados experimentalmente con cisticercos de *T. solium*. Los resultados han sido muy variables, con infecciones infructuosas en gatos, conejos, cerdos y monos rhesus y exitosas en hámsteres, gerbos, chinchillas (Maravilla *et al*, 1998) y en un gibón (Cadigan *et al*, 1967). Para establecer los modelos experimentales de céstodos *in vivo* se han empleado corticosteroides, ya que estos fármacos incrementan la carga parasitaria y la

maduración de los parásitos en sus hospederos no naturales (Verster, 1971; Sato y Kamiya, 1989; Avila, 1992; Aguilar, 1995; Maravilla *et al*, 1998; Garza, 2001). Las tenias obtenidas de hámsteres y gerbos son sexualmente maduras pero con huevos inmaduros (Maravilla *et al*, 1998). En el gibón se logró obtener una *T. solium* completamente desarrollada con proglótidos grávidos y huevos maduros (Cadigan *et al*, 1967); sin embargo, el alto costo de mantenimiento del modelo y la restricción en el uso de estos animales por estar en peligro de extinción lo hacen inoperable. En 1998, Maravilla y colaboradores lograron completar el ciclo biológico de *T. solium* en chinchillas de cola larga, lograron infectar cuatro chinchillas y sólo en una de ellas se recuperó una tenia grávida con huevos maduros a las 12 semanas postinfección (SPI), la tenia completa se utilizó para infectar un cerdo y a la necropsia del animal realizada a las 12 SPI se recuperaron 14 cisticercos del tejido muscular. Posteriormente, Garza en el 2001 reprodujo este modelo, obteniendo 6 tenias grávidas de 3 chinchillas, a partir de las 11 SPI. Con 48,750 huevos recuperados de proglótidos infectó un cerdo, la necropsia se realizó a las 12 SPI y sólo recuperaron 5 cisticercos (0.01%), es probable que la baja eficiencia de infección obtenida se haya debido a que las tenias permanecieron en refrigeración durante más de cuatro meses para obtener suficientes huevos y la viabilidad de éstos disminuyó.

1.6. Los huevos de *T. solium*

Los huevos de *T. solium* son ligeramente elipsoidales, tienen apariencia radiada cuando se observan bajo el microscopio de luz (figura 2A), miden entre 35-45 μm x 30-40 μm (Laclette *et al*, 1982) y consisten en una oncosfera o embrión hexacanto, llamado así porque tiene 6 ganchos y está rodeado por varias capas (Lethbridge, 1980). La más externa es el vitelo que envuelve a los huevos cuando están en el útero y consiste de una cubierta celular sincicial caracterizada por la presencia de elementos

citoplasmáticos como mitocondrias y glucógeno que protege y/o nutre a la oncosfera. La siguiente capa es la membrana externa del embrióforo; que se observa como una membrana discontinua con depresiones parecidas a cráteres y se encuentra asociada con la superficie externa del embrióforo. Continúa la capa más importante, el embrióforo (Figura 2B), formado por bloques poligonales irregulares compuestos de una proteína similar a la queratina, que es resistente a los jugos digestivos naturales y artificiales; en contraste, la sustancia cementante que une los bloques es susceptible a la digestión enzimática y a la degradación con hipoclorito de sodio (Wang *et al*, 1997; Yoshino en 1933), dispersando así los bloques embriofóricos y liberando la oncosfera todavía envuelta por su membrana oncosferral, mediante el proceso denominado “eclosión” (Smyth, 1963 en Afedia y Ogurinate, 1988). Bajo la capa del embrióforo se encuentra un sincicio celular denominado “célula del embrióforo” (Nieland, 1968 en Laclette *et al*, 1982); ésta capa contiene abundantes mitocondrias y ribosomas lo cual indica una alta actividad metabólica por lo que se ha sugerido que es la encargada de la síntesis de los bloques embriofóricos y de la proteína cementante. Se cree también que forma la membrana oncosferral, la cual confiere al embrión impermeabilidad a muchos colorantes y con la adición de sales biliares aumenta su permeabilidad y aparentemente propicia la señal para que la oncosfera se active (Chew, 1983). El término activar se refiere a la iniciación de una serie de movimientos de los ganchos lo cual permite a la oncosfera escapar de la membrana oncosferral e introducirse en el epitelio del hospedero (Yoshino, 1933). La oncosfera de los céstodos mide alrededor de 28 μm es un conjunto de células somáticas musculares y germinativas, ricas en mitocondrias, gránulos ribosomales y con presencia de retículo endoplásmico y aparato de Golgi, además de tres pares de ganchos aparentemente queratinizados (Holcman *et al*, 1994). La oncosfera está cubierta por un epitelio sincicial con extensiones citoplasmáticas particularmente prominentes en los polos anterior y posterior, de las cuales no se tiene clara su función,

sin embargo se considera que incrementan el área de absorción de nutrimentos (Lethbridge, 1980). El epitelio es continuo alrededor de toda la oncosfera, aunque permite la emersión de los ganchos y la apertura de canales en la región anterior, entre los ganchos medios y laterales, por los cuales son secretadas vesículas con función lítica, provenientes de las denominadas glándulas de penetración (Lethbridge, 1980; Laclette *et al*, 1982).

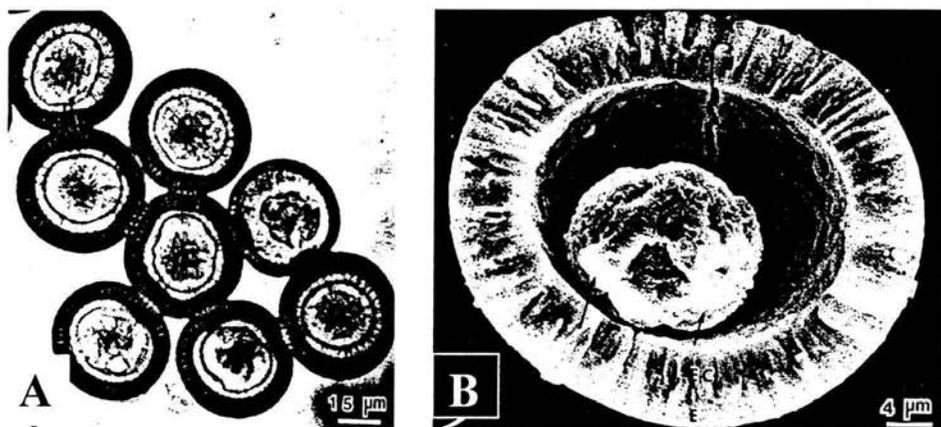


Figura 2. A) Micrografía de luz de huevos de *T. solium* donde se observa la cubierta radiada que forman los bloques embriofóricos. B) Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *T. solium* fracturado. Las flechas indican un par de ganchos bajo la membrana oncosferal. Reproducidas de Laclette *et al*, 1982.

1.7. Métodos para determinar viabilidad celular

Debido a que los métodos *in vitro*, para medir la viabilidad de huevos de céstodos se basan en las técnicas de viabilidad celular a continuación se describen varias de éstas. Dentro de las más utilizadas está el conteo de células tanto teñidas como no teñidas por algún colorante en un hemocitómetro (Dickson, 1970; Phillips, 1973; Holden *et al*, 1973; Patterson, 1979). Estas pruebas se basan en el hecho de que las células que son viables pueden excluir dichos colorantes por procesos de transporte activo, mientras

que las células que no son viables no tienen esta capacidad debido a que su membrana y su metabolismo están afectados (Dolan, 1965; Patterson, 1979). Numerosos colorantes han sido utilizados para diferenciar a las células vivas, no teñidas, de las muertas como el azul tripano, el rojo neutro, la eritrosina B, la nigrosina y el azul de metileno (Dolan, 1965; Dickson, 1970; Phillips, 1973; Daly 1973; Patterson, 1979). Con conteos realizados en el hemocitómetro se puede estimar el número total de células vivas y muertas que se encuentran en una suspensión dada (Absher, 1973).

Igualmente las sales de tetrazolio, como el bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se han utilizado para medir la viabilidad de células (Schaeffer *et al*, 1976; Scudeiro *et al*, 1988), estas sales son componentes de amonio solubles en agua que pueden ser convertidas a formazanos, insolubles en agua y no susceptibles de auto-oxidarse por actividad de la enzima succinato reductasa presente en la membrana mitocondrial. La técnica se fundamenta en que las células vivas reducen el colorante mientras que las células muertas no y como el MTT es amarillo y el formazan azul, se consideran viables a las que se aprecian azules (Morgan, 1998).

Otras técnicas para calcular la viabilidad de las células son las que utilizan fluorocromos, que son sustancias con la propiedad de emitir un fotón al hacer incidir luz de una longitud de onda determinada. Uno de estos fluorocromos es el yoduro de propidio (YP) el cual se intercala en los ácidos nucleicos incrementando sustancialmente su fluorescencia, ya que la señal fluorescente es proporcional a la unión de este fluorocromo con el ácido nucleico. La membrana de las células vivas no permite el paso del YP al interior del citoplasma (Yeh *et al*, 1981; Molina *et al*, 1995; Satomi *et al*, 2001), de manera que únicamente tiñe las células que tengan dañada su membrana, es decir que se encuentran muertas.

Una forma más de evaluar la viabilidad celular se basa en el movimiento que presentan las células, que se puede captar a través de observaciones al microscopio

durante periodos mayores a 15 segundos (Dolan, 1965). Por medio de la microscopia de contraste de fases se puede monitorear la habilidad de las células para unirse a la superficie del recipiente de cultivo, además de la integridad de su membrana y su apariencia general.

