

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

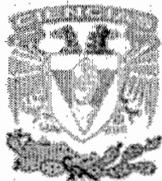
**DESARROLLO DEL CICLO DE VIDA DE
TAENIA PISIFORMIS EMPLEANDO AL
HÁMSTER DORADO COMO HOSPEDERO
DEFINITIVO EXPERIMENTAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

PRESENTA

ELIZABETH TORAL BASTIDA



DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO

MÉXICO, D. F.

2007



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.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

" Desarrollo del ciclo de vida de Taenia pisiformis empleando al hámster dorado como
hospedero definitivo experimental "

realizado por Toral Bastida Elizabeth

con número de cuenta 09807791-1 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario Dr. José Pablo Maravilla Campillo

Propietario Dra. Guillermina Ávila Ramírez

Propietario Dra. Ana Flisser Steinbruch

Suplente Dra. Gabriela Rosas Salgado

Suplente MVZ. Mario Javier Soriano Bautista

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F. a 7 de Septiembre
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGÍA

del 2006

FACULTAD DE CIENCIAS

M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que me dieron la vida y me apoyaron para terminar mis estudios con mucho cariño y agradecimiento.

A mi madre por forjarme como la persona que soy y sus palabras de aliento para lograr esta meta.

Al Dr. José Pablo Maravilla Campillo muchas gracias por su tiempo, confianza, paciencia y conocimientos que me brindo a lo largo de este trabajo.

A mis compañer@s y amig@s del laboratorio del Hospital General Dr. Manuel Gea González y de la Facultad de Medicina: a la Dra. Ana Flisser por darme la oportunidad de pertenecer al grupo de teniosis-cisticercosis, a la Dra. Guillermina Ávila por revisar y hacer aportaciones a mi tesis, a la Bióloga Adriana Garza por brindarme su apoyo, conocimientos y amistad, a la Dra. Angélica Olivo por permitirme invadir su laboratorio muchas veces y por todas sus ideas, al QFB. Joel Martínez, Mayra, Diego y Karina por su compañerismo, al Dr. Ramón y a todos los muchachos del bioterio por su ayuda para el desarrollo de éste trabajo, a Nancy, Rosa "Mary's", Aaxin y Víctor por todos sus chistes, platicas y momentos divertidos que hemos compartido.

Gracias a mis amigos Dani y Juan por haber estado conmigo durante toda la licenciatura compartiendo grandes aventuras y por sus palabras de aliento, a Miguel, Uli, Josué, Dorian, Karina, Esther, Rulo y Fer por el inolvidable tiempo que pasamos en la cafeta y el pulpo, a Stephanie, Eduardo, Uriel, Anibal, Juan, Roberto, Raúl, Chente, Zuri y Samuel por la amistad durante tantos años y Jorge por brindarme su cariño, apoyo y paciencia.

A mi hermana Ana Laura por todo su cariño y por enseñarme a lograr todas mis metas y a mi hermano Leafar, gracias a los dos por llenar mi vida de luz con esos angelitos: Laura y Etienne. A mi tío Guillermo por su tiempo y conocimientos brindados durante mis estudios y a toda mi familia con quienes he crecido y compartido todo este camino.

Finalmente quiero agradecer a todos los maestros y personas que quiero y admiro que han formado parte de este ciclo profesional.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. MODELOS EXPERIMENTALES DE TENIOSIS	8
a. <i>Taenia solium</i>	9
b. <i>Taenia crassiceps</i> y <i>Echinococcus</i> sp.	11
II: MÉTODOS DE VIABILIDAD CELULAR	13
a. Eclosión de oncosferas	13
b. Activación de oncosferas	14
c. Tinción con azul tripano	16
d. Tinción con rojo neutro	17
e. Reducción de MTT	18
f. Tinción con yoduro de propidio	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. JUSTIFICACIÓN	19
V. OBJETIVO GENERAL	20
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	20
a. Recuperación de <i>Taenia pisiformis</i> de perros	21
b. Infección de conejos	21
c. Necropsia y obtención de cisticercos	22
d. Infección e inmunodepresión de hámsteres	22
e. Recuperación de proglótidos	22
f. Necropsia de hámsteres	23
g. Recuperación de huevos de <i>T. pisiformis</i>	24
h. Métodos de eclosión y activación	24

i. Tinción con azul tripano	26
j. Reducción de MTT	26
k. Tinción con rojo neutro	26
l. Tinción yoduro de propidio	26
VII. RESULTADOS	
a. Obtención de <i>Taenia pisiformis</i> en perros	27
b. Recuperación de huevos, eclosión y viabilidad de oncosferas	28
c. Infección de conejos y recuperación de cisticercos en el hospedero intermediario natural	34
d. Infección de hámsteres y recuperación de <i>Taenia pisiformis</i> a la necropsia.	35
VIII. DISCUSIÓN	42
IX. BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

Taenia pisiformis ha sido estudiada como modelo alternativo para aquellos céstodos que son difíciles de mantener en condiciones experimentales, por la especificidad y daño que generan a sus hospederos. En vista de que diversos estudios sobre diagnóstico, vacunación y tratamiento en *Taenia solium* requieren del abastecimiento constante de huevos de este parásito, es necesario contar con un modelo de teniosis experimental alternativo que garantice el suministro de material biológico. El objetivo de este trabajo fue reproducir el ciclo de vida de *Taenia pisiformis* en el laboratorio, empleando al conejo como hospedero intermediario natural y al hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) como hospedero definitivo experimental. Para ello, se siguieron dos estrategias: la primera consistió en obtener tenias adultas grávidas de perros infectados de manera natural, eclosionar y activar los huevos mediante hipoclorito de sodio, fluido gástrico artificial y fluido intestinal artificial e infectar conejas para recuperar los cisticercos y con ellos infectar a los hámsteres para obtener parásitos adultos grávidos. En la segunda estrategia se emplearon cisticercos de *T. pisiformis* recuperados de conejos infectados naturalmente para inocular a hámsteres y obtener tenias. Para el primer caso se infectaron 51 conejas de 8 semanas de edad con 1 500 huevos de *T. pisiformis* evaluándose la viabilidad de los huevos mediante la activación de oncosferas (Act) y con las tinciones con Azul Tripano (AT), Rojo Neutro (RN), reducción del bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2 il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT) y con Ioduro de Propidio (IP). La necropsia de los lagomorfos se realizó en el periodo de 7 a 10 semanas postinfección (SPI) recuperándose cisticercos morfológicamente viables; con los que se infectaron 14 hámsteres machos de 36 semanas de edad, los cuales fueron previamente desparasitados con 2 semanas de anticipación e inmunodeprimidos con 2 mg de acetato metil prednisolona (AMP) por vía intramuscular cada 14 días. El primer grupo integrado por 9 roedores fue infectado con 1 cisticerco vía oral cada uno y el segundo grupo de 5 hámsteres con 3 cisticercos vía oral cada uno. El seguimiento de la infección se realizó mediante el tamizado de heces a partir de la 3 SPI y las necropsias para la recuperación de las tenias adultas se realizaron a partir de la 3 a la 22 SPI, sin embargo, en ninguno de los grupos se recuperó ninguna tenia ni proglótidos en heces. El porcentaje de infección total de las conejas fue del 38 al 61%, recuperándose un total de 97 cisticercos (47 vivos/50 calcificados) de 76,500 huevos administrados, lo que representa el 0.12% de establecimiento global. Para la segunda estrategia, se adquirieron 2 conejas infectadas de manera natural con los que se inocularon a un grupo de 6 hámsteres machos de 36 semanas de edad con 3 cisticercos por vía oral cada uno, llevándose a cabo el seguimiento de la infección a través del tamizado de sus heces de forma semanal y se realizaron las necropsias a partir de la 3 a la 16 SPI, obteniéndose 3 tenias: una inmadura de 6 cm de longitud, una madura de 10 cm y una tenia grávida de 21 cm, además de la recuperación de proglótidos grávidos en heces en 2 hámsteres. Con los huevos de la tenia grávida se infectaron 5 conejas con 1500 huevos cada una y a la necropsia de estas, se observaron 8 cisticercos (6 vivos y 2 calcificados), lo que representó el 0.5% de establecimiento. El porcentaje promedio de viabilidad de todas las oncosferas empleadas fue: 7.8 para Act, 5.8 para AT, 46.6 para RN, 0 para MTT y 79.4 para IP. Los valores de correlación entre el porcentaje de infección según la viabilidad mostrada por cada técnica vs. el porcentaje de infección *in vivo* fue: 0.18 (Act), 0.80 (AT), 0.89 (RN) y 0.63 (IP). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que la obtención de parásitos adultos de *T. pisiformis* en el hámster dorado inmunodeprimido se garantiza con la infección de cisticercos recuperados de infecciones naturales, probablemente por que estos últimos presentan una mayor infectividad en comparación con los cisticercos recuperados en infecciones experimentales debido a una probable presión de selección natural, también es fundamental realizar ensayos de evaginación *in vitro* para asegurar el establecimiento y desarrollo de tenias en el modelo experimental del hámster dorado. Finalmente, sugerimos el uso de la tinción con azul tripano para evaluar la viabilidad de oncosferas de *T. pisiformis* ya que su metodología es sencilla, de fácil interpretación y con adecuada correlación con las infecciones *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

En el cuadro 1 se presenta la clasificación taxonómica con las características distintivas de la especie *Taenia pisiformis* (Schmidt y Roberts, 1984; Brusca y Brusca, 1990; Flisser *et al*, 2005).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Taenia pisiformis*.

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Phylum Platyhelminthes	Animales triblásticos, sin celoma, con simetría bilateral, cuerpo semisólido sin cavidades internas salvo el sistema digestivo que es incompleto ya que tienen un único orificio de comunicación con el exterior, su sistema osmorregulador es del tipo protonefridial y sistema nervioso centralizado de tipo escaleriforme (ganglio cerebroideo anterior y un número de cordones nerviosos longitudinales unidos por comisuras transversales)
Clase Cestoda	Organismos con cuerpo generalmente multisegmentado; con aparato reproductor hermafrodita en cada proglótido; todos son endoparásitos intestinales en etapa adulta. Su cuerpo esta cubierto por un tegumento sincicial con microtricas recubiertas por un glucocálix.
Orden Cyclophyllidea	Los detalles morfológicos más característicos son una glándula vitelógena única compacta y un escólex con cuatro ventosas. Presentan un rostelo que por lo general se encuentra armado con ganchos y los poros genitales son laterales. El cuerpo o estróbilo consiste de proglótidos con distinto estadio de desarrollo (inmaduro, maduro y grávido); cada proglótido se encuentra claramente separado por una división externa. Los huevos son redondos, no operculados y contienen una oncosfera no ciliada con tres pares de ganchos.
Familia Taenidae	La larva se desarrolla en hospederos homeotermos, mientras que los adultos lo hacen en el intestino delgado de carnívoros y el hombre. Los genitales del adulto se concentran en un poro genital localizado lateralmente en los proglótidos, siendo irregularmente alternado a lo largo del estróbilo; los huevos son radialmente estriados formados por bloques denominados embriofóricos. El estadio larvario o de metacéstodo se le denomina comúnmente como cisticerco, cenuro, quiste hidatídico o estrobilocerco.
Género y especie: <i>Taenia pisiformis</i> o <i>Taenia serrata</i> (Bloch, 1780),	Los cánidos son su hospedero definitivo natural y los lagomorfos son sus hospederos intermediarios.

Dentro de la familia Taeniidae existen más de 42 especies, siendo 7 las especies importantes con repercusiones pecuarias, económicas y de salud. En el cuadro 2 se resumen sus características morfológicas de estas tenias y los hospederos.

Cuadro 2. Especies importantes de *Taenia* (Tomado y modificado de Mehlorn y Piekarski, 1993, Loos-Frank B. 2000)

Orden/Especie	Longitud del gusano adulto (m)	Tamaño del huevo (μm)	Hosp. definitivo(s)	Prepatencia (semanas)	Hosp. interm./ Tejido
Ord. Cyclophyllidea Fam. Taeniidae <i>Taenia solium</i>	2-7	35-40	Hombre	5-12	Cerdo, hombre; varios tejidos
<i>T. saginata</i>	9-15	35-40	Hombre	10-12	Vaca; varios tejidos
<i>T. taeniaeformis</i>	0,6	35	Gato, perro	7	Rata, ratón, varios tejidos
<i>T. hydatigena</i>	1	20	Perro	11-12	Rumiantes; omento intestinal
<i>T. ovis</i>	1	30	Perro, zorro	6-7	Oveja; musculatura
<i>T. pisiformis</i>	0,5-2	35	Perro, gato	6	Roedores; omento
<i>T. multiceps</i>	0,4-1	33	Perro, zorro	6	Oveja, hombre; cerebro
<i>T. serialis</i>	0,2-0,7	35	Perro, zorro	1-2	Liebre, conejo; tejidos conjuntivo

MORFOLOGÍA

Como todos los céstodos, *T. pisiformis* presenta tres estadios: el huevo, la larva o metacéstodo, también conocido como cisticerco y el adulto o tenia. El adulto se establece en el intestino delgado del cánido y esta constituido por escólex, cuello y estróbilo. El escólex tiene un diámetro de 1.3 mm, provisto de un rostelo con una doble corona de 34-48 ganchos, alternando los grandes que miden 225-294 micras y los pequeños 130-177 micras, con una apófisis radicular larga y recta (Figura 1).

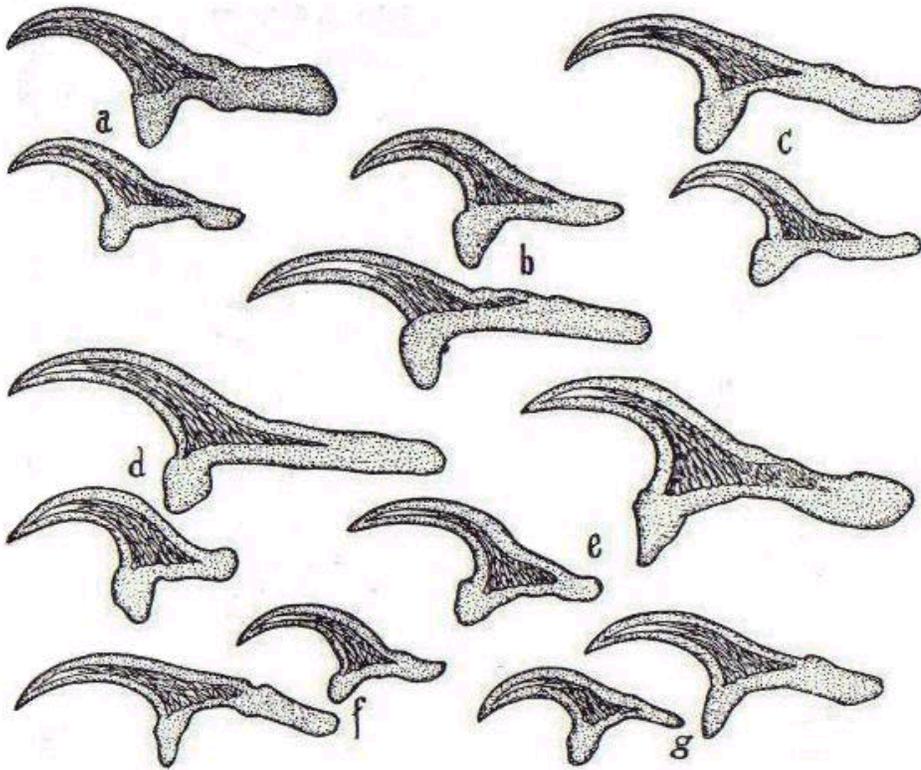


Figura 1. Ganchos rostelares de especies de *Taenia*. **a)** *T. solium*, **b)** *T. hydatigena*, **c)** *T. ovis*, **d)** *T. pisiformis*, **e)** *T. taeniaeformis*, **f)** *T. multiceps*, **g)** *T. serialis*. (Tomado de Soulsby, 1987)

El escólex además tiene 4 ventosas ovales de 35 micras de diámetro que, en conjunto con el rostelo le permiten fijarse al epitelio intestinal del hospedero (Figura 2a). El escólex tiene un adelgazamiento hacia la parte posterior para dar origen al cuello, que no está segmentado y está poco diferenciado, esta región da origen al estróbilo que puede medir de 60 cm hasta 2 m de longitud y está segmentado en proglótidos que son hermafroditas y según el grado de desarrollo se diferencian en inmaduros, maduros y grávidos (Quiroz-Romero, 1986; Soulsby, 1987).