Hay además técnicas que miden las condiciones de vitalidad de las células como lo es la propuesta por Dickson en 1970, quien encontró que la absorción de aminoácidos no metabolizables marcados, depende de un complejo acarreador que se encuentra en la membrana y que realiza transporte activo semejante a una bomba de aminoácidos, por lo cual, el hecho de que la célula tome los aminoácidos y los acumule dentro de sí, puede usarse como una prueba de viabilidad celular. Dickson demostró que las células que tienen la capacidad de concentrar los aminoácidos no metabolizables corresponden directamente a aquellas células que excluyen el azul tripiano.

1.8. Viabilidad de los huevos de *T. solium*

Los huevos de *T. solium* se consideran maduros e infectivos cuando, vistos bajo el microscopio de luz, se aprecian sus 3 pares de ganchos y una cubierta radiada (embrióforo) íntegra; sin embargo, es difícil saber si todos los huevos tienen las características biológicas, físicas y químicas que les confieren viabilidad (Smyth y McManus, 1989). Silverman (1954) al estudiar el desarrollo embrionario de varios ténidos observó que las oncosferas tienen células pequeñas que se pueden teñir con colorantes vitales. Para esto, antes es necesario disgregar el embrióforo de los huevos ya que éste impide la entrada de colorantes. Con este fin, se han reportado dos métodos: el uso de enzimas como la pepsina y el de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.05 % siendo este último el que ha mostrado mejores resultados (Wang, *et al* 1997).

1.8.1. Método de activación

La activación (AC) de las oncosferas se lleva a cabo al simular las condiciones en las que se encuentra en el intestino delgado, así, se mezclan embriones con bicarbonato de sodio, tripsina y bilis de cerdo a 37°C durante 1 a 3 horas y al término de este tiempo se consideran viables las oncosferas que se mueven; el porcentaje de viabilidad reportado para esta técnica es del 58% en oncosferas de *T. pisiformis* (Brandt y Sewell, 1981), 73% en oncosferas de *T. saginata* (Stevenson, 1982) y 20% para las oncosferas de *T. solium* (Rhoads *et al*, 1987). Es importante mencionar que Coman y Rickard (1976), al comparar los porcentajes de viabilidad de oncosferas de *T. pisiformis* (obtenidos con el método de azul tripano y activación), con los porcentajes de infección en conejos infectados experimentalmente, concluyeron que la activación es una técnica con la que se obtienen resultados de viabilidad muy erráticos.

1.8.2. Método de azul tripano

El AT es una molécula colorida de alto peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células sin potencial de membrana (células muertas) por lo que al ser empleado en oncosferas, las que se tiñen con azul no son viables. Wang *et al* (1997) reportaron 87% de viabilidad con esta tinción al hacer la observación un minuto después de añadir 100 µl de colorante (diluído al 0.4% en agua destilada) a una suspensión de oncosferas de *T. Solium*.

1.8.3. Método de reducción de bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio

El MTT es una sal que se penetra fácilmente las membranas celulares y que en el caso de las oncosferas, al llegar a la membrana mitocondrial se reduce por acción de la enzima succinato reductasa a un complejo precipitado azul, por lo que sólo las células metabólicamente activas se tiñen y se consideran como viables. Molinari *et al* (1993), al

utilizar esta técnica con oncosferas de *T. solium* después de 12 horas de incubación a 37°C, reportaron una viabilidad de 92.5%.

1.8.4. Método de rojo neutro

El RN provoca una tinción vital sobre los lisosomas de las células vivas que son las que tienen un potencial de membrana y permiten su entrada. Además, en las oncosferas el RN tiene una afinidad por las glándulas de penetración (Lethbridge y Gijssberg, 1974). Curiosamente, se ha reportado su metodología y su uso (Heath y Smith, 1970), indicando que las observaciones se hacen un minuto después de agregar el colorante a la suspensión con oncosferas, más sin embargo, no mencionan porcentajes de viabilidad con esta técnica.

1.8.5. Método de yoduro de propidio

El YP es un fluorocromo muy usado para determinar viabilidad en cultivos celulares, se ha utilizado en espermatozoides de mamíferos, ooquistes de *Cryptosporidium* y trofozoitos de *Giardia* (Yeh *et al*, 1981; Molina *et al*, 1995; Satomi *et al*, 2001; Romero-Montoya *et al*, 2002) debido a la sencillez en su uso técnico, y a que la observación se realiza 5 minutos después de añadir el YP a la muestra. Esta tinción se presenta en esta tesis como una opción nueva para valorar la viabilidad de las oncosferas de *Taenia sp.*

1.8.6. Infección de cerdos

La valoración *in vivo* de los huevos de *T. solium* se ha llevado a cabo mediante la infección experimental de cerdos (*Sus scropha*) por vía oral. Los más usados son los EHY-L (figura 3A) que son cerdos de color blanco con cuerpo largo, de orejas cóncavas grandes cuyo peso en el adulto oscila de 80-180 kg (Bollen *et al*, 2000), lo que los

convierte en animales de difícil manejo. Recientemente se han empleado cerdos miniatura como modelo experimental de cisticercosis (Fan *et al*, 2001), en el presente trabajo se propone usar cerdos vietnamitas (figura 3B) como modelo para la cisticercosis porcina. Esta raza de cerdos asiáticos son de color negro con piel arrugada especialmente en la cara, de orejas cortas, rectas, abdomen redondo abultado y presentan las ventajas de ser cerdos pequeños cuyo peso en el adulto oscila de 40-60 kg (Bollen *et al*, 2000).



Figura 3. A) Cerdo vietnamita. B) Cerdo europeo híbrido York-Landrace. Reproducidos de Bollen *et al*, 2000.

2. HIPÓTESIS

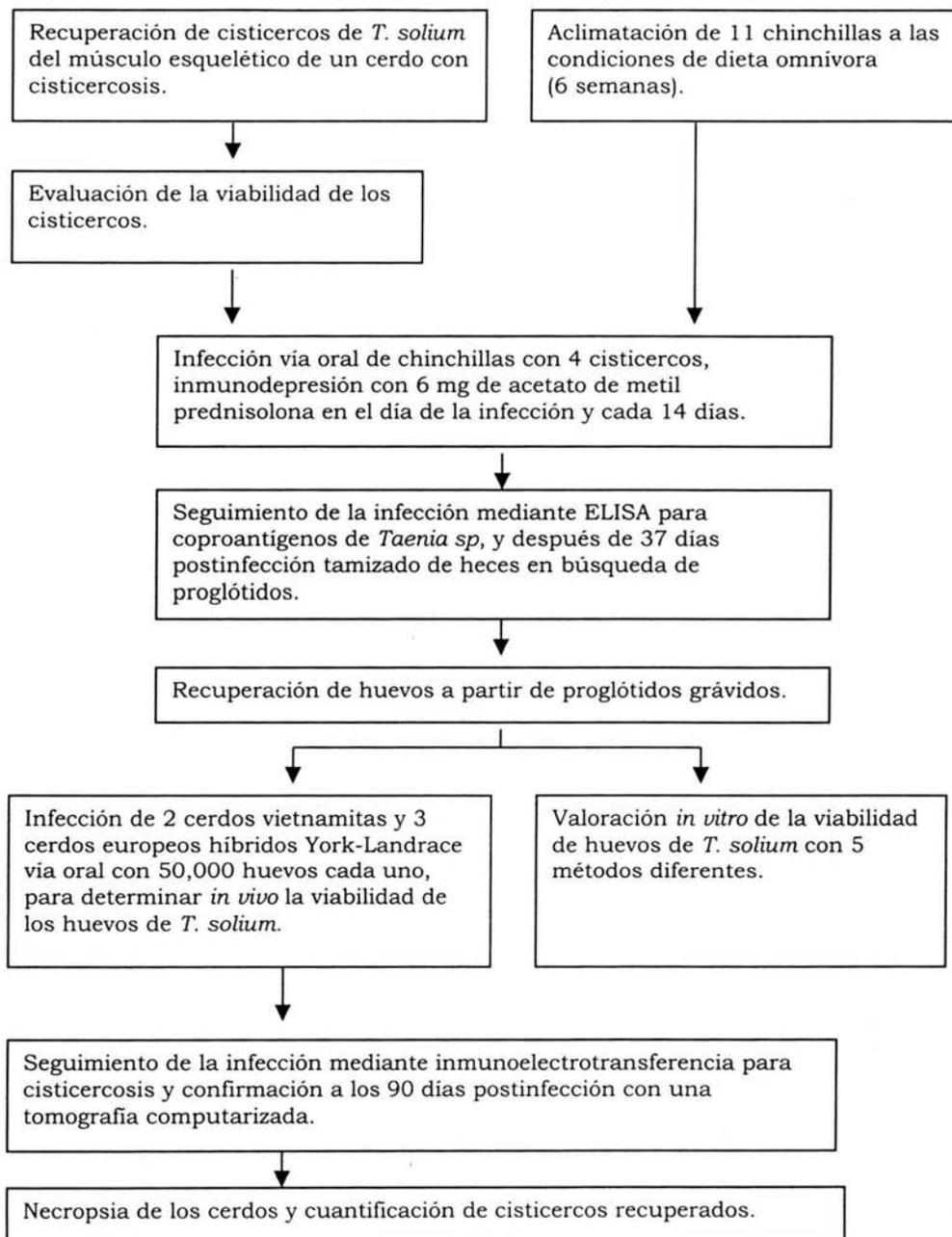
Es posible conocer la viabilidad de los huevos de *Taenia solium* obtenidos del modelo de *Chinchilla laniger* mediante ensayos de viabilidad *in vitro* y confirmarla con la infección experimental en cerdos vietnamitas y europeos híbridos York-Landrace.