Los proglótidos inmaduros son los más cercanos al cuello, siendo estos mucho más anchos que largos y sus órganos reproductores se encuentran poco diferenciados, los proglótidos maduros se encuentran hacia la parte central del estróbilo y en éstos los órganos reproductores están ya desarrollados para la fecundación, hacia la parte final se localizan los proglótidos grávidos que miden de 8-10 x 4-5 mm, teniendo de 400-500 testículos y un útero con 8-14 ramificaciones a cada lado llenas de huevos (Figura 2b). Los proglótidos grávidos son liberados con las heces, se estima que el tiempo promedio en el que la tenia alcanza la gravidez es de 8 semanas. El estróbilo está constituido por 210 proglótidos aproximadamente y cada proglótido contiene alrededor de 50,000 huevos (Borchert, 1981).

Los huevos son ligeramente ovoides miden entre 43-53 x 43-49 μm contienen un embrión hexacanto que muestra en su interior seis ganchos (figura 2c), una membrana interna, una cubierta radiada formada por bloques de queratina unidos por una sustancia cementante (embrióforo) y están rodeados por una membrana externa. Finalmente tiene una cámara vitelógena muy delgada que protege al huevo de la acción de las enzimas intestinales y que normalmente se pierde en el tránsito intestinal (Soulsby, 1987; Smyth y McManus, 1989).

El estado larvario o metacéstodo conocido también como cisticerco mide de 6-12 x 4-6 mm, el cual es del tipo celuloso constituido por dos estructuras principales, una pequeña

formada por el escólex y el cuello que morfológicamente son iguales al adulto y la segunda formada por una vesícula llena de fluido que aísla al escólex y al cuello del contacto directo con el hospedero intermedio. Por lo general, se presenta en forma de racimos en el peritoneo del hospedero intermedio (Quiroz- Romero, 1986).

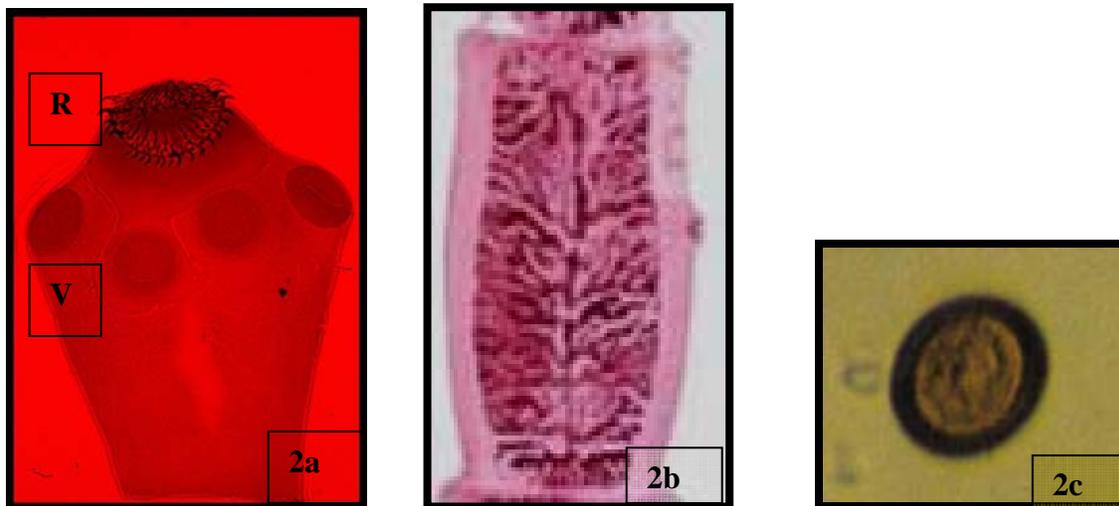


Figura 2. Estructuras de *Taenia pisiformis* 2a) Escólex con cuatro ventosas (V) y (R) rostellum con sus ganchos (40x), (2b) proglótido grávido y (2c) huevo microscópico(40x).

El ciclo de vida de *T. pisiformis* involucra a conejos y carnívoros (Fig.3), este comienza cuando los proglótidos grávidos son liberados en las heces del hospedero definitivo natural que puede ser lobo, coyote, zorro rojo, zorro gris, lince, gatos y perros con la consecuente liberación de huevos al ambiente. Los lagomorfos (conejos y liebres) se infectan al ingerir vegetación contaminada con huevos, los cuales eclosionan en el intestino delgado debido a la acción de la pepsina, pancreatina y otras enzimas, que ocasionan la disgregación del embrioforo; posteriormente, la acción de las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal necesaria para la activación de la oncosfera. Al liberarse las larvas atraviesan activamente la pared intestinal hasta llegar al torrente sanguíneo para ser transportadas hasta el hígado, las oncosferas que no logran

desarrollarse aparecen como manchas blancas, formadas por acúmulos leucocitarios. Las larvas que logran atravesar la barrera hepática, se alojan en la cavidad visceral, peritoneo o epiplón y al cabo de 6 días se transforman en cisticercos, alcanzando dimensiones de 0.5-1 mm. A las 4 semanas el cisticerco esta totalmente desarrollado. El ciclo de vida se completa cuando el carnívoro ingiere al conejo que contiene cisticercos vivos. Las sales biliares y enzimas gástricas e intestinales estimulan al metacéstodo para que evagine el escólex y por medio de sus órganos de fijación (rostelo y ventosas) se adhiere a la mucosa intestinal en el primer tercio del intestino delgado, al cabo de 8 semanas alcanza la madurez sexual donde produce proglótidos grávidos (Borchert, 1981).

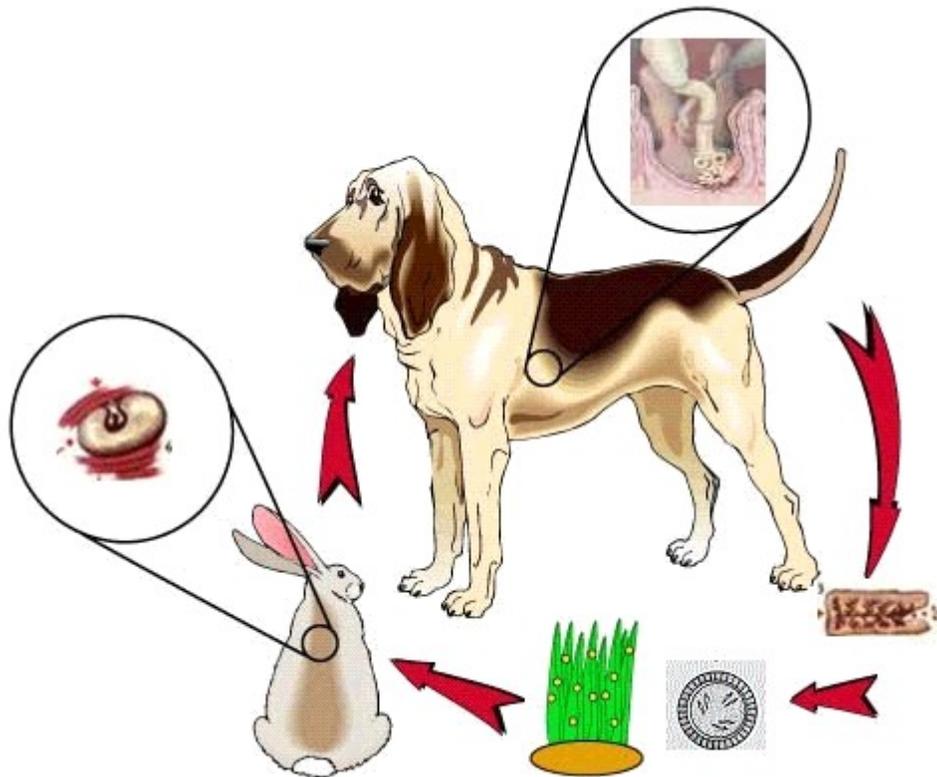


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia pisiformis*

I. MODELOS EXPERIMENTALES DE TENIOSIS

El establecimiento y desarrollo de las distintas tenias en el intestino de sus hospederos definitivos ha motivado el interés de los científicos por estudiar los mecanismos involucrados en la permanencia o expulsión de los parásitos, generando conocimientos que permitan conocer mejor la biología y fisiología del parásito, la relación hospedero-parásito y para controlar de forma indirecta por medio del modelo experimental el daño que produce el estadio larvario de *Taenia solium* en los tejidos de los hospederos intermediarios. Sin embargo, el estudio de las tenias adultas es generalmente complicado ya que aunque en su mayoría estos parásitos no provocan alteraciones clínicas importantes en sus hospederos definitivos, existen factores que dificultan su estudio y recuperación:

1. El hospedero definitivo es difícil de localizar debido a aspectos de extinción (presencia de pocos ejemplares), de peligrosidad (la zootecnia y manejo de carnívoros salvajes como lobos y tigres), reglamentación (no se puede experimentar con animales de zoológicos, de rastros ni centros antirrábicos) y ética (experimentación en humanos y protección de los animales),
2. Métodos de diagnóstico poco sensibles o específicos, o ambos.
3. Reactivos biológicos limitados solo para algunas especies.

Por esto a lo largo de varias décadas se han llevado a cabo diversos estudios en animales de laboratorio infectados experimentalmente con cisticercos de *Taenia sp.* como una alternativa para obtener un abastecimiento constante de material biológico y llevar a cabo estudios de vacunación, igualmente para estudiar la relación hospedero-parásito, los mecanismos de permanencia y de expulsión del gusano adulto, así como para realizar ensayos de embriogénesis y de ecología de poblaciones.

a. *Taenia solium*

El modelo experimental del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) fue descrito por primera vez por Gnezdilov en 1957, este autor comprobó que *Taenia solium* podía crecer en el intestino delgado de los hámsteres, aunque el desarrollo de la tenia fue incompleto y los ejemplares no mostraron diferenciación sexual. Vester (1971,1974) empleó hámsteres tratados con el esteroide Acetato de metil prednisolona (AMP) con lo cual recuperó hasta un 74% de tenias en el roedor, cuando usó dosis de 10 mg del esteroide administrados semanalmente y del 80% con 5 mg, sin embargo, solo obtuvo tenias con proglótidos maduros. También encontró diferencias en el desarrollo del parásito con relación a la cantidad de helmintos establecidos. A los 21 días post-infección (DPI) observaron cuatro ejemplares de *T. solium* que ya tenían conducto genital y testículos pero sin órganos reproductores femeninos, en otras dos tenias se encontraron primordios de los órganos sexuales. En otros dos animales, de los que se recuperaron tres tenias, en cada una se observaron sólo testículos o solo conductos genitales. Un ejemplar recuperado de un hámster a los 36 DPI tenía los órganos reproductores masculinos y femeninos bien desarrollados. Aunque el tratamiento con 10 mg de esteroide permitió obtener *T. solium* más desarrolladas, los animales comenzaron a morir a partir de los 8 DPI y no sobrevivieron más de 35 días. Con dosis de 5 mg el porcentaje de infección fue mayor y los animales sobrevivieron durante más tiempo aunque el tamaño del helminto fue menor.

Monroy-Ostria *et al*, (1993) infectaron vía oral a hámsteres dorados con cisticercos de *T. solium*, encontrando a las dos semanas de infección 100% de implantación de escólices con un tamaño promedio de 4mm en el intestino delgado; a las 6 semanas se encontró 60% de tenias implantadas con un tamaño promedio de 5.7 cm, a las 10 semanas se encontró 16% de adultos implantados con un tamaño promedio de 5.8 cm, sin embargo, a las 14 semanas ya no se encontraron tenias.

Maravilla *et al*, (1998) infectaron con 4 o 5 cisticercos de *T. solium* a hámsteres, gerbos, chinchillas, conejos, gatos, cerdos y monos rhesus, sin inmunodepresión e inmunodeprimidos con distintas dosis de AMP, el seguimiento de la infección la llevaron a cabo mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para coproantígenos de *Taenia sp* y por necropsia. Los conejos, cerdos, gatos y monos rhesus fueron resistentes a la infección, en hámsteres y gerbos se obtuvieron tenias sexualmente maduras con huevos inmaduros, logrando sólo completar el ciclo biológico de *T. solium* en chinchillas de cola larga inmunodeprimidas. A las 12 semanas post-infección (SPI), obtuvieron una tenia grávida con huevos maduros, con la que se infectó un cerdo y a la necropsia del animal se recuperaron 14 cisticercos del tejido muscular. Posteriormente Garza (2001) reprodujo este modelo, obteniendo 6 tenias grávidas de 3 chinchillas a partir de las 11 SPI; con los huevos recuperados infectó un cerdo, sin embargo, debido a que las tenias permanecieron en refrigeración durante más de cuatro meses, la viabilidad de los huevos disminuyó, recuperando solo cinco cisticercos, en este caso se contó el número de huevos administrados (48,750) de los cuales se establecieron el 0.01%.

Gómez (2004) infectó dos grupos de cerdos (3 europeos y 2 vietnamitas) con 50,000 huevos cada uno; extraídos de proglótidos grávidos de *T. solium* recuperados de chinchillas. Por Western Blot tanto los cerdos europeos como los vietnamitas resultaron positivos y su diagnóstico se confirmó por tomografía computarizada. Tras la necropsia de los animales (17-27 SPI), los porcentajes de establecimiento con respecto a los cisticercos recuperados en cada uno de los cerdos europeos fueron de 0, 0.32 y 0.39, mientras que para los cerdos vietnamitas fueron de 0 y 0.09.

b. *Taenia crassiceps* y *Echinococcus* sp.