3. OBJETIVOS

- Valorar y comparar la viabilidad *in vitro* de huevos de *Taenia solium* obtenidos del modelo de teniosis en *Chinchilla laniger* mediante los métodos de activación y tinción con azul tripano, rojo neutro, yoduro de propidio y reducción de MTT.
- Llevar a cabo la infección experimental de cerdos vietnamitas con huevos de tenias obtenidas del modelo experimental en chinchilla y usar cerdos europeos híbridos York-Landrace como controles de infección.
- Relacionar el número de cisticercos desarrollados en los cerdos vietnamitas y europeos híbridos York-Landrace con los resultados de viabilidad *in vitro* de huevos de *Taenia solium*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Diagrama de flujo del método usado en este trabajo.



4.1. Aclimatación de las chinchillas

Se adquirieron 11 *Chinchillas laniger* hembras de 7 meses de edad, las cuales fueron instaladas en jaulas de metal individuales diseñadas especialmente. Su dieta inicial consistió en comprimidos comerciales para conejo (conejina, Nutrimentos Purina) la cual se fue sustituyendo progresivamente por alimento rico en proteínas para omnívoro (Monkey diet Teklad). Al final de 6 semanas su dieta consistió sólo en alimento comercial para omnívoros y agua *ad libitum*. Antes de la infección las chinchillas se desparasitaron por vía oral con dosis únicas de albendazol (20 mg/kg peso) y una semana después la de prazicuantel a 30 mg/kg peso.

4.2. Obtención y viabilidad de los cisticercos

De un cerdo infectado de manera natural proveniente de Yucatán se extrajeron metacéstodos de *T. solium* del músculo esquelético. Los cisticercos se colocaron en solución salina amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.2 o PBS (*phosphate buffered saline*). A 10 de estos metacéstodos se les realizó la prueba de evaginación *in vitro* (Correa *et al*, 1987) colocándolos en una mezcla de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) y bilis porcina en una proporción 1:4, utilizando 4 ml de la mezcla por cisticerco y durante 3 horas a 37°C. Terminando el tiempo de incubación se contabilizó el número de cisticercos evaginados y su movilidad.

4.3. Infección e inmunodepresión de chinchillas

Cada chinchilla se infectó por vía oral con 4 cisticercos, a los que previamente se les eliminó su vesícula. Los roedores se inmunodeprimieron por vía intramuscular con 6 mg de acetato de metil prednisolona (Depo-Medrol, Upjohn) cada 14 días según la recomendación de Garza (2001), la primera dosis se aplicó el día de la infección, el cual se consideró como el día cero.

4.4. Seguimiento de la infección por captura de coproantígenos

Un día antes de la infección y semanalmente después de la misma, se colectaron aproximadamente 2 gramos de materia fecal de cada chinchilla, las muestras se colocaron en tubos cónicos de 1.5 ml y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su procesamiento, donde se determinó mediante el ELISA descrito por Allan *et al* (1990) la presencia de coproantígenos (CpAgs) de *Taenia sp* de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1) Las muestras se transfirieron a temperatura de refrigeración (4°C), se les agregó agua potable en un volumen 1:2 (v/v) para hidratar la materia fecal se incubó durante 24 hrs. En placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano marca Nunc, MaxiSorb, se agregó a cada pozo 100 μl de una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-*T. solium* a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en amortiguador de carbonatos (0.05M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$) pH 9.6, dejándolos en incubación a 4°C durante 12 horas.
- 2) Se decantó el contenido de los pozos y las placas se lavaron con 200 μl de solución salina amortiguada con fosfatos, adicionada con Tween 20 al 0.3% (PBS-T) pH 7.2. Se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno.
- 3) Los pozos se bloquearon con 100 μl de PBS-T durante una hora a temperatura ambiente.
- 4) Se repitió el lavado del paso 2.
- 5) Se homogenizaron las muestras de materia fecal con PBS-T en una proporción 1:2 (v/v) y se centrifugaron a 12,000 rpm durante cinco minutos.
- 6) Se agregaron 100 μl de sobrenadante de heces por duplicado y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.
- 7) Se repitió el lavado del paso 2.
- 8) Se agregó el segundo anticuerpo, IgG de conejo anti-*T. solium* conjugado a la enzima peroxidasa, se diluyó a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS-T y se

agregaron 100 µl a cada pozo. La placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

9) Se repitió el lavado del paso 2.

10) Se agregaron 100 µl del sustrato ácido 5´ amino-salicílico adicionado con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.75% y se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente hasta que las muestras en los pozos tomaron un color café.

11) Se midió el color de cada muestra en un espectrofotómetro lector de ELISA a 450 nm. Una muestra se consideró positiva cuando su valor de absorbencia fue mayor al punto de corte del ensayo, establecido al sumar la media más tres veces la desviación estándar de los valores de absorbencia de las muestras de cada animal tomadas una semana antes de la infección.

4.5. Recuperación de proglótidos

Después de los 37 días post infección (DPI), se colectó diariamente la materia fecal de las chinchillas que fueron positivas en ELISA. Las heces se colectaron en tubos de plástico de 50 ml con tapón de rosca, se dejaron hidratar con un volumen 1:2 de agua potable durante toda la noche a una temperatura de refrigeración (4°C), para después ser tamizadas con abundante agua a través de un tamiz de acero con apertura de malla de 80 µm. Los proglótidos fueron retenidos en el tamiz y recuperados con un pincel de pelo suave, colocándose en una caja Petri de vidrio de 15 cm de diámetro para observarlos al microscopio de disección y agruparlos de acuerdo a su grado de desarrollo en maduros y grávidos, estos últimos se colocaron en tubos de plástico de 15 ml con PBS adicionado con penicilina G (1,000 UI/ml) y sulfato de estreptomicina (10 mg/ml) y se mantuvieron a temperatura de refrigeración hasta su uso.

4.6. Recuperación de parásitos adultos

Con la finalidad de reducir el sufrimiento de los animales infectados y siguiendo las normas éticas establecidas en el bioterio se llevó a cabo el sacrificio de manera humanitaria de aquellas chinchillas que por efecto del glucocorticoide presentaron un deterioro físico marcado, a las chinchillas se les administró pentobarbital sódico (ILARCLSNRC, 1999) en una dosis de 120 mg/kg de peso vía intraperitoneal. A continuación se abrió la cavidad abdominal para localizar el intestino grueso desde el ámpula rectal hasta la porción anterior y separar el mesenterio hasta extender en su totalidad el intestino. Se hizo un primer corte en el píloro y otro en la válvula ileocecal, para separar el intestino delgado, el cual se colocó en una caja Petri de vidrio de 15 cm de diámetro con PBS; con ayuda de tijeras finas y pinzas de disección se abrió longitudinalmente para hacer la búsqueda de tenias, las cuales se manipularon con un pincel de pelo suave, se lavaron tres veces con PBS y se midieron dentro del recipiente. Finalmente, bajo el microscopio estereoscópico, de aquellas que resultaron grávidas se separó la porción del estróbilo con proglótidos grávidos, la cual se conservó bajo las mismas condiciones que los proglótidos recuperados por tamizados, para la posterior infección de cerdos.

4.7. Recuperación de los huevos de *T. solium*

Los proglótidos grávidos de no más de 7 días en refrigeración se maceraron, primero con unas tijeras, y posteriormente con un pistilo de cerámica, sobre un tamiz de acero con apertura de malla de 80 μ m, agregando PBS para concentrar los huevos en un vaso de precipitado de vidrio de 50 ml. La solución resultante se centrifugó en tubos de plástico de 15 ml a 3,000 rpm durante 15 minutos, con un movimiento rápido se decantó el sobrenadante, el cual fue inactivado con NaClO al 6% y desechado al drenaje, mientras que el sedimento con los huevos fue resuspendido con el remanente

del sobrenadante que escurrió por las paredes internas del tubo hasta alcanzar aproximadamente 2ml de solución en la que se resuspendieron los huevos para posteriormente reunirlos en un solo tubo. El cálculo del número de huevos se realizó en una cámara de Neubauer observando en el microscopio con el objetivo 10X en la cuadrícula de glóbulos blancos, se tomaron en cuenta sólo los huevos morfológicamente maduros. El tubo con la suspensión de huevos se conservó en refrigeración a 4°C, para su inmediato uso en la infección de cerdos, así como para realizar los ensayos de viabilidad *in vitro*.

4.8. Infección experimental de cerdos con huevos de *T. solium*

Se colocaron 50,000 huevos maduros en cada una de cinco cápsulas de gelatina dura y con ellas se inocularon por vía oral a dos cerdos vietnamitas hembras de cinco meses de edad y tres cerdos EHY-L de dos meses de edad provenientes de una granja tecnificada. Los animales se identificaron por marcas características de su epidermis y se alojaron en el bioterio de la Dirección de Investigación del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" en donde recibieron alimento enriquecido para cerdos y agua *ad libitum*.

4.9. Eclosión de huevos

Para disgregar el embrióforo se empleó el método de Wang *et al* (1997) con ligeras modificaciones. Se colocaron 100 µl de una suspensión de 1,000 huevos aproximadamente, en uno de los pozos centrales de una placa de 24 pozos de fondo plano (Falcon), se añadieron 800 µl de PBS y 100 µl de NaClO al 0.5 % en solución salina, para tener una concentración final de 0.05% de NaClO, la mezcla se homogenizó agitándose suavemente con una micropipeta, posteriormente se observó continuamente con el objetivo 10X de un microscopio invertido (Nikon Diaphot-TMD) la disgregación de

bloques embriofóricos de los huevos maduros. Cuando la mayoría de los huevos hubo eclosionado (generalmente a los 5 minutos) se paró la reacción colocando el contenido del pozo en un tubo cónico de plástico de 15 ml con 10 ml de PBS, se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante hasta dejar 1 ml en el que se resuspendieron las oncosferas.