Sato y Kamiya (1989) infectaron con cisticercos de *Taenia crassiceps* a hámsteres y perros inmunodeprimidos con prednisolona, usaron dos grupos de hámsteres: el grupo I inmunodeprimido con 5 mg de prednisolona antes de la infección, el grupo II inmunodeprimido después de la infección, ambos los infectaron con 30 cisticercos. En el caso de los perros también se usaron dos grupos; el grupo I infectado con 50 cisticercos y el grupo II infectado con 300. En los hámsteres encontraron parásitos con proglótidos maduros a los 10 DPI, a los 22 DPI proglótidos con huevos inmaduros, a los 25 DPI las tenias presentaban huevos encapsulados y a los 35 DPI, tanto hámsteres como perros tuvieron parásitos grávidos. En cuanto a la cantidad de parásitos adultos recuperados fueron las siguientes: en los grupos I y II de hámsteres 16 y 34 tenias respectivamente; mientras que en los grupos I y II de perros se recuperaron 34 y 273 tenias respectivamente.

Kitaoka *et al*, (1990) reprodujeron el experimento anterior, pero sólo utilizaron un grupo de hámsteres inmunodeprimidos con cortisona y otro grupo no inmunodeprimido (grupo control) y observaron que la maduración de los proglótidos, ramificación del útero y presencia de ovarios apareció a los 15 DPI. En el día 21 había ocurrido la fertilización, debido a la presencia de esperma en el receptáculo seminal y a los 28 DPI los proglótidos recuperados en las heces mostraban huevos maduros. A pesar de que el índice de desarrollo de las tenias en los hámsteres tratados con cortisona fue similar al observado en los hámsteres no inmunodeprimidos, se recuperaron más tenias y tuvieron un mayor periodo de sobrevivencia en los hámsteres inmunodeprimidos.

Kamiya y Sato, (1990) infectaron con 20,000 protoescolices de *E. multilocularis* a hámsteres dorados machos inmunodeprimidos de 6 semanas de edad. A partir del día de

la infección (día 1) los hámsteres inmunodeprimidos desarrollan al parásito, a diferencia de los hámsteres no tratados con prednisolona que no desarrollan tenias. Asimismo obtuvieron una mejor recuperación de parásitos adultos grávidos y un periodo más largo de infección en hámsteres inmunodeprimidos, además, en los días 12 a 14, el desarrollo de la tenia, la formación de proglótidos, la maduración sexual y la formación de huevos fue comparable a la infección realizada en los perros, por lo que los investigadores concluyeron que el modelo *Echinococcus*/hámster es útil para desarrollar adultos grávidos de *E. multilocularis*.

En 1991 Kamiya *et al* desarrollaron modelos en roedores utilizándolos como hospederos definitivos alternativos para desarrollar *Taenia saginata*, *T. crassiceps*, *T. hydatigena*, *Echinococcus multilocularis* y *E. granulosus* inmunodeprimidos con prednisolona, obteniendo en gerbo mongol tenias inmaduras de *T. hydatigena* y *E. granulosus*, adultos maduros de *T. saginata* y *T. crassiceps* y grávidas en el caso de *E. multilocularis*, mientras que en el hámster dorado solo se recuperaron parásitos sexualmente maduros de *T. crassiceps*.

II. MÉTODOS DE VIABILIDAD CELULAR

Los métodos que se usan para medir la viabilidad *in vitro* de huevos de céstodos se basan en el conteo de oncosferas teñidas y no teñidas por algún colorante vital en un hemocitómetro, con estos se puede estimar el número total de larvas vivas y muertas que se encuentran en una suspensión dada (Dickson, 1970; Patterson, 1979). Otra forma para valorar la viabilidad de las oncosferas se basa en el movimiento de los embriones, que se pueden observar al microscopio una vez que las oncosferas han sido activadas (Dolan, 1965).

a. Eclosión de oncosferas

El término eclosión, definido por Smyth (1963), incluye la liberación del embrión hexacanto de la membrana oncosférica estimulando su activación. Brandt y Sewell (1981) mencionan que la eclosión de huevos de ténidos involucra la disgregación de los bloques embriofóricos, mientras que la activación es el escape de la oncosfera de su membrana, mediante movimientos de sus ganchos y la liberación de vesículas que contienen enzimas proteolíticas, que usualmente son visibles.

La eclosión, mediante el método enzimático, implica simular las condiciones gástricas del hospedero definitivo. Por lo tanto, es necesario mezclar ácido clorhídrico y pepsina a 37°C, solución denominada Fluido Gástrico Artificial (FGA) (Silverman, 1954; Brandt, 1981; Heath, 1982; Stevenson, 1983; Afedia y Ogunrinade, 1988; Molinari, 1993; Wang *et al*, 1997) o alternativamente, los huevos pueden tratarse con hipoclorito de sodio al 0.4%. Ambos métodos permiten disgregar los bloques embriofóricos (Heath, 1982; Stevenson, 1983; Osborn *et al*, 1982; Wang *et al*, 1997). El porcentaje informado para el método enzimático es del 80 al 86% y con el hipoclorito de sodio del 87 al 97% en huevos de *T. solium* (Wang *et al*, 1997). En huevos de *T. saginata* por el método enzimático es de 83% (Stevenson, 1983).

b. Activación de oncosferas

El término activar se refiere a la iniciación de una serie de movimientos de los ganchos lo cual le permite a la oncosfera escapar de la membrana oncosférica e introducirse en el epitelio del hospedero (Yoshino, 1993). Este método implica simular las condiciones en las que se encuentra el intestino delgado del hospedero definitivo, la incubación de oncosferas con bicarbonato de sodio, tripsina o pancreatina y bilis de conejo a 37°C conocido como Fluido Intestinal Artificial (FIA) en un lapso de 1-3 horas (Silverman, 1954; Brandt y Sewell, 1981; Heath, 1982; Stevenson, 1983; Afedia y Ogunrinade, 1988; Molinari, 1993; Wang *et al*, 1997). Se consideran viables y activadas a las oncosferas que presentan un movimiento explosivo de ganchos y liberan vesículas con enzimas.

El porcentaje de viabilidad publicado para esta técnica es del 58% con oncosferas de *T. taeniaeformis* y 73% en las de *T. saginata* (Brandt y Sewell, 1981). Coman y Rickard (1977) evaluaron la viabilidad *in vitro* e *in vivo* mediante la activación y tinción con azul tripano, así como la infección de conejos con huevos de *T. pisiformis* en distintos tiempos de almacenaje, con temperatura y humedad controladas. Para ello agregaron 100 mil huevos de *T. pisiformis* a cada uno de los 10 tubos empleados, posteriormente, al primer tubo le agregaron 8 ml de FGA a 37°C, después de uno y 60 min de incubación tomaron un ml de la suspensión de huevos y contabilizaron el número de huevos eclosionados en 0.05 ml de cada muestra (Cuadro 3).

Los 6 ml restantes de la suspensión de huevos fueron centrifugados y se eliminó el FGA, se adicionaron 6 ml de FIA a 37°C. Se tomó un ml de muestra manteniéndolo a 37°C. El porcentaje de oncosferas activadas se contabilizó a los 0, 30, 60, 90 y 120 min de incubación en 0.05 ml de cada muestra. Además, se tomó otra muestra de un ml a los 30 min de incubación con FIA para evaluar su viabilidad mediante su tinción con azul tripano, estos procesos se repitieron durante nueve días más, empleando un tubo por día (Cuadro 4).

Cuadro 3. Número de huevos de *T. pisiformis* eclosionados en fluido gástrico artificial (FGA), almacenados en periodos de 0 a 9 días y mantenidos de 36-38°C con 87-93% de humedad relativa. Cada cuadro corresponde a los datos de un tubo que contenía 100,000 huevos. (Tomado de Coman y Rickard, 1977).

FGA (min)	Días de almacenamiento									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	507	505	470	420	455	423	450	590	487	447
60	408	609	445	508	635	440	424	580	533	566

Cuadro 4. Porcentaje de activación de oncosferas de *T. pisiformis* a distintos tiempos de inmersión en Fluido Intestinal Artificial (FIA) almacenadas de 0 a 9 días y mantenidas a una temperatura de 36-38°C con 87-93% de humedad relativa. Cada cuadro corresponde a los datos de un tubo que contenía 100,000 huevos. (Tomado de Coman y Rickard, 1977).

FIA (min)	Días de almacenamiento									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	8	3	3	10	2.5	2	0.5	0	0	0
30	13	15	8	31	6.5	7	3	0.5	0	60*
60	0.5	2	0	3	1	0.5	0.5	0	0	0
90	0	0.5	0	6	0	0	0	0.5	0	0
120	0	0.5	0	5	0	0.5	0	0	0	0

* Se encontraron un total de 5 oncosferas.

Los resultados de la evaluación *in vitro* mostraron que durante todo el tiempo de almacenaje, los huevos siempre eclosionaron de manera constante y pocos huevos fueron destruidos por la pepsina y HCl (FGA) (Cuadro 3). Los efectos del almacenaje durante la activación con inmersión en FIA fueron decrecientes de manera pronunciada a partir de los 7 días, mostrando que la activación de las oncosferas es mínima, aún en el día 0, y el número de embriones vivos decrece cuando aumenta el número de días de

almacenamiento, pero no depende del tiempo de inmersión en el FIA. Además de que la proporción de oncosferas activadas es máxima a los 30 min de incubación y decrece sin considerar el tiempo almacenado.

En la discusión de este trabajo, Coman y Rickard (1977) señalaron que la comparación de los resultados obtenidos de los métodos *in vitro* e *in vivo* mostró que el proceso de activación como indicador de viabilidad en oncosferas es dudoso en el caso de *T. pisiformis* puesto que no correlacionaron con los porcentajes de infección experimental obtenidos en conejos, sugiriendo que se obtuvo una sobrestimación de huevos viables.

c. Tinción con azul tripano

El azul tripano (AT) es una molécula coloreada de alto peso molecular que es capaz de entrar en las células sin potencial de membrana (células muertas) por lo que al emplearlo en oncosferas, las que se tiñen en azul intenso no son viables, a diferencia de las oncosferas viables que mantienen su color original verde claro.

La viabilidad reportado para dicha técnica es de 87% en oncosferas de *T. solium* (Wang *et al*, 1997). Coman y Rickard (1977) evaluaron la viabilidad *in vitro* de los huevos de *T. pisiformis* con AT, para ello aproximadamente 500 oncosferas por tubo fueron eclosionadas y activadas mediante su inmersión en FIA durante 30 min, se suspendieron en 10 µl de una solución de AT al 1 % y se contabilizaron en una cámara para conteo celular y se determinó el número de oncosferas teñidas (muertas) y sin teñir (vivas). Paralelamente, a partir de una suspensión de huevos que se almacenó durante 9 días a temperatura y humedad controladas, se infectaron con 500 huevos a 3 conejos, al final de este experimento se habían infectado 30 conejos. Los animales se sacrificaron a los 10 y 35 DPI y se revisó microscópicamente el hígado y el peritoneo para la búsqueda de

cisticercos. En el cuadro 5 se resumen los hallazgos de infección y la viabilidad de las oncosferas de *T. pisiformis*.

Cuadro 5. Comparación de la estimación de la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de huevos de *T. pisiformis* a temperatura constante de 36-38°C con 87-93% de humedad relativa (Tomado de Coman y Rickard, 1977)

Tiempo de almacenaje (días)	Lesiones en el hígado de conejos autopsia a los 10 DPI	No. de cisticercos recuperados a los 35 DPI	No. de oncosferas teñidas con AT(vivas)
0	Muchas lesiones	290	505
1		137	661
2		129	499
3	Pocas lesiones	66	150
4		3	408
5		0	415
6	Solo lesiones microscópicas	0	150
7		0	193
8		0	1
9		0	5

Al comparar los porcentajes de viabilidad de oncosferas de *T. pisiformis* con azul tripano con el porcentaje de infección en conejos se observa que no hay una correlación entre ambos métodos, sin embargo, los investigadores concluyeron que los resultados del estudio *in vivo* sugerían que algunas oncosferas eclosionadas y activadas con el método enzimático no eran totalmente infectivas, y así se explicaría la discrepancia entre los resultados *in vitro* e *in vivo*.

d. Tinción con rojo neutro

El rojo neutro (RN) tiñe los lisosomas de células vivas pues son las que presentan un potencial de membrana y permiten su entrada. Además, se ha sugerido que en las oncosferas de céstodos el RN tiene una afinidad por las glándulas de penetración (Lethbridge y Gijsberg, 1974). Aunque, Heath y Smyth (1970) publicaron en su

metodología el uso de dicha técnica para la diferenciación de oncosferas activadas, no mencionan ningún porcentaje de viabilidad.

e. Reducción de MTT

El MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetil-tiazol-2 il)-2,5 difeniltetrazolio) es una sal que 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 solo las células metabólicamente activas se tiñen. Solo hay una publicación de MTT para huevos de ténidos con 92.5% de viabilidad en oncosferas de *T. solium* a las 12 h. de incubación a 37°C (Molinari *et al.* 1993)

f. Tinción con ioduro de propidio

El ioduro de propidio (IP) es un fluorocromo muy usado para determinar viabilidad en cultivos celulares, espermatozoides de mamíferos, ooquistes de *Cryptosporidium* y trofozoitos de *Giardia*, (Molina *et al.*, 1995; Satomi *et al.* 2001; Romero-Montoya *et al.*, 2002). Con oncosferas de *Taenia solium* el IP dio una viabilidad de 61% (Gómez, 2004), además de que la lectura de la viabilidad resultó muy fácil y rápida, pero con el inconveniente de requerir un microscopio con sistema de epifluorescencia.

III. HIPÓTESIS

En vista de que el hámster dorado ha sido empleado como modelo de teniosis experimental en distintas cestodiosis, al utilizar este modelo para *Taenia pisiformis* se pueden obtener parásitos grávidos.

IV. JUSTIFICACIÓN

Taenia pisiformis es un céstodo que se desarrolla en su estadio adulto en el intestino delgado de los cánidos y su estadio de metacéstodo en el peritoneo de los lagomorfos. Esta tenia ha sido ampliamente estudiada debido a la facilidad en la zootecnia de los animales que parasita y por la disponibilidad de reactivos comerciales que existen en el mercado para estudiar aspectos inmunológicos y moleculares que permiten entender la relación hospedero-parásito y los mecanismos que participan en la expulsión y permanencia en su hospedero intermediario natural. Así mismo, los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a otros ténidos y contribuir al conocimiento de su biología, control y erradicación de aquellos céstodos que son difíciles de estudiar *in vivo*, por la especificidad y daño que generan hacia sus hospederos (Craig y Zumbuehl, 1988; Coman y Rickard, 1977; Padgettka *et al*, 2005; Foronda *et al*, 2003)

El 26 de febrero del año 2002 se publicó en la Gaceta Oficial del Distrito Federal un decreto de ley de protección a los animales, en el que se cita en el capítulo VII, artículos 47 a 49 que: “Ningún particular puede vender, alquilar o donar animales para que se realicen experimentos en ellos”, por lo que el abastecimiento de perros para ser infectados con el estadio adulto de *T. pisiformis* se ha visto bloqueado.

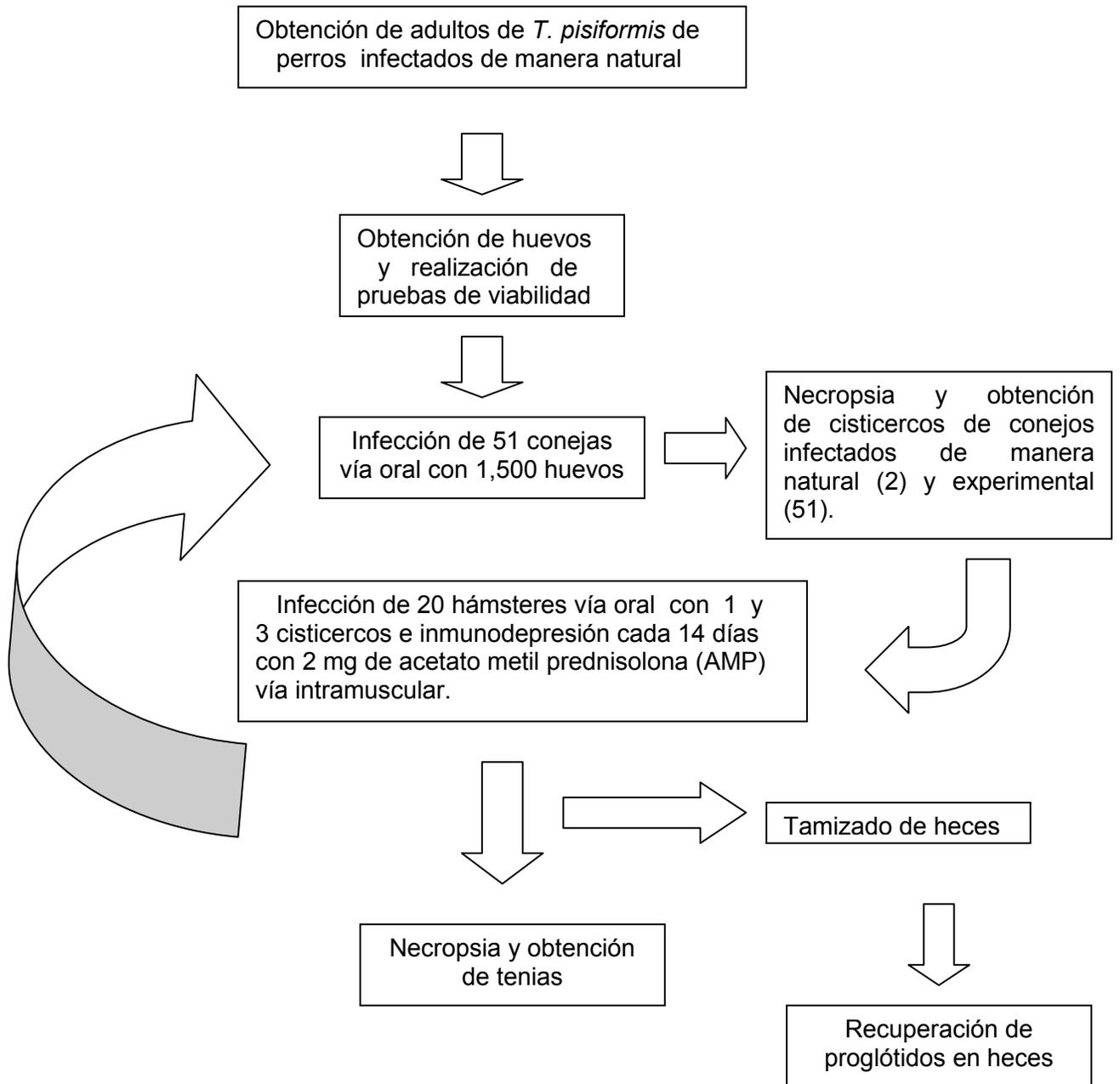
Debido a que diversos estudios sobre diagnóstico, vacunación y tratamiento en tenias de importancia en salud pública humana, como *Taenia solium*, requieren de un abastecimiento constante de huevos de este parásito, es necesario contar con un modelo de teniosis experimental alternativo que garantice un suministro frecuente de huevos de *Taenia* para que puedan ser empleados en dichos estudios.

V. OBJETIVO GENERAL

Reproducir el ciclo de vida de *Taenia pisiformis* en el laboratorio en el hámster dorado como hospedero definitivo experimental y el conejo como hospedero intermediario natural.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL



a. Recuperación de *Taenia pisiformis* de perros

El Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM donó, parásitos adultos de *Taenia pisiformis* que fueron recuperados a la necropsia o por tratamiento anti-cestocida con praziquantel con una dosis de 30 mg/kg de peso por vía oral, seguida de una purga salina que se administró 2 h después del tratamiento antiparasitario a perros infectados de manera natural, que llegaron a este Departamento durante el 2004. Las tenias se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos 0.01M pH 7.2 (PBS por sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*) y colocadas en una caja de Petri de vidrio de 15 cm de diámetro para medirlas y observarlas al microscopio. Posteriormente se colocaron en tubos de plástico de 50 ml con PBS adicionado con antibiótico y antimicótico (penicilina G 1000 UI y sulfato de estreptomicina 1000 µg/ml) y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso durante un lapso no mayor a 5 días.

b. Infección de conejos

Se adquirieron 51 conejos hembras Nueva Zelanda de 8 semanas de edad, los cuales se instalaron en jaulas de metal para conejos y se albergaron en el bioterio del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Su dieta consistió en comprimidos comerciales para conejo (conejina, Nutrimentos Purina) y agua *ad libitum*. Con los huevos recuperados de los proglótidos grávidos provenientes de las infecciones naturales y experimentales se infectaron por vía oral con 1500 huevos de *T. pisiformis* con ayuda de una sonda para alimento de neonatos, la cual se cubrió internamente con Sigmacote (Sigma), para evitar que en las paredes quedaran adheridos los huevos. El número de huevos inoculados se cuantificó en una cámara de Neubauer.

c. Necropsia y obtención de cisticercos

Los conejos fueron sacrificados entre las 7 y 10 semanas post-infección (SPI) con una sobredosis de pentobarbital vía intramuscular (90 a 210 mg/kg de peso NOM-062-ZOO-1999). La disección de los animales se realizó mediante la apertura longitudinal del abdomen, buscando cisticercos viables en el peritoneo; mientras que en el hígado se localizaron y cuantificaron los metacéstodos calcificados. Los cisticercos viables recuperados se lavaron y se colocaron en PBS con antibiótico a 4 °C para inocular a los hámsteres

d. Infección e inmunodepresión de hámsteres

Se utilizaron 20 hámsteres machos de 36 semanas de edad, que fueron instalados en cajas de polipropileno individuales con cama de viruta. Su dieta consistió en alimento comercial para roedores y *agua ad libitum*. Antes de la infección experimental los roedores se desparasitaron con dosis únicas de prazicuantel (30mg/kg de peso) y otra una semana después de albendazol (20 mg/kg de peso) por vía oral.

Los roedores se infectaron por vía oral con 1-3 cisticercos, de los que previamente se desecharon la vesícula. Se inmunodeprimieron con 2 mg de acetato de metil-prednisolona (Depo-Medrol, Upjohn) por vía intramuscular cada 14 días considerando al momento de la infección como día cero (0 DPI) de acuerdo a Maravilla *et al*, 1998.

e. Recuperación de proglótidis

A partir de la 3 SPI se depositó la materia fecal de los hámsteres cada 2 días. Las heces se colocaron en tubos de plástico de 50 ml con tapón de rosca, se dejaron hidratar con un volumen 1:2 con agua potable toda la noche en refrigeración a 4°C, después se disgregaron con un aplicador de madera para ser tamizadas con abundante agua, a través de un tamiz de acero con poros de 80 µm. Los proglótidis retenidos en el tamiz se

recuperaron con un pincel de pelo suave y se colocaron en una caja de Petri de vidrio de 15 cm de diámetro para observarlos al microscopio de disección y agruparlos de acuerdo a su grado de desarrollo (inmaduro, maduro o grávido). Posteriormente se colocaron en tubos de plástico de 15 ml con PBS con antibiótico y mantenido en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso.

f. Necropsia de hámsteres

Con el fin de reducir el sufrimiento de los roedores infectados se llevó a cabo el sacrificio de manera humanitaria de aquellos hámsteres que por efecto del glucocorticoide presentaron un deterioro físico marcado, el cual se basó en un registro semanal de evaluación del sufrimiento de hámsteres. La eutanasia se aplicó mediante la administración intraperitoneal de 120 mg/kg de peso de pentobarbital sódico (Inst Lab An Res, 1999). Posteriormente se abrió la cavidad abdominal para localizar el intestino grueso desde la ámpula rectal hasta la porción anterior, se separó el mesenterio hasta retirar a los intestinos completos. Se hizo un primer corte en el píloro y otro en la válvula ileocecal. Posteriormente se colocaron en una caja de Petri de vidrio de 15 cm de diámetro con PBS; se separaron el intestino grueso del delgado con ayuda de tijeras finas y pinzas de disección se abrió longitudinalmente para realizar la búsqueda de tenias. Cada tenia encontrada fue manipulada con un pincel de pelo suave, se lavó con PBS y se midió. Bajo el microscopio estereoscópico se revisó cada tenia, de las grávidas se separó la porción del estróbilo con proglótidos grávidos. Se colocaron los ejemplares en recipientes de plástico de 15 ml con tapa de rosca, conservándose de la misma manera que los proglótidos hasta la infección de los conejos.

g. Recuperación de huevos de *T. pisiformis*

Los proglótidos grávidos se obtuvieron del tamizado de las heces colectadas en diferentes DPI que se mantuvieron en refrigeración durante 3 a 5 días, y de las tenias obtenidas durante la necropsia de los animales. Los proglótidos se maceraron, primero con unas tijeras de punta fina y posteriormente con un pistilo de cerámica sobre un tamiz de acero con apertura de malla de 45µm, 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 3000 rpm durante 15 min, lentamente se decantó el sobrenadante a un recipiente con una solución de NaClO al 6% para inactivar cualquier huevo presente. El precipitado que contiene los huevos se resuspendió con 2 ml de PBS. El conteo de los huevos se realizó en una cámara de Neubauer en la cuadrícula de glóbulos blancos al microscopio con el objetivo 10x y tomando en cuenta solo los huevos morfológicamente maduros. El tubo con la suspensión de huevos se conservó en refrigeración a 4°C, para su uso inmediato en la infección de conejos, así como para realizar los ensayos de viabilidad *in vitro*:

h. Métodos de eclosión y activación

La eclosión se llevó a cabo con dos métodos; para cada uno se tomaron 5 ml de suspensión de huevos del mismo lote con los que se infectaron los distintos conejos. El primer método utilizado fue el descrito por Wang *et al* (1997), que consistió en colocar en 100 µl de la suspensión de huevos en un pozo de una placa de cultivo con 24 pozos de fondo plano (Falcon) la cual fue recubierta con Sigmacote (Sigma) para evitar la adherencia de huevos, posteriormente 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 levemente con una micropipeta, posteriormente se observó continuamente la disgregación de bloques embriofóricos de los huevos maduros

con el objetivo 10x del microscopio invertido (Nikon Diaphot-TMD), los cuales aparentan nubes negras sobre cada larva. Cuando la mayoría de los huevos había eclosionado (aproximadamente 5-8 min) se detuvo la reacción colocando el contenido del pozo en un tubo de plástico de 15 ml con 10 ml de PBS, se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante hasta dejar 1 ml en el que se resuspendieron las oncosferas.

En el segundo método se simularon las condiciones gástricas, por las cuales los huevos son eclosionados por las enzimas proteolíticas en los hospederos. El FGA que contiene 1% de HCl y 1% de pepsina se calentó a 37°C antes de usarse (Silverman, 1954; Brandt y Sewell,1981; Heath,1982; Stevenson,1983; Afedia y Ogunrinade,1988; Molinari,1993; Wang et al,1997). Se le adicionaron 2 ml del FGA previamente esterilizado con filtros de 0.45 y 0.8µm (Micropore) a una suspensión de huevos, se resuspendió suavemente con una pipeta Pasteur, y se incubó a 37°C en baño maría durante 60 min, en tanto que para la incubación se agitó en un vortex únicamente tocando el tubo al vortex en ocasiones repetidas durante 1 min cada 15 min. Se colocaron aproximadamente 100 µl de la suspensión en un pozo de la placa de poliestireno y se observó en el microscopio invertido hasta que la mayoría de los huevos hubieran eclosionado. Cabe destacar que siempre el pozo se revisó en su totalidad haciendo la búsqueda de las oncosferas siguiendo una "S" como se recomienda para la identificación de protozoarios y bacterias. Cuando la cantidad de oncosferas eclosionadas fue mayor al 80% se centrifugó a 1000g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en PBS, conservándose a 37°C hasta que se activaron. Para activar las oncosferas se les adicionó 2 ml de FIA compuesto por 1% de NaHCO₃, 1% de pancreatina y 5% de bilis de conejo precalentado a 37°C (Silverman,1954; Brandt y Sewell,1981; Heath,1982; Stevenson,1983; Afedia y Ogunrinade,1988; Molinari,1993; Wang et al,1997). Se incubó la solución en baño maría durante 30 min agitando lentamente 1 min cada 15 min. Posteriormente, se colocan aproximadamente 100 µl de la suspensión en un pozo de la

placa de poliestireno y se observó en el microscopio invertido contabilizando las oncosferas que se movían.

Métodos de viabilidad:

i) Azul tripano

Se colocaron 100 µl de la suspensión de oncosferas recuperadas de la eclosión en un pozo central de la placa de poliestireno previamente recubierta con Sigmacote (Sigma) y se agregaron 50 µl de AT al 0.4%, se adicionó también agua destilada hasta tener 1 ml de solución; al cabo de 1 min se observó al microscopio invertido para llevar a cabo el conteo de oncosferas azules (muertas) y translucidas (vivas).

j. Reducción de MTT

Se colocaron 100 µl de una solución de oncosferas en un pozo con un ml de MTT al 0.025% en solución salina-glucosada al 0.1%, se incubó durante 12 horas en una estufa para cultivos celulares a 37°C. La cuantificación de oncosferas translucidas (muertas) y azules (vivas) se realizó en el microscopio invertido.

k. Rojo neutro

Se colocaron 100 µl de suspensión de oncosferas y 110 µl de RN al 0.3%, un minuto después se observaron al microscopio invertido, cuantificándose las oncosferas translucidas (muertas) y teñidas en rojo intenso (viables).

l. Ioduro de propidio

Se colocaron en un pozo de la placa de poliestireno 100 µl de la suspensión de oncosferas y se agregó 10 µl de IP a 1mg/ml en agua destilada, se hizo la lectura a los 5 min en el microscopio invertido, utilizando fluorescencia a una longitud de onda de 620nm, se cuantificó el número de oncosferas fluorescentes, empleando primero luz blanca para ubicarlas, las oncosferas muertas mostraban puntos rojos fluorescentes.