4.10. Métodos de viabilidad

Una suspensión de huevos (aproximadamente 5 ml) del mismo lote con el que se infectaron a los distintos cerdos, se ajustó a una concentración aproximada de 10 huevos/ μ l y se dividió en 5 grupos, cada uno destinado a un método de viabilidad *in vitro*. La eclosión de los huevos y técnicas de viabilidad se realizaron conjuntamente y de forma progresiva en el siguiente orden seleccionado de forma aleatoria: 1° activación, 2° AT, 3° MTT, 4° RN y 5° YP. Para observar las oncosferas se utilizó el mismo microscopio invertido donde se observó la eclosión. Asimismo, todos los métodos de viabilidad se realizaron en el mismo tipo de placas de poliestireno de 24 pozos y en este caso se empleó el objetivo 20X para hacer las observaciones al microscopio invertido. Siempre el pozo se revisó en su totalidad haciendo la búsqueda de las oncosferas siguiendo una “S” como se recomienda para la identificación de estructuras parasitarias en preparaciones fijas (Schmidt, 1988).

4.10.1. Método de activación

Para el método de activación se colocó 1 ml de la suspensión de oncosferas recuperadas de la eclosión de huevos, en un pozo que contenía una mezcla de 10 mg/ml de tripsina, bilis de buey al 10% v/v, 10% v/v de suero fetal bovino en RPMI-1640 estéril y bicarbonato de sodio 119 mmol/l. Se mantuvo a 37°C durante una hora y después se empezó a agitar con ayuda de una pipeta Pasteur cada cinco minutos hasta

completar una hora, enseguida se observó al microscopio invertido y se registró el número de oncosferas con y sin movimiento.

4.10.2. Método de azul tripano

Para el método de AT, la suspensión de oncosferas recuperadas de la eclosión (1 ml) se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos para concentrar en 450 μ l las oncosferas, las cuales se colocaron en un pozo, al cual se le adicionaron 50 μ l de azul tripano al 0.4% en agua destilada, un minuto después se observó al microscopio invertido y se contó el número de oncosferas azules (muertas) y translúcidas (vivas).

4.10.3. Método de reducción de bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio

Para el método de reducción de MTT, la suspensión de oncosferas recuperadas de la eclosión (1 ml) se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos para concentrarlas en 100 μ l y se colocaron en un pozo con 1,000 μ l de MTT al 0.025% en solución salina-glucosada al 0.1% y la mezcla se incubó durante 12 horas en una estufa para cultivos celulares a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%, cuantificándose en el microscopio invertido el número de oncosferas translúcidas (muertas) y azules (vivas).

4.10.4. Método de rojo neutro

Para el método de RN en un pozo se colocaron los 1000 μ l de la suspensión de oncosferas recuperadas de la eclosión y 110 μ l de rojo neutro diluido al 0.3% en PBS, un minuto después se observaron al microscopio invertido y se cuantificaron las oncosferas translúcidas (muertas) y teñidas en rojo (viables).

En las técnicas de AT, MTT y RN se realizaron conteos de las oncosferas teñidas en los tiempos que sugiere la literatura y después de 3, 6, 24 y 72 horas, manteniendo a

los embriones en la estufa para cultivos celulares a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

4.10.5. Método de yoduro de propidio

Para el método de YP a 1,000 µl de solución con oncosferas se agregaron 10 µl de yoduro de propidio en una concentración de 1mg/ml en agua destilada y se hizo la lectura a los cinco minutos en el microscopio invertido utilizando fluorescencia a una longitud de onda de 620 nm. Se cuantificó el número de oncosferas con y sin luminiscencia, empleando primero luz blanca para ubicarlas, observándose en las oncosferas muertas puntos rojos fluorescentes.

4.11. Diagnóstico de cisticercosis en los cerdos infectados

Un día antes de la infección de los cerdos y cada 14 días posterior a ella, se colectó una muestra de 5 ml de sangre de la vena yugular de cada cerdo para realizar el seguimiento de la infección mediante Western blot (Tsang *et al*, 1989). Previamente, los animales fueron sedados a través de la vena marginal de la oreja con 2 mg/kg de peso de azaperona (Swindle *et al*, 1988). A los 3 meses postinfección se confirmó el diagnóstico serológico mediante TC, la cual se llevó a cabo en un tomógrafo marca Shimadzu modelo SCT-7000TH en la unidad de imagenología del Hospital. La TC cubrió la parte muscular de los maseteros y piernas de cada cerdo, los que estuvieron inmovilizados y anestesiados con 20-24 mg/kg peso de pentobarbital sódico (Flecknell, 1998) administrado por vía intravenosa a través de la vena marginal de la oreja.

4.12. Necropsia de cerdos y recuperación de cisticercos

La necropsia de los cerdos se realizó en dos fechas; a las 17 SPI se sacrificaron un cerdo vietnamita y dos cerdos EHY-L y a las 27 SPI el segundo cerdo vietnamita y el

EHY-L restantes. El sacrificio se llevó a cabo de acuerdo a las normas éticas del bioterio, en un área asignada en la que se insensibilizaron los animales mediante el uso de un perno cautivo y la eutanasia se completó mediante su sangrado a blanco (NOM-062-ZOO-1999). Se revisó minuciosamente toda la canal, así como lengua, corazón, hígado y cerebro para cuantificar los cisticercos.

4.13. Análisis estadístico

En este estudio descriptivo se empleó el modelo del análisis ANOVA mediante la prueba de Tukey (Statistica software), con el fin de determinar si existía variación entre los métodos empleados en este trabajo, estableciéndose las siguientes hipótesis:

Ho: No se encontrará diferencia significativa entre los diferentes métodos de viabilidad de oncosferas *in vitro*.

Ha: Se encontrarán diferencias significativas entre los métodos de viabilidad de oncosferas *in vitro*.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidad de los cisticercos usados en la infección y su establecimiento en las chinchillas

Los cisticercos empleados en la infección de chinchillas midieron de 0.8 a 1.0 cm de diámetro, el líquido vesicular era transparente y de 10 cisticercos empleados, el 10% evaginaron a las tres horas mostrando movimientos continuos de las ventosas y del rostelo.

5.2. ELISA para detección de coproantígenos de *T. sp* en chinchillas

De las once chinchillas infectadas 3 fueron positivas para el ELISA a partir de la 3 SPI manteniéndose por arriba del punto de corte (0.16). Dos chinchillas que fallecieron a los siete DPI fueron negativas al ELISA pero durante la necropsia se recuperaron 5 ejemplares adultos inmaduros de *Taenia* que no superaron los 1.5 centímetros de longitud. Las seis chinchillas restantes fueron negativas al ELISA y no se recuperaron proglótidos al tamizado de sus heces.

5.3. Proglótidos recuperados de tamizados

Sólo una chinchilla liberó proglótidos en heces durante varias semanas sin que mostrara un detrimento marcado en su estado de salud debido al efecto del inmunodepresor administrado. De este roedor se recuperó un total de 228 proglótidos maduros de la 7 a la 11 SPI (línea azul) y 286 proglótidos grávidos de la 11 a la 15 SPI (línea rosa). En la figura 4. se presenta la cinética de liberación de proglótidos maduros y grávidos por semana, mientras que en el cuadro 2. se muestra específicamente la recuperación diaria de proglótidos de los 48 a los 103 DPI.

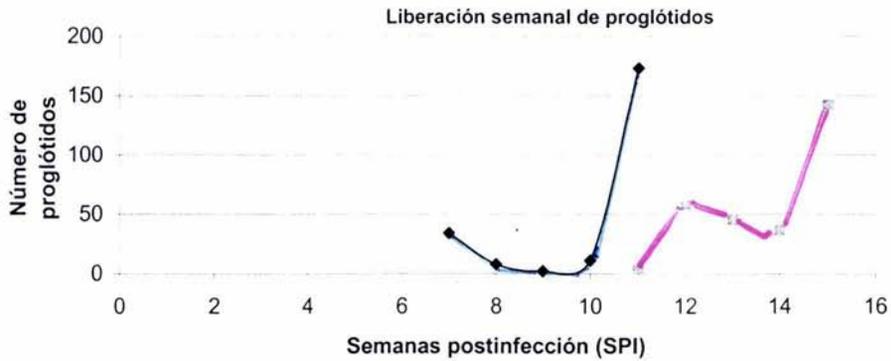


Figura 4. Recuperación de proglótididos en heces de una chinchilla. Los primeros proglótididos obtenidos fueron maduros y se recuperaron a partir de las 7 SPI mientras que los proglótididos grávidos fueron a partir de la 11 SPI.

Cuadro 2. Recuperación de proglótididos de una chinchilla infectada con 4 cisticercos de *T. solium*

DPI*	Proglótididos maduros	Proglótididos grávidos
48	24	0
49	10	0
50	3	0
51	5	0
57	2	0
64	11	0
71	4	1
72	160	2
76	3	1
77	6	0
83	0	17
84	0	41
85	0	2
86	0	6
90	0	37
93	0	37
99	0	21
100	0	24
103	0	97

+Sólo se marcan los días en que se recuperaron proglótididos al tamizado.

*DPI = días postinfección.

5.4. Parásitos adultos recuperados y porcentaje de infección

De las 11 chinchillas infectadas con cisticercos en 6 no progreso la infección, de las otras 5 dos de ellas se sacrificaron a los 50 y 103 DPI porque su salud estaba muy comprometida, las otras tres fallecieron por efectos secundarios de la inmunodepresión (dos en el 7 DPI y una en el 35 DPI). Las cuatro tenias recuperadas de la chinchilla que liberó proglótidos en heces fueron grávidas (cuadro 3). El porcentaje de infección de las 11 chinchillas consideradas como un grupo fue de 34% (cuadro 4).

Cuadro 3. Tenias recuperadas a la necropsia..

Día de la necropsia (DPI)	No. de tenias recuperadas/roedor	Longitud (cm)	Estado de desarrollo
7	1	N.D.	escólex
7	4	1,1.1.5,1.5	inmaduras
35	2	14,14	inmaduras
50	4	20,33,76,90	maduras y pre-grávidas
103	4	125,128,130,180	grávidas

ND: no determinado

Cuadro 4. Porcentaje de infección de chinchillas durante todo el experimento.

Número de roedores en los que se recuperaron tenias a la necropsia.	5
Número de tenias recuperadas en total.	15
Número de cisticercos administrados a cada chinchilla.	4
Porcentaje de infección (No. tenias recuperadas/ No. de cisticercos usados para infectar las 11 chinchillas y multiplicado por 100).	34%

5.5. Recuperación de huevos, eclosión y viabilidad de oncosferas

De las porciones grávidas de los estróbilos de las tenias recuperadas en la última necropsia a los 103 DPI, así como 97 proglótidos grávidos recuperados del último tamizado que permanecieron en refrigeración a 4°C durante 7 días, se recuperaron un total de 300,000 huevos morfológicamente maduros. De estos huevos, 250,000 se emplearon para infectar a los 5 cerdos, mientras que los 50,000 restantes se dividieron en 5 grupos de 10,000 cada uno para ensayar los métodos de viabilidad *in vitro*. Los huevos se eclosionaron con hipoclorito de sodio y se observó que del 95 al 100% de las oncosferas se perdió al final de este proceso.

Debido a que el conteo de oncosferas teñidas resultó dudoso en los ensayos de AT, MTT y RN al hacer la lectura en los tiempos que cita la literatura, el número de embriones vivos y muertos para estos métodos se estableció a las 24 horas, tiempo en que no había duda alguna de la tinción o no tinción de las oncosferas, a las 72 horas no hubo cambios en el conteo de oncosferas viables y muertas.

Los resultados de los distintos métodos de viabilidad mostrados en el cuadro 5, se observa que el coeficiente de variación (CV) definido como la relación entre la desviación estándar y la media, expresada en porcentaje es mayor (a 50%) en las técnicas de Activación y MTT, esto indica que no se puede confiar en la recolección de los resultados individuales en estas dos técnicas. Por otro lado los métodos de AT y YP son los que dan valores más altos de viabilidad y CV más bajos.

En el cuadro 6 se muestra el número de réplicas que se llevó a cabo en cada ensayo así como la desviación estándar del promedio de proporciones obtenida en cada uno para el análisis de *varianza*. El análisis de ANOVA entre los grupos mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los métodos de MTT vs. AT y MTT vs. YP. En la figura 5. vemos la esquematización de los promedios de las proporciones y su desviación en cada uno de los métodos de viabilidad *in vitro* empleados en este trabajo.

Cuadro 5. Viabilidad *in vitro* de oncosferas de *T. solium*.

Método	Número de oncosferas analizadas	Número de oncosferas viables	% de viabilidad	Desviación estándar	Coficiente de variación
Activación	87	26	29.56	21.32	72.12
Azul Tripano	317	170	54.70	6.87	12.55
Reducción de MTT	332	23	6.52	3.51	53.83
Rojo Neutro	95	34	33.25	7.42	22.31
Yoduro de Propidio	373	223	61.65	4.59	7.44

Cuadro 6. Repeticiones de los diferentes métodos de viabilidad *in vitro* para oncosferas de *T. solium*.

Método	Número de oncosferas analizadas	Número de oncosferas viables	Proporciones*	Promedio	Desviación estándar del promedio de proporciones	Varianza
Activación	19	3	0.157	0.2956	0.2132	0.0454
	20	2	0.100			
	12	2	0.166			
	17	9	0.529			
	19	10	0.526			
Azul Tripano	97	45	0.463	0.5470	0.0687	0.0047
	88	50	0.568			
	81	43	0.530			
	51	32	0.627			
Reducción de MTT	119	13	0.109	0.0652	0.0351	0.0012
	89	3	0.033			
	73	3	0.041			
	54	4	0.078			
Rojo Neutro	25	7	0.280	0.3325	0.0742	0.0055
	70	27	0.385			
Yoduro de Propidio	77	50	0.649	0.6165	0.0459	0.0021
	296	173	0.584			

* No de oncosferas viables / oncosferas analizadas

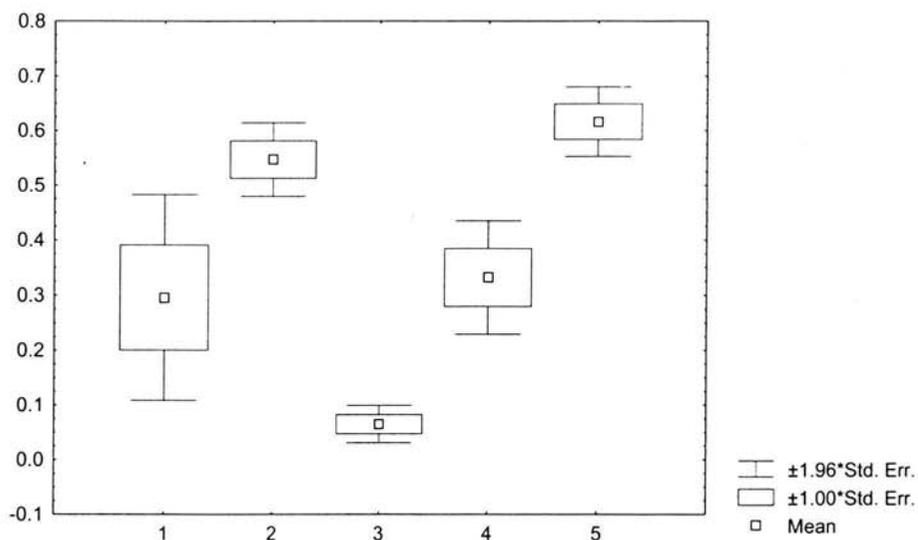


Figura 5. Gráfico de las medias y error estándar de los distintos métodos empleados para medir *in vitro* la viabilidad de huevos de *T. solium*: 1) Activación, 2) AT, 3) MTT, 4) RN, y 5) YP.

En la figura 6. se muestran oncosferas vivas y muertas bajo los criterios de los diferentes métodos utilizados en este trabajo para valorar la viabilidad *in vitro* de los huevos de *T. solium*.

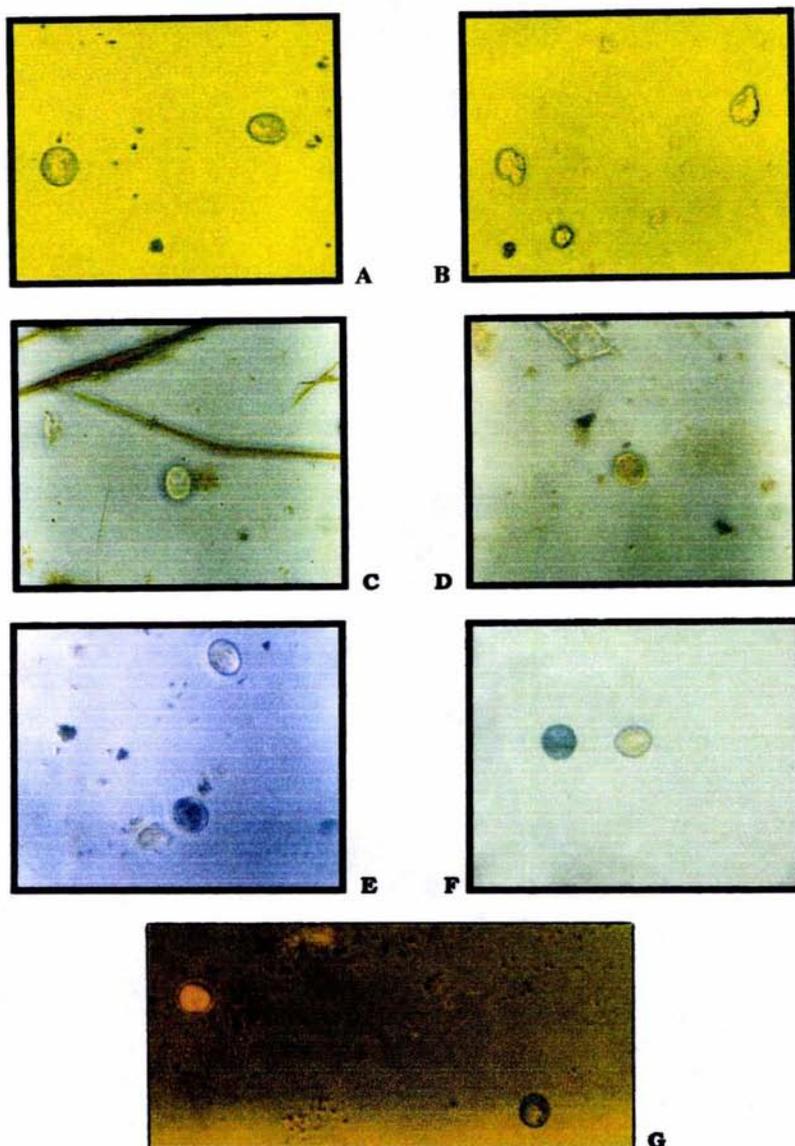


Figura 6. Micrografías de luz (objetivo 20X, ocular 10X) de los distintos métodos de viabilidad *in vitro* para oncosferas de *T. solium*. Oncosferas previas al método de activación (A). Oncosferas con movimientos ameboides durante el método de activación (B). Oncosfera sin teñir (muertas) (C) y teñida (vivas) (D) por el tratamiento de RN. Oncosfera teñida (muerta) y oncosfera no teñida (viva) en el método de AT (E). Oncosferas sin cambio de color (muertas) y con coloración azul (vivas) por reducción del MTT (F). Oncosfera con fluorescencia (muerta) y sin fluorescencia (viva) en el método de YP (G).