VII. RESULTADOS

a. Obtención de *Taenia pisiformis* en perros

Se recuperaron 14 tenias grávidas de 5 perros infectados de manera natural (Figura 4), los cuales albergaron de 1 a 7 gusanos cuya longitud solo pudo ser medida en los ejemplares completos obtenidos del perro No. 5 (cuadro 6).

Cuadro 6. Características morfológicas de adultos de *T. pisiformis* obtenidos a la desparasitación de perros.

NO. DE IDENTIFICACIÓN DEL PERRO	No. DE TENIAS RECUPERADAS	LONGITUD (cm)	ESTADO DE DESARROLLO
1	1	ND*	GRÁVIDA
2	1	ND	GRÁVIDA
3	ND	ND	GRAVIDA
4	1	ND	GRAVIDA
5	7	41,54,57,59,79‡	GRÁVIDA

*No determinado

‡Se encontraron 7 escólices, pero solo 5 tenias completas.

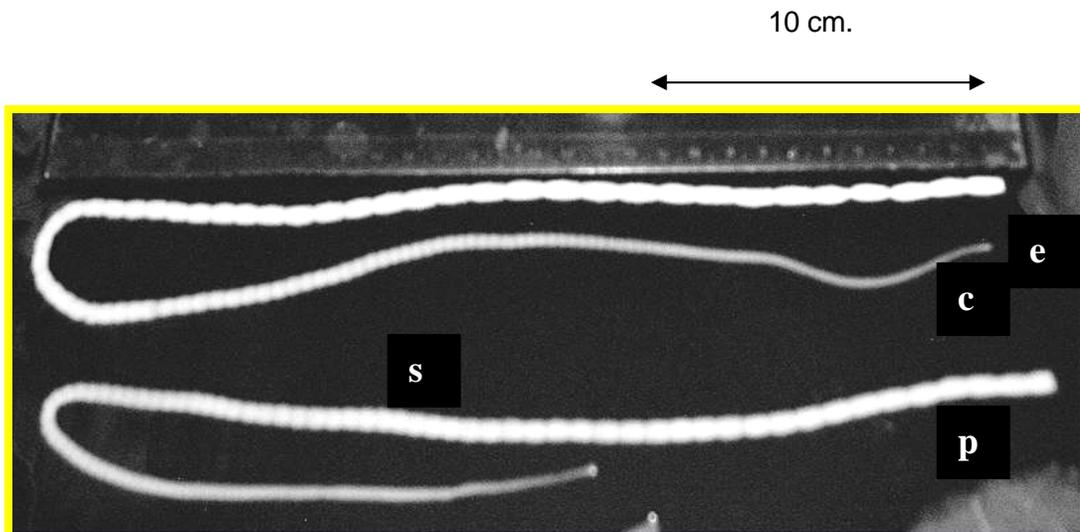


Figura 4. Dos tenias adultas de *Taenia pisiformis* recuperada de su hospedero definitivo natural, en estas se observan su escólex (**e**), cuello (**c**), el estróbilo (**s**) y proglótidos (**p**).

b. Recuperación de huevos, eclosión y viabilidad de oncosferas

De las fracciones grávidas de los estróbilos de las tenias recuperadas en las necropsias de los hámsteres y de los perros, así como de los proglótidos grávidos recuperados en el tamizado de heces que permanecieron en refrigeración a 4°C, se recuperaron huevos morfológicamente maduros. Una porción de estos huevos se destinó para infectar conejas con 1500 cada una, mientras que los restantes se dividieron en grupos iguales para cada método de viabilidad *in vitro*. En el cuadro 7 se muestran los datos comparativos de la viabilidad de oncosferas eclosionadas por los métodos enzimático y de hipoclorito de sodio. Cabe mencionar que durante la manipulación de los huevos para llevar a cabo ambas técnicas se observó una pérdida importante de oncosferas. A pesar de que el número de oncosferas recuperadas por la técnica enzimática fue menor que las obtenidas con el hipoclorito de sodio, morfológicamente presentaron estructuras íntegras, refringentes y translúcidas.

Cuadro 7. Comparación de la viabilidad de oncosferas eclosionadas de *Taenia pisiformis* por los métodos enzimático y por hipoclorito de sodio^a.

HIPOCLORITO DE SODIO				
No. de identificación (hospedero)	No. de huevos examinados	No. de huevos eclosionados	No. de oncosferas viables ^b	No. de oncosferas con movimiento ^c
Perro #1	286	138	42	95
Perro #2	300	178	132	0
Perro #4	310	230	87	0
Total	896	546	261	95
%	-	60	29	10

MÉTODO ENZIMÁTICO				
No. de identificación	No. de huevos examinados	No. de huevos eclosionados	No. de oncosferas viables ^b	No. de oncosferas con movimiento ^c
Perro #3	350	276	103	0
Perro #4	659	56	8	12
Perro #5	1700	795	665	7
Hámster #6	198	30	21	0
Total	2,907	1,157	797	19
%	--	40	27	0.6

^a Al aplicar una prueba de t-student con un criterio de $p < 0.05$, no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos de eclosión.

^b Determinación *in vitro* por tinción con Azul Tripano a las 24 hrs a 37°C.

^c Movimientos y cambios morfológicos observados en bilis de conejo a 37°C después de 60 min.

Aunque la literatura menciona que los resultados de las tinciones de AT y RN se observan a los pocos minutos, se decidió dejarlos 24 horas en la estufa para cultivos celulares a 37°C, siguiendo la recomendación de Gómez (2004) quien encontró que al realizar el conteo de oncosferas, éste era dudoso a las 6 primeras horas, mientras que a las 24 y 72 hrs. las mediciones eran inequívocas. Los resultados de los distintos métodos de viabilidad se resumen en el cuadro 8 y en la figura 5 se muestran ejemplos de las observaciones al microscopio. Solo el 50% de los ensayos mostraron oncosferas vivas, con la técnica de activación, por lo que éste método de viabilidad tuvo una gran desviación estándar (15.4) que contrasta con el promedio (7.8) de dicha técnica. El método de AT tuvo un promedio de 57.8 con una desviación estándar de 20.5, además de que se observó que presentó resultados reproducibles, ya que en las oncosferas de *T. pisiformis* recuperadas de hámsteres mostraron 70% de viabilidad, similar al porcentaje obtenido en oncosferas de tenias del hospedero natural (74 y 84%). En la prueba de viabilidad de RN se obtuvo un promedio de 46.6 y una desviación estándar de 14.5, destacando que el porcentaje mayor (68%) de oncosferas viables en dicho colorante perteneció a las tenias recuperadas en hámsteres, cabe mencionar que éste colorante a los pocos minutos de ser agregado a la solución de oncosferas se formaban cristales que se precipitaban en el fondo de la placa, a pesar de ser filtrado lo que dificultó las lecturas de viabilidad en algunas ocasiones. El método de MTT no fue útil ya que en los dos primeros ensayos en los que se aplicó nunca reveló la presencia de oncosferas vivas, por lo que se decidió no realizarlo en los ensayos posteriores. La técnica de viabilidad mediante la tinción con IP, fue la que dio los porcentajes mayores de viabilidad de oncosferas (90, 94, 98 y 100%), sin embargo en uno de los ensayos solo se obtuvo 15% de oncosferas viables, lo que redundó en una desviación estándar alta (36.2). Así mismo,

durante el segundo ensayo esta técnica no se realizó por dificultades técnicas, ya que no se contaba con la sal en ese momento en el laboratorio para preparar la tinción.

Cuadro 9. Estadística descriptiva de los diferentes métodos de viabilidad *in vitro* usados en oncosferas de *T. pisiformis*

MÉTODO	HOSPEDERO	ONCOSFERAS ANALIZADAS	ONCOFERAS VIABLES	VIABILIDAD (%)	PROMEDIO (DS*)
ACTIVACIÓN	Perro #1	486	190	39	7.8 (15.4)
	Perro #2	300	0	0	
	Perro #3	350	0	0	
	Perro #4	203	12	6	
	Perro #5	308	7	2	
	Hámster #6	198	0	0	
AZUL TRIPANO	Perro #1	304	136	45	57.8 (20.5)
	Perro #2	178	132	74	
	Perro #3	276	103	37	
	Perro #4	13	5	38	
	Perro #5	795	665	84	
	Hámster #6	30	21	70	
ROJO NEUTRO	Perro #1	134	67	50	46.6 (14.5)
	Perro #2	393	171	44	
	Perro #3	72	18	25	
	Perro #4	64	25	39	
	Perro #5	738	400	54	
	Hámster #6	70	48	68	
MTT	Perro #1	43	0	0	0 (0)
	Perro #2	6	0	0	
	Perro #3	ND	ND	ND	
	Perro #4	ND	ND	ND	
	Perro #5	ND	ND	ND	
	Hámster #6	ND	ND	ND	
YODURO DE PROPIDIO	Perro #1	18	18	100	79.4 (36.2)
	Perro #2	ND	ND	ND	
	Perro #3	80	72	90	
	Perro #4	57	9	15	
	Perro #5	314	297	94	
	Hámster #6	69	68	98	

*Desviación estándar

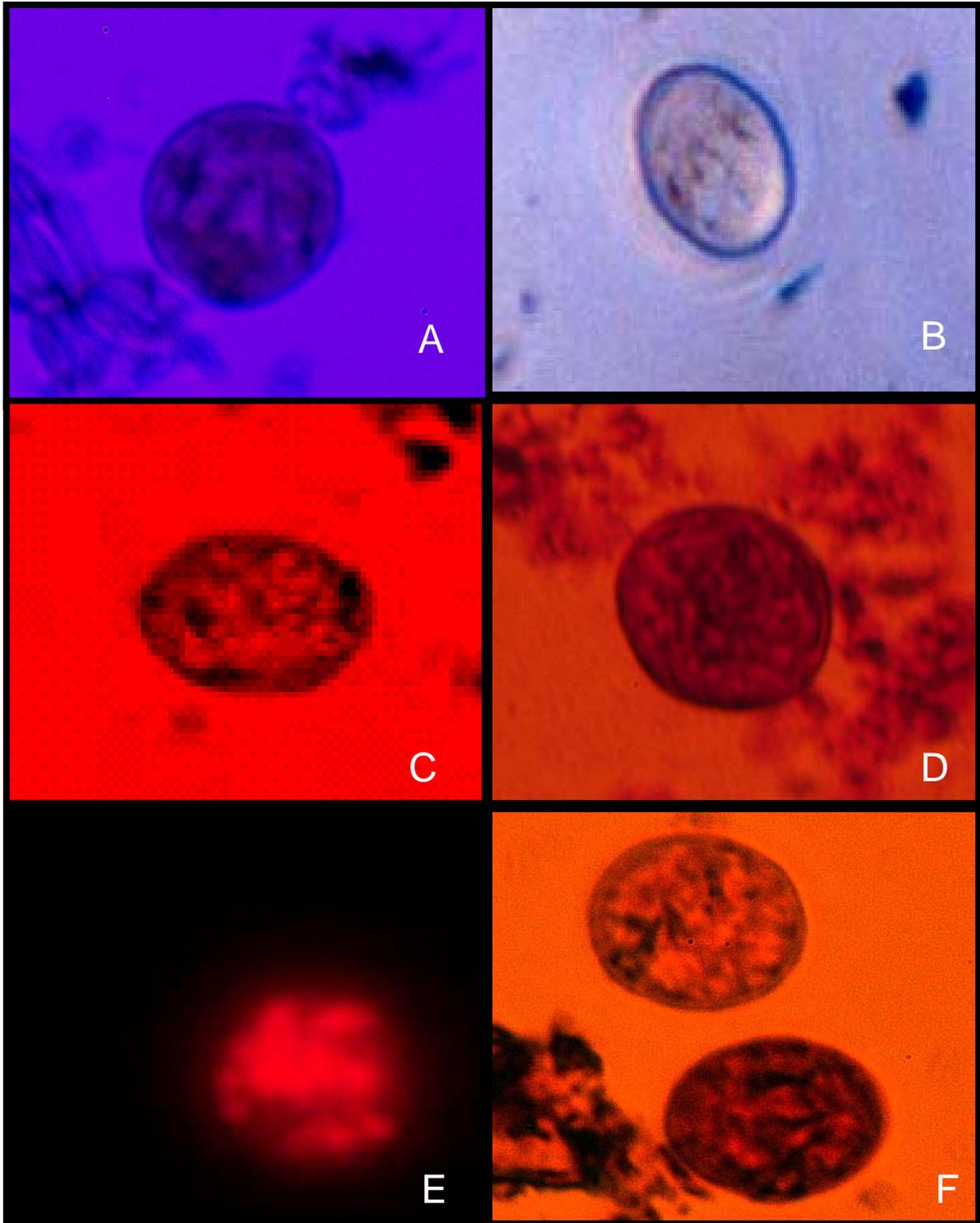


Figura 5. Micrografías de luz de los distintos métodos de viabilidad *in vitro* para oncosferas de *T. pisiformis*. Oncosfera muerta (A) y viva (B) teñidas con AT. Oncosfera muerta (C) y viva (D) teñida con RN. Oncosfera teñidas con IP, con luz UV (E), donde la oncosfera muerta fluoresce, no así cuando se visualizan con luz blanca (F).

En el cuadro 10 se muestra el cálculo del porcentaje de infección, considerando los valores de viabilidad de los diferentes métodos *in vitro*.

Cuadro 10. Comparación del porcentaje de establecimiento encontrado con los porcentajes teóricos de establecimiento de cisticercos según la viabilidad obtenida con los distintos colorantes

Identificación	<i>in vivo</i> ¹	AC ²	AT	RN	MTT	IP
1 perro	0.53	1.3 (39) ³	1.1 (45)	1.06 (50)	0	0.53 (100)
2 perro	2.1	0 (0)	2.8 (74)	4.8 (44)	0	ND
3 perro	1.4	0 (0)	3.7 (37)	5.6 (25)	ND	1.5 (90)
4 perro	1.4	23.3 (6)	3.6 (38)	5.4 (39)	ND	9.3 (15)
5 perro	0.46	23.3 (2)	0.55 (84)	0.86 (54)	ND	0.49 (94)
6 hámster	0.53	0 (0)	0.76 (70)	0.78 (68)	ND	0.54 (98)

¹ Valores de % de establecimiento tomados del cuadro 11.