5.6. Diagnóstico de cisticercosis en los cerdos infectados

El diagnóstico de cisticercosis en los cerdos EHY-L y vietnamitas, realizado por Inmunolectrotransferencia se muestra en la Figura 7. Los resultados positivos se obtuvieron hasta las 9 y 12 SPI donde se observó que los cerdos vietnamitas y dos cerdos EHY-L fueron positivos a la infección experimental ya que presentaron anticuerpos contra la GP 50,24 y 21, confirmándose el diagnóstico por tomografía computarizada a la 12 SPI (Figuras 8-11).

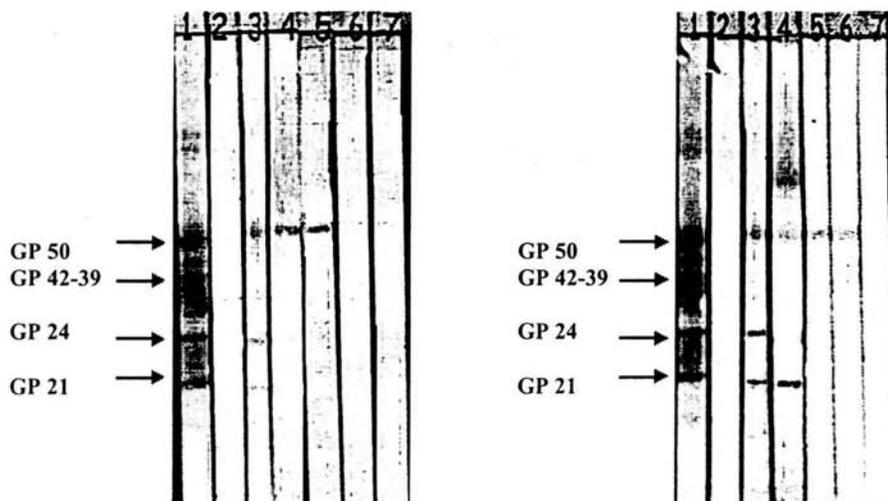


Figura 7. Western blot de los 5 cerdos infectados. La sangre se obtuvo a las 9 SPI (izquierda) y a las 12 SPI (derecha), cada línea corresponde a: control positivo (1), control negativo (2), cerdos vietnamitas (3 y 4), cerdos EHY-L (5, 6 y 7). Las flechas indican las glicoproteínas diagnósticas para cisticercosis por *T. solium*.



Figura 8. Tomografía de las piernas de un cerdo vietnamita (número 3 en el Western blot), tomada a la 12 SPI. La flecha muestra un cisticerco de *T. solium*.



Figura 9. Tomografía de las piernas de un cerdo vietnamita (número 4 en el Western blot), tomada a la 12 SPI. La flecha muestra un cisticerco de *T. solium*.

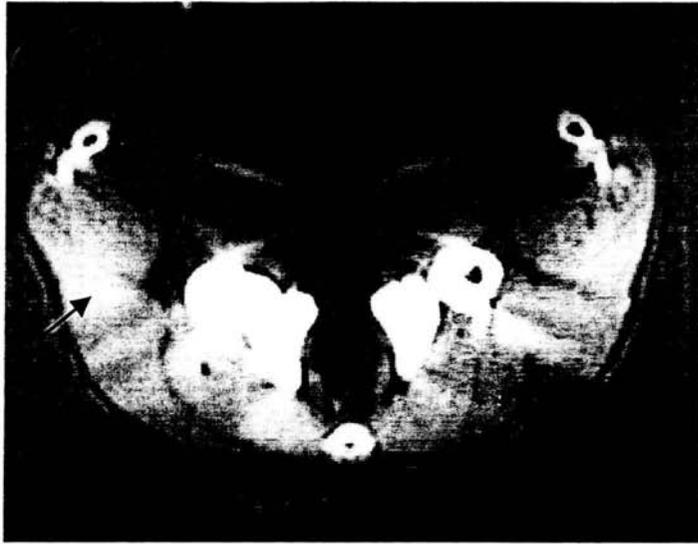


Figura 10. Tomografía de las piernas de un cerdo europeo (número 5 en el Western blot), tomada a la 12 SPI. La flecha muestra un cisticerco de *T. solium*.



Figura 11. Tomografía de las piernas de un cerdo europeo (número 6 en el Western blot), tomada a la 12 SPI. La flecha muestra un cisticerco vesicular de *T. solium*.

5.7. Recuperación de cisticercos de cerdos infectados experimentalmente

Las necropsias de los cerdos se llevaron a cabo a las 17 y 27 SPI. De los dos cerdos vietnamitas positivos en Western blot y TC, al momento de la necropsia sólo de uno se recuperaron cisticercos (todos calcificados), de los dos cerdos EHY-L positivos en Western blot y TC, al momento de la necropsia en uno se recuperaron tanto cisticercos calcificados como vesiculares y en otro sólo vesiculares (cuadro 7).

Cuadro 7. Cisticercos recuperados a la necropsia de los cerdos infectados con 50,000 huevos de *T. solium* recuperados de chinchillas.

Cerdos	Cerdos vietnamitas (Número correspondiente al asignado en el Western blot)		Cerdos EHY-L (Número correspondiente al asignado en el Western blot)		
	3*	4+	5*	6+	7*&
No. cisticercos calcificados	49	0	133	0	0
No. cisticercos vesiculares	0	0	65	160	0
No. Total de cisticercos	49	0	198	160	0
Porcentaje de infección (# de cisticercos recuperados/# de huevos usados para infectar cada cerdo y multiplicado por 100)	0.09	0	0.39	0.32	0

* Necropsia realizada a las 17 SPI. +Necropsia realizada a las 27 SPI.

& Este fue el único cerdo negativo en Western blot, TC y necropsia.

El cuadro 8 muestra el número de cisticercos que cada método de viabilidad predice se recuperarán (en base al porcentaje de infección), es decir, todos los cerdos se infectaron con 50,000 huevos y a la necropsia de estos se recuperaron diferentes cantidades de cisticercos, por lo tanto, cada cerdo tiene un porcentaje de infección el cual es el porcentaje de viabilidad por el método de valoración *in vivo*. Si cada método de valoración de viabilidad *in vitro* determina una cantidad de huevos diferente de los 50,000 como viables, considerando que solamente es viable el porcentaje de cisticercos recuperados de los cerdos, entonces basta hacer un ajuste con los porcentajes de viabilidad de los métodos *in vitro* para observar que las técnicas con porcentajes de

viabilidad altos son las que predicen de manera más exacta el número real de huevos que llegan a cisticercos.

Cuadro 8. Porcentajes de infección considerando los valores de viabilidad de los diferentes métodos *in vitro* con respecto al porcentaje de infección obtenido.

Cerdos *	Número de cisticercos que cada método de viabilidad predice se recuperarán (en base al porcentaje de infección)						
	Infección con 50,000 huevos	Porcentaje de Infección (No. de cisticercos recuperados / 50,000)100	AC (29.56%) &	AT (54.70%) &	MTT (6.52%) &	RN (33.25%) &	YP (61.65) &
	Cisticercos recuperados		14,780 +	27,350 +	3,260 +	16,625 +	30,625 +
Vietnamita 3	49	0.098	14.48	26.80	3.19	16.29	30.01
EHY-L 5	198	0.396	58.52	108.30	12.90	65.83	121.27
EHY-L 6	160	0.320	47.29	87.52	10.43	53.20	98.00

* De los que se recuperaron cisticercos a la necropsia.

& Viabilidad estimada por cada método para los huevos de *T. solium* empleados en la infección.

+ Estos valores se obtienen considerando que cada cerdo se infectó con 50,000 huevos. Así el porcentaje de viabilidad estimado en cada método multiplicado por 50,000 y luego dividido entre 100 nos permite conocer el No. de huevos realmente viables según cada técnica *in vitro* empleada para valorar la viabilidad de los huevos de *T. solium*.

° Estos valores se obtienen del producto del porcentaje de infección en este cerdo por el número de huevos de que me dice cada técnica son viables.

6. DISCUSIÓN

A pesar de que el ciclo de vida de *T. solium* se conoce desde el siglo pasado, aún se ignoran numerosos aspectos de la relación hospedero-parásito, debido a que el único portador del estadio adulto es el ser humano. Por esto, se han desarrollado modelos experimentales con los que se estudia la relación hospedero-parásito adulto (Avila *et al*, 2002; 2003), y que han sido de gran utilidad ya que las tenias logran implantarse y crecer. El modelo de teniosis en *Ch. laniger* es el único que permite establecer el ciclo de vida de *T. solium* en el laboratorio, lo que lo convierte en una fuente constante de huevos infectivos. En este trabajo, de 11 chinchillas que fueron infectadas experimentalmente con cisticercos de *T. solium*, sólo en 5 se encontraron tenias al momento de la necropsia, lo que representó un 45 % de eficiencia en la infección.