³ Los % de viabilidad obtenidos con cada colorante del cuadro 9 se muestran entre paréntesis

² El porcentaje de infección para cada técnica se calculó integrando los resultados del cuadro 9 Y 11 de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Porcentaje de oncosferas viables (según cada técnica)} \times 1500 \text{ (total de oncosferas inoculadas)}}{100} = \text{No. de oncosferas viables inoculadas según la técnica}$$

$$\frac{\text{No. total de cisticercos recuperados } in vivo \times 100}{\text{No. de oncosferas viables inoculadas según la técnica}} = \text{Porcentaje de infección según la viabilidad de la técnica empleada.}$$

Ejemplo: porcentaje de infección según la viabilidad de AT en la primera infección

$$(45 \times 1500)/100 = 675 \text{ oncosferas viables}$$

$$(8 \times 100)/675 = 1.1\% \text{ de infección según AT}$$

De acuerdo con el cuadro 10, se observa una reproducibilidad en los resultados de las distintas infecciones, en las infecciones 3 y 4 provenientes de perros se obtuvo el mismo

porcentaje de infección (1.4%) mientras que en las infecciones 1, 5 y 6 fue alrededor de 0.5 %, siendo, en la última infección, en la que se emplearon huevos de tenias obtenidas de hámster. Respecto a los métodos de AT, RN e IP, se observó que cuando se presentó un menor porcentaje de infección de acuerdo a su viabilidad, también se manifestó un menor porcentaje de infección *in vivo*, sugiriendo una correlación para cada técnica, como se muestra en la figura 6. En la figura 6A no existe correlación entre el porcentaje de infección según la técnica de activación y de infección en los conejos. Caso contrario ocurre con AT, RN e IP donde las R^2 , que representan el porcentaje de todos los puntos en función a la línea de tendencia, fueron: 0.65, 0.79 y 0.40 respectivamente; mientras que las R, que representan el índice de correlación entre ambas variables, fueron: 0.80, 0.89 y 0.63 correspondientemente.

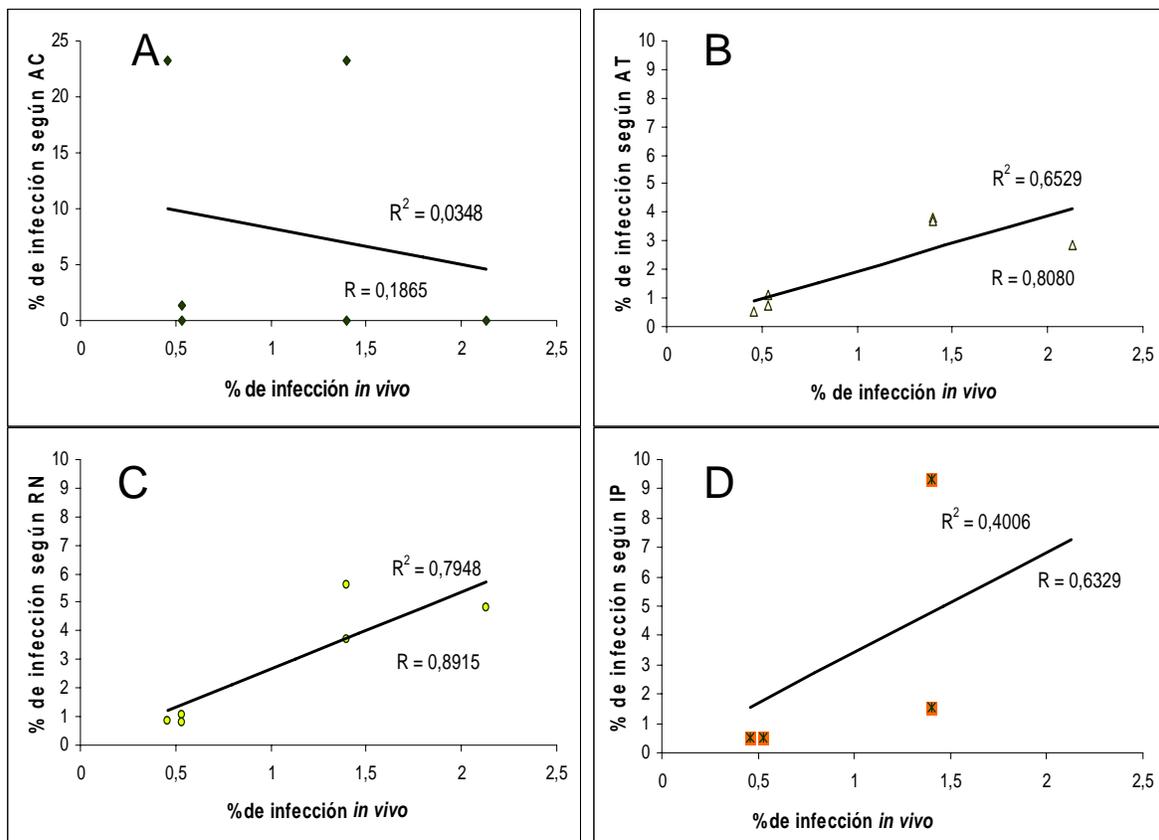


Figura 6. Correlación entre los porcentajes de infección según cada uno de los métodos de viabilidad *in vitro* empleados y el de infección *in vivo*.

c. Infección de conejos y recuperación de cisticercos en el hospedero intermediario natural.

Las necropsias de los conejos se llevaron a cabo de la 7 a 10 SPI; el Cuadro 11 resume los resultados de cisticercos recuperados a la necropsia de todos los lagomorfos, infectados experimentalmente con huevos de *T. pisiformis* obtenidos de adultos extraídos de perros o hámsteres.

Cuadro 11. Cisticercos de *T. pisiformis* recuperados de infecciones experimentales en conejos.

No. de infección	No. de conejos ¹	Conejos infectados/total (%)	Cisticercos recuperados vivos/calcificados (%de cisticercos vivos)	% de infección <i>in vivo</i> ²	Necropsia (SPI)
1 perro	5	2/5(40)	6/2(75)	0.53	10
2 perro	7	6/7(85)	9/23(28)	2.1	8
3 perro	13	5/13(38)	6/15(26)	1.4	7
4 perro	13	8/13(61)	16/5(76)	1.4	8
5 perro	8	4/8(50)	4/3(57)	0.46	9
6 hámster	5	2/5(40)	6/2(75)	0.53	7

¹ Todos los conejos tenían 8 semanas de edad y fueron infectados con 1500 huevos por vía oral.

² El porcentaje de infección se calculó de la siguiente manera:
 (No. de cisticercos recuperados vivos y calcificados x 100) / 1500
 Ejemplo para la primera infección: (6+2 x 100)/1500 = 0.53

Como se muestra en el cuadro 11, el porcentaje de infección de los animales fue del 38 al 61% con excepción del grupo de conejos empleados en la infección No.2, en la cual el 85% de los animales se infectaron; sin embargo, fueron de los que menos cisticercos vivos se recuperaron (28%, es decir 9 cisticercos vivos/32 cisticercos recuperados). En general, los cisticercos vivos median aproximadamente 1 cm de diámetro y eran vesiculares, en los que se identificaba una protuberancia blanca correspondiente al escólex invaginado (figura 7).

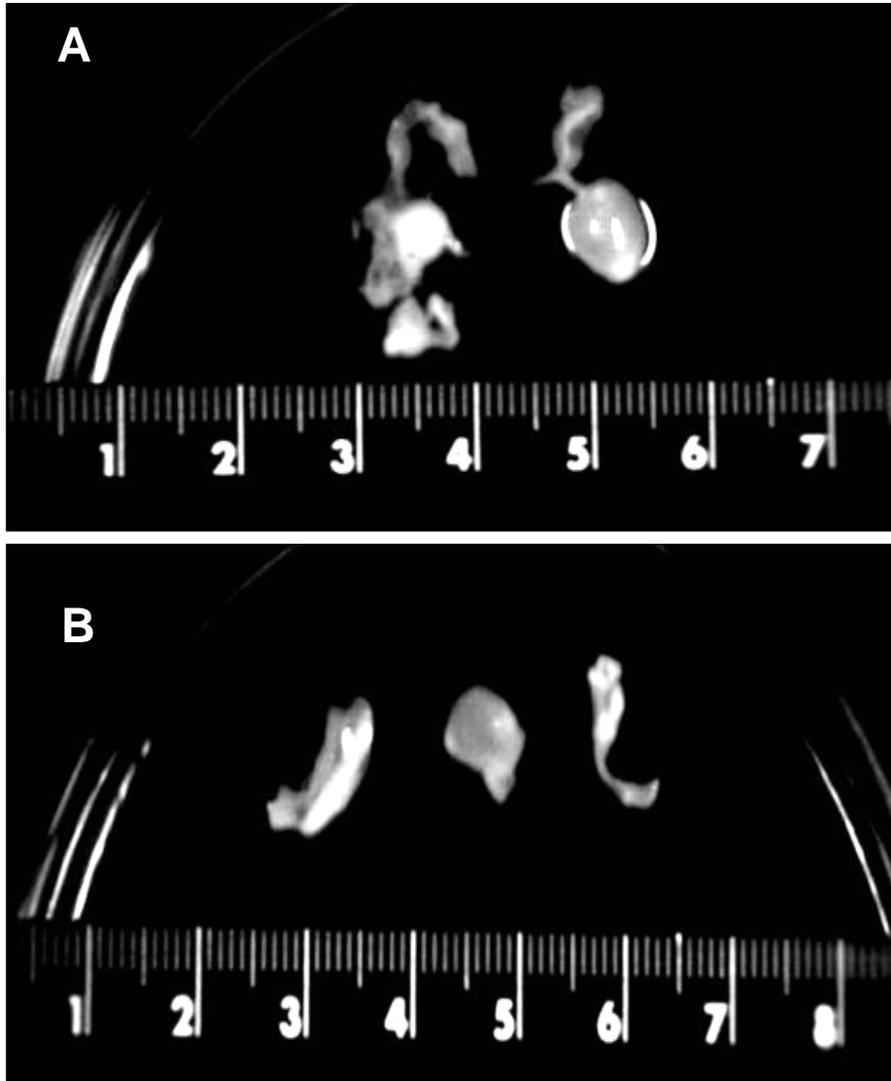


Figura 7. Cisticercos recuperados de la necropsia de conejos infectados con huevos de adultos de *T. pisiformis* obtenidos de perro **(A)** y de hámster **(B)**. La necropsia se realizó a las 9 y 7 SPI respectivamente.

d. Infección de hámsteres y recuperación de *Taenia pisiformis* a la necropsia.

Se realizó la necropsia de 20 hámsteres. El primer grupo integrado por 9 roedores, infectado por vía oral con 1 cisticerco provenientes de la infección No.2 (ver cuadro 11), y su necropsia se realizó entre las 13 y 22 SPI. No se recuperó ningún ejemplar adulto de *Taenia* y los tamizados realizados a partir de la tercera semana fueron negativos. Un segundo grupo de 5 hámsteres se infectaron con 3 cisticercos provenientes de la

infección No.4 (ver cuadro 11). La necropsia de estos animales se efectuó entre la 3ª a la 9ª SPI. En este último grupo tampoco se recuperaron tenias, así como proglótidos durante el tamizado. Un tercer grupo de 6 hámsteres, se infectaron con 3 cisticercos provenientes de 2 conejos parasitados en una granja de traspatio en Xochimilco, DF y que en cuya disección se obtuvieron 18 cisticercos viables. De este grupo se realizó la necropsia a uno de los animales (hámster #1) a las 4 SPI, recuperándose dos tenias (cuadro 12, fila 1-2). A las 10 SPI se realizó la necropsia del hámster #3, del cual no se recuperó ninguna tenia, y el resto de los animales se sacrificaron a la 16 SPI de donde se recuperó una tenia grávida del hámster # 6 (cuadro 12, fila 3). El análisis morfológico realizado a las tenias adultas teñidas mostró que correspondieran a la especie de *T. pisiformis* (Figura 8).

Cuadro 12. Tenias recuperadas a la necropsia de los 2 hámsteres que las desarrollaron

No. de identificación	SPI	No. de cisticercos	No. de tenias recuperadas	Longitud (cm)	Estado de desarrollo
H1	3	3	1	6	Inmadura
	4	3	1	10	Madura
H6	16	3	1	21	Grávida

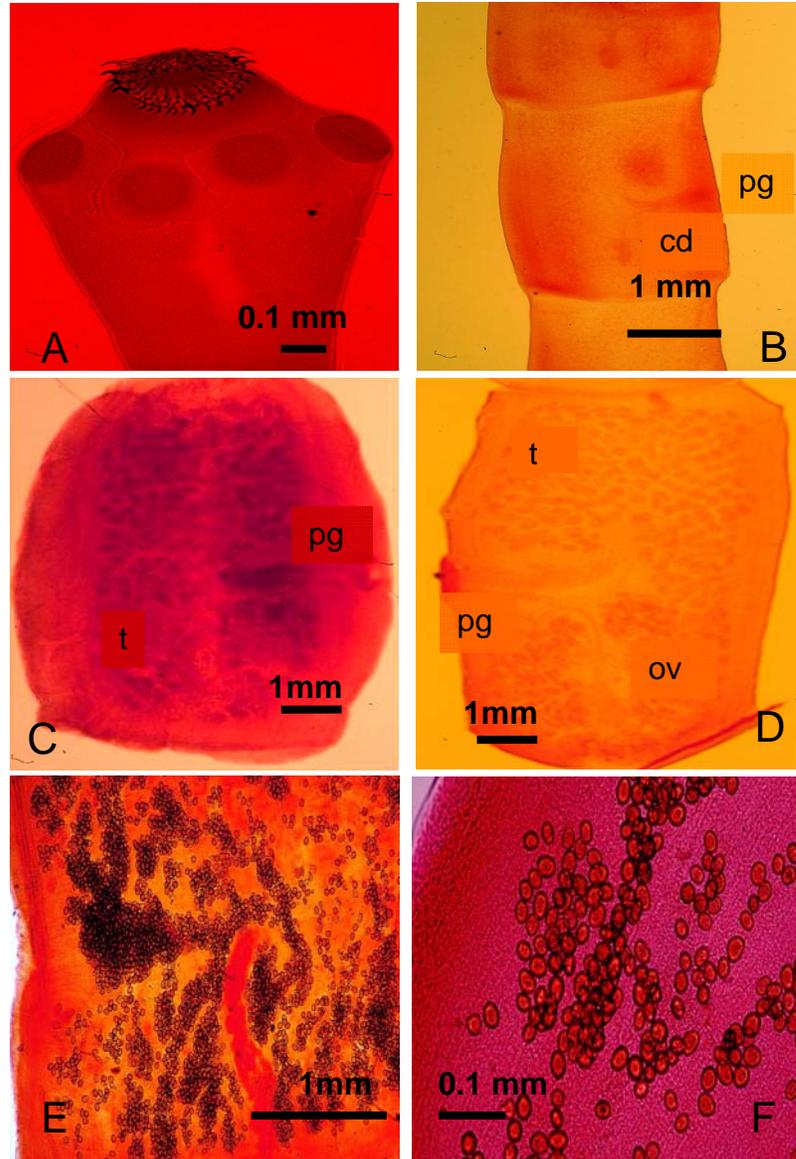


Figura 8. Proglótidos de *Taenia pisiformis* recuperados de heces de hámster: **A)** Escólex recuperado a las 3 SPI durante el tamizado (40x). **B)** proglótido inmaduro colectado a la 3 SPI en el que se observa el poro genital (pg) y conducto deferente (cd) (40x). **C)** Proglótido grávido recuperado a la 10 SPI (20x). **D).** Proglótido maduro colectado a la 4 SPI donde se observa el poro genital (pg), los testículos (t) y ovarios (ov). **E).** Proglótido grávido recuperado a 10 SPI (40x). **F)** Huevos morfológicamente maduros (40x).