Por otra parte, los huevos de *T. solium* representan el único estadio del ciclo de vida del parásito que se encuentra en el medio ambiente y en vista de que se ha propuesto que la selección natural es la responsable de adecuar a las especies dentro de sus ecosistemas, podemos suponer que las presiones de selección han favorecido la evolución de estructuras especiales y modificaciones fisiológicas que les permiten permanecer viables a los huevos de *Taenia* por un periodo de tiempo largo hasta ser ingeridos por el hospedero intermediario apropiado, tal como ha sido documentado para algunas otras tenias como *T. saginata* (Storey y Phillips, 1985) y *T. multiceps* (Willis y Herbert, 1984).

Una de las estructuras que confiere a los huevos de *T. solium* resistencia al medio ambiente, es la capa gruesa de bloques embriofóricos, la cual es fácilmente eliminada por la solución de hipoclorito de sodio al 0.05%. Wang *et al* (1997), quienes sugieren que no se excedan más de 5 minutos de reacción entre el hipoclorito y los huevos de *Taenia* para obtener resultados óptimos.

En el presente trabajo, el seguimiento de la eclosión fue realizado bajo el microscopio invertido y con el empleo de cajas de cultivo, así como el tiempo de eclosión cronometrado para tener mayor control al momento de parar la reacción del hipoclorito cuando aproximadamente más del 60% de los huevos presentaran disgregación de sus bloques; sin embargo, se recuperaron pocas oncosferas, lo cual técnicamente limitó los métodos de viabilidad *in vitro* y las réplicas realizadas.

Además, se observó que las oncosferas de *T. solium* recuperadas de chinchillas son más lábiles a la acción del hipoclorito ya que en ensayos previos de eclosión con huevos de *T. saginata* y *T. pisiformis* mostraron ser más resistentes, recuperándose un mayor número de éstas al final del proceso de eclosión. Por tanto, es probable que la sustancia cementante del embrióforo así como la membrana oncosferral de los huevos del modelo de chinchilla sean particularmente susceptibles a la acción desinfectante y reductora del hipoclorito.

El método de activación fue el que presentó mayores variables técnicas, lo cual repercutió en la variabilidad de los porcentajes de viabilidad obtenidos en las diferentes réplicas. Sumado a lo anterior, Coman y Rickard (1976), al utilizar este método para conocer la viabilidad de oncosferas de *T. pisiformis* concluyeron que es una técnica con la que se obtienen resultados “muy erráticos”, lo cual se confirmó en este trabajo ya que fue el método de viabilidad que mayor desviación tuvo en sus réplicas por lo que es necesario llevar a cabo una optimización técnica para que pueda ser empleado como un método confiable de viabilidad de huevos de ténidos.

En la bibliografía se reporta que para las tinciones con azul tripano y rojo neutro la observación de la tinciones se puede hacer un minuto después de agregar el colorante a la muestra de oncosferas (Heath y Smith, 1970; Wang *et al*, 1997); sin embargo, la coloración observada en este tiempo fue muy tenue y no permitió diferenciar claramente una oncosfera teñida de una no teñida, por lo que se decidió mantener en condiciones

de temperatura y CO₂ (37°C y 5% CO₂); de manera que a las 24 horas el resultado de las tinciones resultaron inequívocos. El conteo de oncosferas a las 72 horas no mostró cambios en el número de embriones teñidos.

De manera similar ocurrió con la técnica de MTT, Mollinari *et al* (1993) mencionan que manteniendo las oncosferas por 12 horas en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ es suficiente para verlas teñidas y con metabolismo activo, sin embargo no fue sino hasta las 24 horas cuando se pudo distinguir claramente a las oncosferas teñidas de las no teñidas. Además, el método de reducción de MTT fue la técnica que mostró un menor porcentaje de viabilidad de las oncosferas y comparada con los otros procedimientos resultó significativamente diferente, disminuyendo su posible aplicación en futuras valoraciones de viabilidad en oncosferas de *Taenia*.

En la técnica de yoduro de propidio las oncosferas con fluorescencia se distinguieron perfectamente de las vivas (sin fluorescencia) a los 5 minutos, tal como lo reportan Yeh *et al* (1981), Molina *et al* (1995), Satomi *et al* (2001) y Romero *et al* (2002). Aparte del hecho de que sea una técnica de fácil realización que por primera vez se emplea para valorar la viabilidad en los huevos de un céstodo y que el porcentaje de viabilidad obtenido sea tan similar al observado con la tinción de azul tripano, que es una técnica de viabilidad para céstodos muy citada en la bibliografía (Coman y Rickard, 1977; Wang *et al*, 1997; Santamaría *et al*, 2002). Así mismo, por los resultados obtenidos y por la facilidad técnica en su realización se recomienda su empleo para futuras evaluaciones de viabilidad de oncosferas con un número mayor de réplicas para confirmar su confiabilidad; ya que en este trabajo debido a la gran pérdida de oncosferas en la eclosión del grupo de huevos asignados a este método, sólo se pudieron realizar un par de ensayos.

De los 5 cerdos inoculados con huevos de *T. solium* obtenidos de *Ch. Laniger*, 4 de ellos se infectaron mostrando porcentajes de recuperación de cisticercos dentro de los

intervalos de infección reportados en infecciones experimentales con huevos de tenias de humanos, lo cual permitió valorar *in vivo* la viabilidad de las oncosferas y su correlación con los ensayos *in vitro*.

Respecto al cerdo europeo que fue negativo al diagnóstico por Western blot, y a la necropsia, probablemente no deglutió la cápsula que contenía los huevos.

De los cerdos vietnamitas, sólo en uno de ellos se recuperaron metacéstodos, todos calcificados, del otro no se recuperó ningún cisticerco posiblemente porque se sacrificó 10 semanas después que el primero y en este tiempo tal vez los metacéstodos fueron calcificados y reabsorbidos. Contrariamente, de los dos cerdos EHY-L positivos por Western blot y por TC, se recuperaron cisticercos vesiculares sin que aparentemente hubiera afectado a los cisticercos el tiempo de infección, además de que los porcentajes de metacéstodos recuperados fueron mayores con respecto a los cerdos vietnamitas. En estudios realizados por Aluja *et al* (1988) en el que informan sobre el hallazgo de un número considerable de cisticercos calcificados en distintos cerdos, especulan que en animales bien alimentados bajo condiciones experimentales, el proceso degenerativo de los metacéstodos se acelera; sumado a esto Sciutto *et al* (1995) sugieren la influencia de la raza en el proceso de implantación y destrucción del parásito, sin embargo no sabemos si el hecho de que los cerdos vietnamitas fueran 3 meses mas grandes que los EHY-L haya influido en la respuesta inmune de los primeros; por tanto, podemos sugerir que los cerdos vietnamitas son susceptibles de infectarse con *T. solium* y que por las ventajas que ofrece la facilidad en su manejo vale la pena emplear cerdos miniatura más jóvenes como modelos experimentales de cisticercosis porcina.

7. CONCLUSIONES

Es probable que la gran pérdida de oncosferas durante la eclosión pudo deberse a diferencias en la composición bioquímica de la membrana externa de los huevos obtenidos de tenias de *Chinchilla laniger* y los recuperados de tenias humanas.

Los métodos de activación, tinción con azul tripano, rojo neutro y yoduro de propidio, así como la reducción de MTT mostraron diferentes porcentajes de viabilidad, lo que refleja los diferentes mecanismos de acción de cada sistema, así como las variables técnicas implícitas durante el desarrollo de las mismas. Por lo anterior, estas técnicas no pueden utilizarse indistintamente para diferenciar los huevos viables de los no viables.

En el caso de los métodos de MTT y activación se observa una mayor variación en la desviación estándar, varianza y coeficiente de variación; además, el método de MTT también mostró diferencias significativas con la tinciones de azul tripano y yoduro de propidio; por lo tanto no se recomienda su empleo para determinar la viabilidad de huevos de *T. solium*.

Las técnicas con AT y YP se presentaron como las más indicadas para determinar la viabilidad en los huevos de *T. solium*, ya que además de mostrar menores coeficientes de variación, permiten diferenciar notablemente los huevos teñidos de los no teñidos.

Es conveniente continuar con estudios de la aplicación de las técnicas de MTT y YP para constatar la eficiencia de las metodologías; sin embargo los otros métodos podrían ser técnicamente optimizados si se cuenta con un abasto suficiente de huevos de *Taenia*.

Dada la importancia de determinar la viabilidad de los huevos de *T. solium*, puesto que esta característica influye importantemente en su capacidad de ser infectivo, los grupos de investigación deben retomar este punto tan importante, sobre todo ahora que

ya se cuenta con un modelo de teniosis como es el de *Chinchilla laniger* del que se pueden recuperar tenias grávidas.