Con respecto al tamizado de heces de los animales que se realizó desde la 3ª SPI se observó que todos los roedores se infectaron, ya que en todos los ejemplares liberaron proglótidos en heces con distinto grado de desarrollo (cuadro 13). El seguimiento de la infección por medio de los tamizados permitió conocer información biológica sobre el desarrollo y liberación de proglótidos en el modelo experimental. Algunas de las observaciones interesantes fueron:

- 1) No se recuperaron proglótidos en el tamizado de heces en las semanas 5 y 7, mientras que desde de la 8 SPI la liberación de los proglótidos se mantuvo constante.
- 2) La primera vez en que se llevó a cabo la liberación de proglótidos grávidos fue en las semanas 9 y 11 para los hámsteres H2 y H6, siendo los únicos roedores que albergaron tenias grávidas, sin embargo, el hámster H2, posteriormente liberó solo proglótidos maduros y perdió la infección a la semana 12.
- 3) En general, la liberación de los proglótidos fue periódica independientemente de su desarrollo, aunque en ninguno de los hámsteres infectados se encontraron más de 15 proglótidos en heces por semana, además los proglótidos estaban libres, nunca fueron porciones de estróbilo (Figura 9). Hubo hámsteres que jamás liberaron proglótidos grávidos, tal es el caso de H3, H4 y H5, destacando el caso de H3, en el que los proglótidos recuperados de heces siempre fueron maduros, hasta la semana 7 que perdió la infección y al momento de la necropsia en la semana 10 no se recuperó ningún ejemplar adulto.

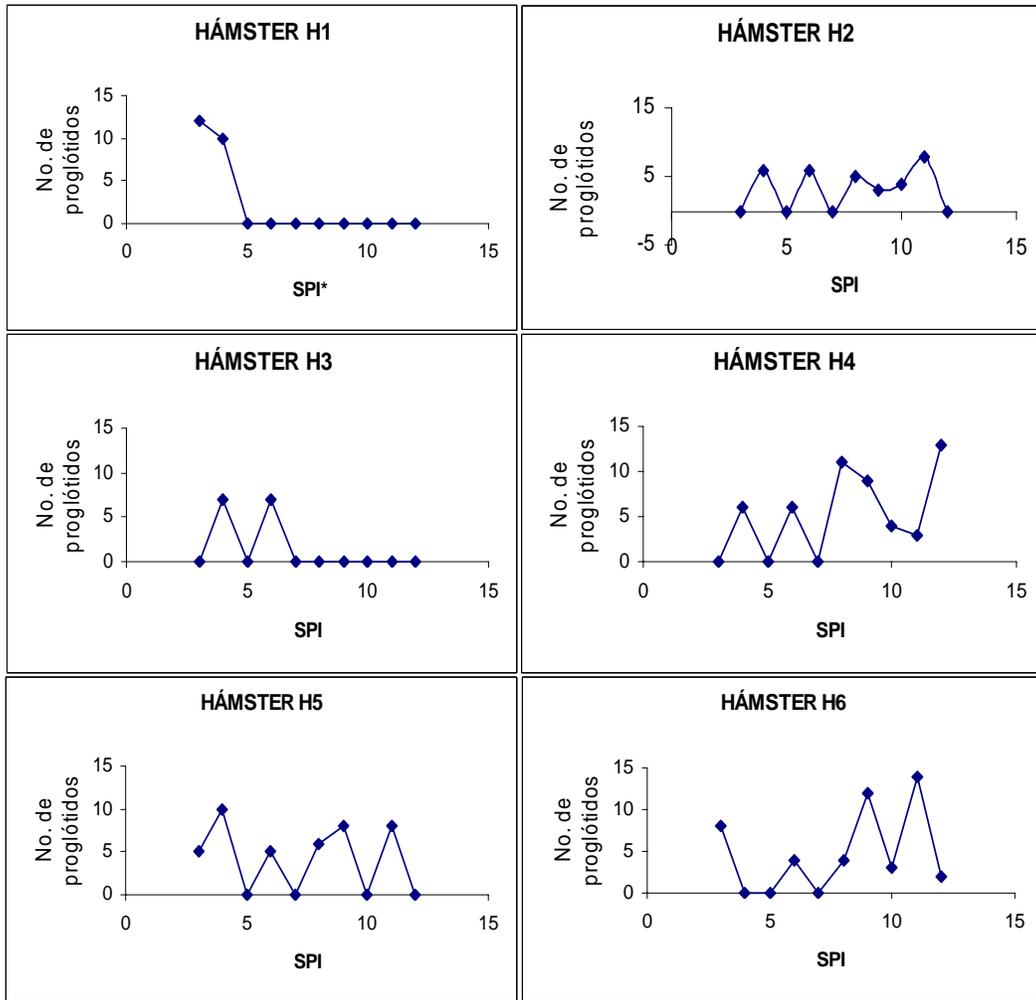


Figura 9. Cinética de liberación de proglótitos en heces de hámsteres infectados.

*semanas postinfección

Cuadro 13. Recuperación de proglótidos de *T. pisiformis* por tamizado de heces de hámsteres infectados

No. de hámster	SPI	No. de proglótidos recuperados*	Desarrollo de los proglótidos ¹
Semana 3			
H1	3	12*,1 taenia	inmaduros, maduros
H2	3	0	-
H3	3	0	-
H4	3	0	-
H5	3	5	maduros
H6	3	8	maduros
Semana 4			
H1	4	1 taenia [†]	maduros
H2	4	6	maduros
H3	4	7	inmaduros, maduros
H4	4	6	maduros
H5	4	10	maduros
H6	4	0	-
Semana 5			
H1	5	0	-
H2	5	0	-
H3	5	0	-
H4	5	0	-
H5	5	0	-
H6	5	0	-
Semana 6			
H1	6	0	-
H2	6	6	maduros
H3	6	7	maduros
H4	6	6	maduros
H5	6	5	maduros
H6	6	4	maduros
Semana 7			
H1	7	0	-
H2	7	0	-
H3	7	0	-
H4	7	0	-
H5	7	0	-
H6	7	0	-
Semana 8			
H1	8	0	-
H2	8	5	maduros
H3	8	0	-
H4	8	11	maduros
H5	8	6	maduros
H6	8	4	pre-grávidos
Semana 9			
H1	9	0	-

H2	9	3	grávidos
H3	9	0	-
H4	9	9	maduros
H5	9	8	maduros
H6	9	12	pre-grávidos
Semana 10			
H1	10	0	-
H2	10	4	grávidos
H3	10	0 [†]	-
H4	10	4	pre-grávidos
H5	10	0	-
H6	10	3	pre-grávidos
Semana 11			
H1	11	0	-
H2	11	8	maduros
H3	11	0	-
H4	11	3	maduros
H5	11	8	maduros
H6	11	14	Maduros y grávidos
Semana 12			
H1	12	0	-
H2	12	0	-
H3	12	0	-
H4	12	0	-
H5	12	0	-
H6	12	2	maduros

¹El desarrollo se evaluó al observar los proglótidos bajo el microscopio.

[†] Animales muertos antes de finalizar la infección.

Los datos del cuadro 13 muestran que el 100% de los hámsteres se infectó con *T. pisiformis*, ya que se encontraron proglótidos en heces o tenias a la necropsia. Sin embargo, solo 2 de 6 animales (33%) desarrollaron tenias grávidas. Además de que suponemos que en el caso del H6 coexistían más de dos tenias adultas debido a que en los tamizados recuperamos proglótidos maduros y grávidos, pero solo la tenia grávida fue recuperada en la necropsia, por lo que suponemos que la otra tenia se eliminó debido a la competencia intraespecífica.

VIII. DISCUSIÓN

El parasitismo lleva implícito el enfrentamiento entre 2 organismos de distintas especies, de estos 2 organismos hay uno, el parásito (que suele ser de menor tamaño), que generalmente depende del otro, el hospedero, como fuente de alimento. La relación parásito-hospedero es por lo tanto una asociación ecológica natural que conlleva a problemas de salud para el hospedero. Este hecho, en principio biológico, presenta una importancia especial cuando afecta al hombre y a los animales domésticos, debido a que los parásitos perjudican nuestra salud y nos ocasionan grandes pérdidas económicas. Las naciones industrializadas no han conseguido erradicar todos los parásitos, pero sí reducir enormemente su importancia. En cambio, los parásitos abundan en los países subdesarrollados. En estos países sólo han mejorado las condiciones socioeconómicas de vida de la población en aquellas áreas en las que la OMS y la FAO han intervenido directamente o en las que las naciones industrializadas se han encargado de reducir el número de parasitosis dentro del marco de la ayuda al desarrollo (Mehlorn y Piekarski, 1993).

Como una clase de gusanos planos, las tenias difieren notablemente de otros miembros del phylum. Estas carecen de todo vestigio de aparato digestivo y pudieron haber evolucionado de ancestros de vida libre alimentándose mediante distintos procesos de absorción como pinocitosis, transporte activo y difusión pasiva o facilitada (Smyth y Mcmanus, 1989). Sin excepción, estas tenias son parásitos que habitan en el intestino de hospederos vertebrados como parásitos adultos reproductores. Hay evidencia de que estos gusanos fueron parásitos antiguos de peces y que evolucionaron al mismo tiempo que los vertebrados, viviendo ahora en todos los grupos de vertebrados, quienes se han convertido en sus hospederos (Soulsby, 1987). Por otra parte, los huevos de *Taenia* representan el único estadio del ciclo de vida del parásito que se encuentra en el

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 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). En el presente trabajo se emplearon dos técnicas para separar los bloques embriofóricos, que constituyen al embrióforo, estructura principal que confiere resistencia al medio: hipoclorito de sodio al 0.5 % (Wang *et al*, 1997) y el método enzimático mediante fluido gástrico intestinal (FGI) (Silverman, 1954; Stevenson, 1983). Mediante estos métodos se logra la eclosión de la oncosfera. Nuestros resultados mostraron que 60% de los huevos tratados con hipoclorito de sodio eclosionaron, mientras que con las enzimas digestivas fue 40%, sin encontrarse ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos, debido a la gran varianza intrínseca entre los resultados de dichas técnicas. Vale la pena señalar que como el proceso de eclosión no ocurre de manera simultánea entre todas las oncosferas, con el hipoclorito de sodio aquellas que eclosionan inicialmente pueden dañarse por la acción astringente y reductora del hipoclorito. En cambio, el método enzimático simula las condiciones gástricas y se realiza bajo un seguimiento cuidadoso, con lo que el número de oncosferas que se dañan es probablemente menor y se reduce el error de considerar huevos que maduros que durante el proceso de eclosión se dañaran y resultarían inviables. En este trabajo se utilizó el método enzimático aun a pesar de que requiere de un mayor tiempo de experimentación, reactivos y una metodología más cuidadosa, por ejemplo, la agitación debe realizarse “suavemente” en un vórtex y la suspensión de oncosferas debe efectuarse a través del paso de la punta de una micropipeta “cuidadosamente” para evitar romper las oncosferas. Respecto a los métodos de viabilidad, la activación mostró una

gran dispersión entre los resultados, incluso hubo 3 lotes de oncosferas que no se activaron, por lo que su valor de desviación estándar fue mayor que el promedio de todos los ensayos por esta técnica. Asimismo, cuando se graficaron los porcentajes de infección por esta técnica versus el porcentaje de infección en conejos, mostró una baja correlación ($R=-0.1865$). La activación fue la primera en ser descrita para evaluar la viabilidad de oncosferas de ténidos (Silverman, 1954) y, al igual que la eclosión mediante FGA, requiere de un seguimiento cuidadoso. Durante la realización de esta técnica, se intentan simular las condiciones intestinales y de esta forma las oncosferas activadas se liberan de su membrana oncosferral a través del movimiento de sus ganchos y por la liberación de enzimas proteolíticas (Smyth y McManus, 1989). Recientemente se publicó un ensayo de destrucción de oncosferas de ténidos *in vitro* para evaluar la respuesta inmune frente al estadio larvario, en el que se emplearon oncosferas activadas de *T. pisiformis* bajo la misma metodología que la que se realizó en esta tesis y se observó que 100% de los huevos eclosionaron y 70% se activaron (Kyngdon *et al*, 2006). En la presente tesis, 40% de los huevos de *T. pisiformis* eclosionaron y de estos, 7.8% se activaron, estas diferencias se pueden explicar por: 1) Raza del hospedero definitivo: la obtención de tenias en trabajos publicados recientemente se realizaron en una sola raza, Beagle, y los perros fueron de la misma edad y sexo (Kyngdon *et al*, 2006), mientras que en el presente trabajo los parásitos adultos de *T. pisiformis* fueron recuperados de cánidos de distintas razas y edades. Estudios realizados en *Echinococcus* y *Taenia solium* muestran que estos factores del hospedero influyen en la carga parasitaria, desarrollo e infectividad. (Smyth y Mcmanus, 1989; Ávila, 2006; Aluja *et al*, 1998).

2) Droga desparasitante: El grupo de Australia recuperó las tenias adultas solamente con bromuro de arecolina: una dosis de 0.75mg/kg de peso por vía oral, mientras que en el presente trabajo 4 de los 5 cánidos fueron desparasitados con niclosamida (Vitaminthe, Virbac) a una dosis de 2 mg/kg de peso por vía oral y dos horas después se administró

una purga salina con sulfato de magnesio (Sal de Epsom). Knaus y Lange (1987) publicaron que la viabilidad de los huevos de *T. saginata* disminuyó de un 90-100% cuando los pacientes fueron tratados con niclosamida (Yomesan, Bayer).

3) Escasa virulencia de los huevos de *T. pisiformis* de México: en Australia por lo general se recuperan docenas de cisticercos en infecciones de conejos (Coman y Rickard, 1977) mientras que en los dos conejos mexicanos con infecciones naturales sólo se obtuvieron 18 cisticercos.

4) Origen de los huevos usados para la activación: El grupo de Kyngdon *et al*, (2006) usaron la técnica de activación para huevos obtenidos de tenias de perros con infecciones naturales, mientras que en este trabajo la misma técnica de activación se utilizó con huevos de tenias obtenidos de hospederos definitivos infectados con cisticercos obtenidos de conejos infectados de manera experimental.