La susceptibilidad de infección de los cerdos vietnamitas con *T. solium* indican que pueden llegar a ser confiables como modelos de cisticercosis.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Absher M. Hemocytometer counting. En: Methods and applications. Krusse P, Patterson M, eds. Academic Press Inc. Nueva York. EUA. 1973:395-397
- Afedia S, Ogunrinade A. A comparison of Two Proteolytic Techniques for Hatching *Hymenolepis diminuta* Eggs. Vet Parasitol 1988;27:277-281
- Aguilar L, 1995. Tesis de Licenciatura. Efecto de la carga parasitaria y la dosis del esteroide metil prednisolona en el desarrollo de *Taenia solium* en el modelo experimental del *Mesocricetus auratus*. Fac. de Ciencias, UNAM. México D.F. 84 p
- Allan J, Avila G, Garcia Noval J, Flisser A, Craig P. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. Parasitol 1990;101:473-477
- Allan J, Garcia-Dominguez C, Craig P, Rogan M, Lowe B, Flisser A. Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. Ann Trop Med Parasitol 1991;85:573-576
- Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J, Larralde C, Madrazo I, Velásquez V, Willms K. 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Biblioteca de la Salud, Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp 29-37
- Aluja A, Vargas G. The histopathology of porcine cysticercosis. Vet Parasitol 1988;8:65-67
- Aluja A, Martinez M, Villalobos A. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. Vet Parasitol 1998;76:71-79
- Avila G. 1992. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Detección de antígenos de *Taenia solium* en heces por un método inmunoenzimático. Fac. de Medicina, UNAM. México D.F. 126 p

- Avila G, Aguilar L, Benitez S, Yopez-Mulia L, Lavenat I, Flisser A. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *Int J Parasitol*. 2002;9:1301-1308
- Avila G, Benitez M, Aguilar-Vega L, Flisser A. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitol Res*. 2003;3:284-289.
- Bollen P, Hansen A, Rasmussen H. 2000. The laboratory swine. CRC Press LLC. Florida. EUA. pp 1-10
- Brandt J, Sewell M. *In vitro* hatching and activation of *Taenia taeniaeformis* oncospheres. *Vet Res Commun* 1981;5:193-199
- Brusca R, Brusca G. 1990. Invertebrates. Sunderland. EUA. 922 p
- Cadigan F, Santon J, Tantichareonyus P, Chaicumpa V. The Lar Gibbon as definitive and intermediate host of *Taenia solium*. *Med Res* 1967;53:844
- Cheng T. 1978. *Parasitologia General*. Editorial AC. Madrid. España. pp 474-542
- Chew M. *Taenia crassiceps*: ultrastructural observations on the oncosphere and associated structures. *J Helminthol* 1983;57:101-13
- Coman B, Rickard M. A comparison of *in vitro* and *in vivo* estimates of the viability of *Taenia pisiformis* eggs aged under controlled conditions, and their ability to immunise against a challenge infection. *Int J Parasitol* 1976;7:15-20
- Correa D, Laclette J, Rodríguez-Del Rosal E, Merchant M. Heterogeneity of *Taenia Solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs. *Parasitol* 1987;73:443-445
- Daly W. Electronic enumeration and sizing of cells. En: *Methods and applications*. Krusse P, Patterson M, eds. Academic Press Inc. New York. EUA. 1973:398-399

- Del Brutto O, Wadia N, Dumas M, Cruz M, Tsang V, Schantz P. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 1996;142:1-6
- Dickson J. The uptake of non-metabolizable amino acids as an index of cell viability *in vitro*. *Exp Cell Res* 1970;61:235-245
- Dolan M. Viability assays a critique. *Fed Amer Soc Exp Biol* 1965;15:275-279
- Fan P, Chung W, Guo J, Ma Y, Xu Z. Experimental studies on physiological and morphological aspects of *Cysticercus cellulosae* in pigs. *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34:252-258
- Flecknell P. 1998. Anestesia de animales de laboratorio. Introducción práctica para investigadores y técnicos. Acibria, S.A. Zaragoza. España. pp 200-209
- Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol* 1994;4:77-116
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1997. Cisticercosis humana. Manual Moderno. México D.F. 176 pp
- Flisser A, Lightowlers M. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:353-356
- Flisser A. Cisticercosis. En: Halabe J, Lifshitz A, Nellen H, Tapia R, eds. Vacunación en el adulto. McGraw-Hill Interamericana. México D.F. 2002:114-115
- Garza, A. 2001. Tesis de Licenciatura. Desarrollo de *Taenia solium* en el modelo experimental de chinchilla (*Chinchilla laniger*). Fac. de Ciencias, UNAM. México D.F. 63 p
- González A, Cama V, Gilman R. Prevalence and comparison of serologic assays necropsy and tongue examination for the diagnosis for porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43:194-199

- Gonzalez A, Gilman R, Garcia H, McDonald J, Kacena K, Tsang V, Pilcher J, Suarez F, Gavidia C, Miranda E. Use of sentinel pigs to monitor environmental *Taenia solium* contamination. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:847-50
- Heath D, Smyth J. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. serialis* from oncosphere to cystic larva. *J Parasitol* 1970;61:329-344
- Holcman B, Heath D, Shaw R. Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestode development of *Echinococcus granulosus*. *Int J Parasitol* 1994;24:623-635
- Holden H, Lichter W, Sigel M. Quantitative methods for measuring cell growth and death. En: *Methods and applications*. Krusse P, Patterson M, eds. Academic Press Inc. New York. EUA. 1973;408-412
- Lacleste J, Ornelas Y, Merchant M, Willms K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: *Cisticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser A, Willms K, Lacleste P, Larralde C, Ridaura C, Beltran F, eds. Academic Press. New York. EUA. 1982; 375-387
- Lethbridge R, Gijsbers M. Penetration glands secretion by hexacanth of *Hymenolepis diminuta*. *Parasitol* 1974;68:303-311
- Lethbridge, R. The biology of the oncosphere of cyclophyllide an cestodes. *Helminthol Abs* 1980; 49:59-73
- Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A, Avila G. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol* 1998;84:882-886

- Molina J, Castilla J, Gil T, Hortas M, Vergara F, Herruzo A. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Human Reprod* 1995;10:1280-1286
- Molinari J, Tato P, Lara R, Clinton W. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J Parasitol* 1993;79:124-127
- Morgan D. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Meth Mol Biol* 1998;79:179-83
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Dirección General de Salud Animal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Publicada el 6 de Dic. de 1999
- Patterson M. Measurement of growth and viability of cell in culture. *Meth Enzymol* 1979;58:141-151
- Phillips H. Dye exclusion test for cell viability in tissue culture. En *Methods and applications*. Krusse P, Patterson M, eds. Academic Press Inc. New York. EUA. 1973:406-408
- Rhoads M, Kamanga E, Rapic D, Murell K, Schantz P, Beus A. detection of antibody humans and pigs to *Taenia solium* metacestodes using antigenic fraction from *Taenia hydatigena* metacestodes. *Vet Arhiv* 1987;57:143-150
- Romero-Montoya L, Cruz-Soto M, Argüello-García R, Ortega-Pierres M. Variabilidad y variación en la susceptibilidad de aislados y clonas de *Giardia duodenalis* expuestos *in vitro* A 5-nitroimidazoles y bencimidazoles. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. 07300 México D.F. Cartel (C103) expuesto en XV Congreso Nacional de Parasitología. Universidad de Guanajuato. 2002

- Santamaria E, Plancarte A, Aluja A. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of establishment. *J Parasitol* 2002;88:69-73
- Sarti E. La taeniasis y cisticercosis en México. *Rev Sal Pub Mex* 1986;28:556-563
- Sarti E, Schantz P, Lara R, Gómez H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis in a Mexican village. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:194-198
- Sarti E. Epidemiología de la taeniasis y cisticercosis. En: Flisser A, Malagón F, eds. *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México*. Limusa Noriega. México D.F. 1989:233-242
- Sato H, M Kamiya. Viable egg production of *Taenia crassiceps* developed in the intestine of prednisolone-treated *Mongolian gerbils* and inbred mice. *J. Helminthology*. 1989;64:217-222
- Satomi K, Jenkins M, Ghiorce W, Bowman D. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol* 2001;87:575-581
- Schaeffer W, Friend K. Efficient detection of soft-agar grown colonies using a tetrazolium salt. *Cancer Lett* 1976;1:275-279
- Schantz P, Sarti E. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden* 1989;57:153-163
- Schmidt G. 1988. *Essentials of Parasitology*. WCB Publisher. Iowa. EUA. 394 p.
- Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte L, Hernández M, Villalobos M, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezensky T, Diaz S, Larralde C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cisticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol* 1995;60:53-67
- Scudeiro A, Shoemaker H, Paull D, Monks A, Tierney S, Nofziger H, Currens J, Seniff D, Boyd R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell

grown and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.
Cancer Res 1988;48:4827-4833

- Silverman P. Studies on the biology of some tapeworm of the genus *Taenia*. Vet Rec 1954;7:356-366
- Smyth J, McManus D. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Great Britain. pp 20-34, 156-194
- Stevenson P. Observations on the hatching and activation of fresh *Taenia saginata* eggs. Ann Trop Med Parasitol 1982;77:399-404
- Storey G, Phillips R. The survival of parasite eggs throughout the soil profile. Parasitol 1985;91:585-590
- Swindle M, Smith A, Hepburn B. Swine as models in experimental surgery. J Invest Surg 1988;1:65-79
- Tsang V, Brand A, Boyer A. An enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis 1989;159:50-59.
- Tsang V, Pilcher J, Zhou W, Boyer A, Kamango-Sollo E, Rhoads M, Murrell K, Schantz P, Gilman R. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. Vet Immunol Immunopathol 1991 Aug;29:69-78
- Tsang V, Wilson M. *Taenia solium* Cysticercosis: An Under-recognized but Serious Public Health Problem. Parasitol Tod 1995;11:124-125
- Verster A. Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linneus 1758 y *Taenia saginata* Goeze 1782. Onderstepoort J Vet Res 1971;38:63-64.

- Wang I, Ma X, Kuo C, Fan P. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs, Int J Parasitol 1997;27:1311-1314
- Willis J, Herbert I. Some factors affecting the eggs of *Taenia multiceps*: their transmission onto pasture and their viability. Ann Trop Med Parasitol 1984;78:236-242
- Yeh C, His B, Faulk W. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. J Immunol Methods 1981;43:269-275
- Yoshino, K. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part III. On the development of cysticercus cellulosae within the definite intermediate host. J Med Ass Formosa. 1933; 32:166-169