El método de azul tripano resultó ser uno de los mejores marcadores de viabilidad, ya que la correlación con la infección *in vivo* fue satisfactoria ($R=0.80$), además su metodología es sencilla, de fácil interpretación y por lo que se recomienda su empleo para evaluaciones futuras sobre la viabilidad de oncosferas de ténidos. Con respecto al método de rojo neutro presentó la menor desviación estándar de las tinciones de viabilidad, además de que tuvo la mejor correlación al graficar el porcentaje de infección según esta técnica versus la infección *in vivo* (0.89); sin embargo, como se señaló en los resultados, esta metodología presenta complicaciones durante la lectura de sus resultados, puesto que se forman cristales que se precipitan a los pocos minutos, a pesar de filtrar el reactivo, lo que dificulta las lecturas de viabilidad. Además, una vez preparada la solución de trabajo, es también inestable ya que se forma un precipitado y se oxida fácilmente con el sol por lo que debe de conservarse a temperatura ambiente y en oscuridad, por ello no se recomienda su uso en ensayos futuros, no obstante que esta tinción es ampliamente utilizada en el cultivo de células (Pawlikowska *et al*, 2006). El método de MTT que evalúa

la actividad de la succinato reductasa mitocondrial, fue el menos eficiente, pues no se pudo medir la viabilidad de las oncosferas, por lo que se usó sólo en los dos primeros ensayos de viabilidad. La tinción con IP tuvo 98% de viabilidad, sin embargo, presentó una desviación estándar de 36 y una correlación entre el porcentaje de establecimiento vs porcentaje de infección *in vivo* de 0.63, aunque esto se debió exclusivamente al lote de huevos No. 4 con el que la viabilidad fue del 15% lo que generó el incremento en la desviación estándar de este método, así como un decremento en el índice de correlación. Por lo que recomendamos realizar evaluaciones futuras con IP para definir con seguridad si el método es confiable y útil o no lo es. Gómez (2004) empleó las mismas técnicas en huevos de *Taenia solium* obtenidos de modelo experimental de chinchilla y sugirió el empleo de AT e IP como técnicas útiles para evaluar la viabilidad de oncosferas de tenia. Asimismo, descartó el uso de activación y MTT ya que mostraron baja viabilidad y una elevada desviación estándar. En conclusión y de acuerdo con nuestros resultados sugerimos usar el método de AT como mejor técnica para evaluar la viabilidad en *T. pisiformis*.

Por otra parte, muchos de los céstodos muestran especificidad hacia sus hospederos, por lo que la susceptibilidad a infecciones con ténidos ha sido un tema de investigación científica desde hace algunos años, usando diversos modelos experimentales con la finalidad de lograr reproducir su ciclo de vida en el laboratorio y de esta manera obtener material biológico necesario para el desarrollo de investigaciones que permitan mejorar el diagnóstico de los padecimientos causados por estos céstodos (Allan *et al*, 1990). Asimismo, el uso de modelos experimentales ha permitido el estudio sobre el metabolismo y embriogénesis del parásito (Guaderrama-Díaz *et al*, 2005, Presas *et al*, 2005; Willms *et al*, 2005), su relación con el hospedero (Ávila *et al*, 2002; 2003) y efectos de fármacos anti-parasitarios (Johnson y Conder; 1996). Dichos estudios indican que sólo

los roedores de las familias *Cricetidae*, *Heteromyidae* y *Chinchillidae* son susceptibles a las infecciones del céstodo adulto (Gnezdilov,1957; Sato y Kamiya, 1990;Kitaoka *et al*,1990;Monroy-Ostria, *et al*,1993;Maravilla *et al*.1998; Garza, 2001).

Para asegurar el establecimiento y desarrollo de los adultos de *Taenia pisiformis* en el intestino de sus hospederos definitivos es importante considerar los parámetros ambientales locales que pueden estar relacionados con la fisiología de los céstodos, como es la morfología, dimensión de vellosidades intestinales, tensión de oxígeno, obtención de recursos alimenticios, etc. Como es sabido, los carbohidratos son constituyentes importantes en la dieta de los hospederos a los que son sensibles algunos céstodos, así como los lípidos y proteínas (Smyth y McManus, 1989). En general, las tenias adultas necesitan de carbohidratos para crecer y la tasa de reproducción y de crecimiento está en función de la cantidad de carbohidratos en las concentraciones dietarias, por ello la calidad de los carbohidratos en la dieta del hospedero es importante, puesto que el gusano es incapaz de hidrolizar oligosacáridos y solamente es capaz de metabolizar glucosa o galactosa. La cantidad de glucosa libre en el intestino delgado está en función de las tasas de ingestión, vaciamiento del estómago, hidrólisis de azúcares complejos y de absorción por la mucosa, por lo tanto se puede postular que la cantidad libre de glucosa disponible para el gusano es una limitante del crecimiento (Read,1928).

Puede sugerirse que la implantación y desarrollo del adulto de *T. pisiformis* en el hámster se favoreció debido a la dieta omnívora para roedores (Rodent Diet, Chow laboratory) ya que contiene un alto porcentaje de carbohidratos (46.5%), además de que dichas dietas están diseñadas con requerimientos nutricionales que se comparten en la dieta de los hospederos definitivos naturales (proteínas, minerales, vitaminas y lípidos). Asimismo, es probable que el establecimiento también se haya visto ayudado por algunas características anatómicas y fisiológicas del intestino delgado del hospedero experimental, ya que como lo señalan Smyth y McManus (1989), el tamaño de las vellosidades, ancho y

profundidad de las criptas, pH, pCO_2 , y temperatura (Figura 10) son cruciales para el desarrollo de los tenidos adultos; que junto con la morfología del escólex en algunas especies de ténidos marcan claramente la adaptación al intestino de su hospedero, por lo que juega un papel fundamental en la especificidad hacia este.

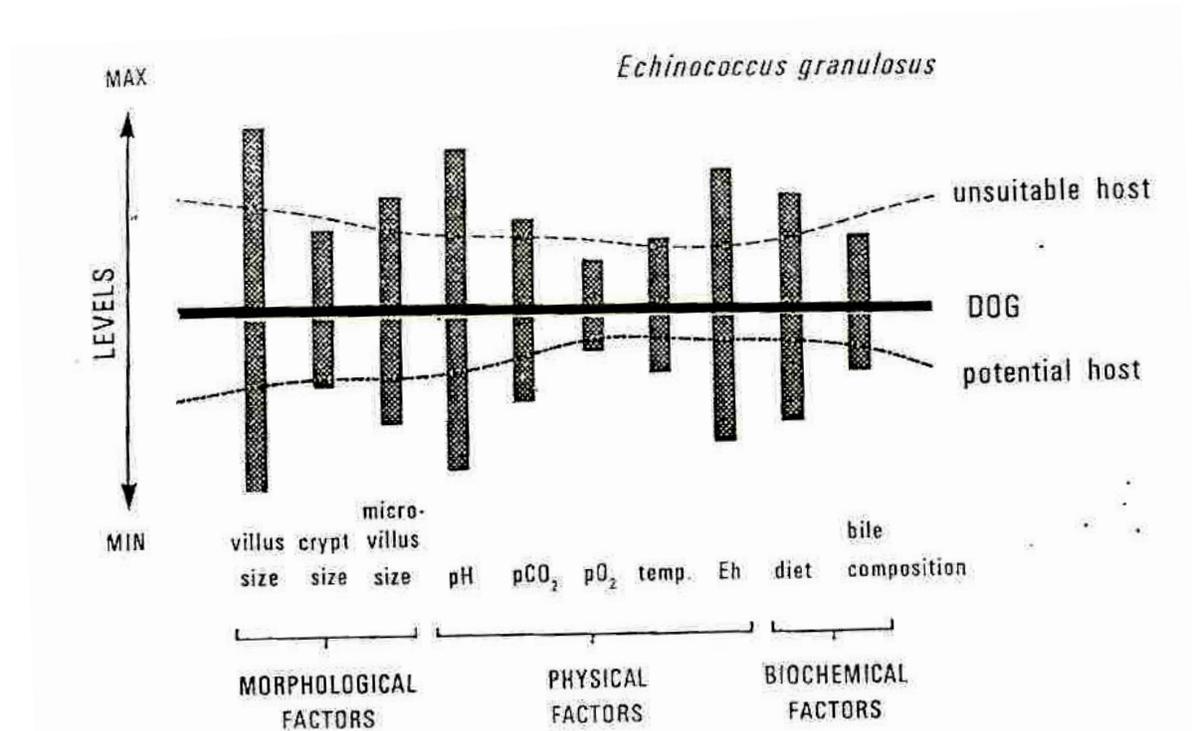


Figura 10 Representación esquemática sobre el impacto de algunos parámetros del ambiente intestinal que influyen en la determinación de la especificidad de un céstodo hacia su hospedero, ejemplificando el caso concreto de *Echinococcus granulosus*. (Tomada de Smyth y McManus, 1989)

Aunque muchos de los parámetros intestinales de los hospederos no han sido definidos con precisión, para que un parásito pueda desarrollarse en un hospedero experimental debe existir una plasticidad biológica mutua (Smyth, 1969). Al comparar algunos de los parámetros intestinales de los cánidos y los cricetos (Figura 11), observamos que el pH del yeyuno, la altura de las vellosidades y la temperatura son similares entre ambas especies, mientras que la profundidad de las criptas, la presión parcial de bióxido de carbono (pCO_2), el potencial de membrana (Eh) y longitud del intestino difieren entre si,

por lo que estas diferencias fueron apuntaladas por la plasticidad biológica de *T. pisiformis* para establecerse y crecer en el hámster dorado, tal como ha sido sugerido sobre el papel de la plasticidad biológica en *Schistosoma* (Davies y McKerrow, 2003) y para otros parásitos (Little *et al.*, 2006).

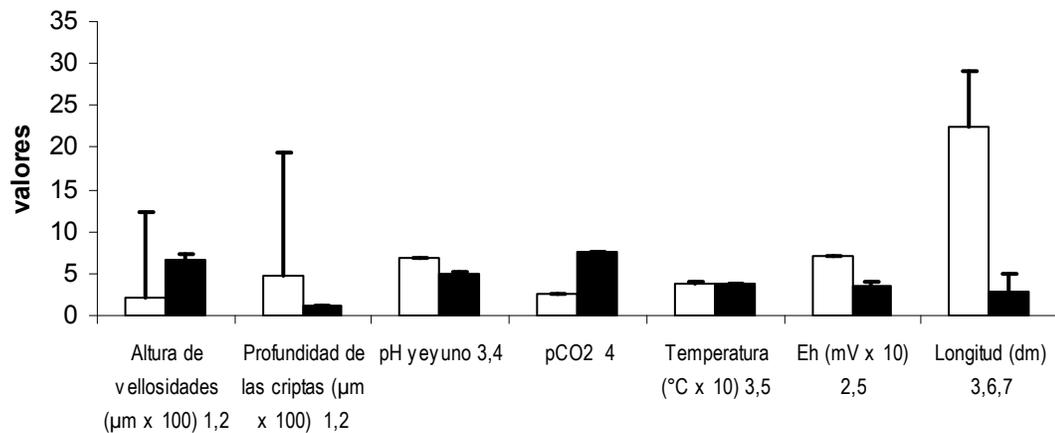


Figura 11. Parámetros fisiológicos del ambiente intestinal del perro (en blanco) y el hámster (en negro) que pueden tener un papel fundamental en el establecimiento de *T. pisiformis* (Tomado de Smyth y McManus, 1989¹; Field y Sibold 1999²; Rasmussen *et al*, 2002³; Garza *et al*, 2006⁴; Flynn *et al*, 1999⁵; Cremaschi *et al*, 1986⁶; Hart y Kidder, 1978⁷)

Existen varios temas para la discusión de los resultados obtenidos:

1) Dada la especificidad que presenta *T. pisiformis* para su hospedero definitivo natural que es el perro, es necesario que los hospederos experimentales estén bajo esquemas de inmunodepresión para favorecer la susceptibilidad a la infección, de los cuales se conoce su papel como facilitadores en el establecimiento de tenias en hospederos no naturales (Vester, 1971, 1974). En estudios anteriores se ha sugerido el empleo de AMP ya que permite obtener un mayor número de parásitos y más desarrollados, aunque el esteroide afecta la salud general del animal haciéndolos más susceptibles a infecciones secundarias (Pathak y Gaur, 1985; Aguilar, 1995; Maravilla, 1996). En el presente trabajo, 20 hámsteres fueron inmunodeprimidos con 2 mg de AMP, y el porcentaje de

recuperación de tenias adultas fue del 10%, lográndose mantener la teniosis hasta las 16 SPI y se recuperó una tenia grávida de 21 cm a la necropsia.

2) El 100% de los hámsteres infectados con 3 cisticercos recuperados de los conejos con infecciones naturales hayan desarrollado tenias adultas. Aunque todos los hámsteres se infectaron con cisticercos morfológicamente viables y con un desarrollo adecuado (Coman y Rickard, 1977; Kyngdon *et al.*, 2006), por el escaso número de cisticercos recuperados en las infecciones experimentales no se llevaron a cabo pruebas de evaginación *in vitro*, lo que hace probable suponer que a nivel microscópico o fisiológico los cisticercos empleados de las infecciones experimentales se encontraran dañados por el efecto de la respuesta inmunológica de los conejos de bioterio, por lo que no pudieron evaginar y anclarse en el intestino de los hámsteres. Recientemente se demostró que el porcentaje de evaginación en *Taenia solium* es fundamental para el establecimiento y desarrollo de tenias adultas en el modelo experimental del hámster dorado, ya que de las infecciones que se realizan con cisticercos morfológicamente viables pero con menos del 95% de evaginación se recuperan menos tenias adultas que las infecciones realizadas con cisticercos con más del 96% de evaginación (Ávila *et al*, 2006).

3) La capacidad de respuesta del sistema inmunitario en organismos parasitados esta relacionada con el estado nutricional del hospedero (Coop y Kyriazakis, 1999). En el caso de infecciones experimentales con *T. solium* en cerdos mantenidos en ambientes de bioterio, el porcentaje de infección es alrededor de 1% (Flisser y Lightowlers, 2001), mientras que a la necropsia de cerdos con infecciones naturales se encuentran cientos de cisticercos. En un estudio en el que se infectaron con huevos de *T. solium* a cerdos criollos de 2 meses de edad y a los que se les racionó la alimentación tratando de simular condiciones rurales de nutrición, se observó durante su necropsia realizada después de 3 meses, de 0.8 a 3.2% de establecimiento con una viabilidad del 0 al 100%, por lo que los

autores discuten que no solo la restricción en la alimentación es un factor único involucrado en la carga parasitaria (Huerta *et al*, 2000).

4) Durante el desarrollo del presente trabajo probablemente se eliminó toda presión de selección natural en vista de haber realizado una infección experimental, ya que por el hecho de inocular en el estomago de los conejos directamente un lote de huevos, todos compiten con las mismas probabilidades para desarrollarse en el siguiente estadio, esto elimina un tamiz de selección hacia aquellos más susceptibles a factores ambientales tales como la dispersión por aire o agua y desecación, por lo que los huevos que llegaron a establecerse a cisticercos en los conejos infectados experimentalmente, quizás no fueran los más aptos para continuar con el ciclo de vida, perdiéndose su capacidad infectiva, ya que se ha documentado que algunos parásitos disminuye su virulencia cuando se interrumpe su ciclo de vida natural al ser cultivados *in vitro* o ser inoculados en hospederos experimentales (Tsutsumi y Shibayama, 2006; Ford *et al.*, 2002).

5) Un fenómeno similar al desarrollo diferente de tenias provenientes de hospederos naturales o de infecciones experimentales, se presenta en *Taenia crassiceps*, en la que se ha informado sobre el envejecimiento de los cisticercos con el número de pases o generaciones a los nuevos hospederos (Balb/cAnN hembras) en lo que respecta a que tiende a disminuir el número de parásitos que se establecen en los hospederos intermediarios a un cierto tiempo (8-12 semanas) después de la infección. Los cisticercos envejecidos también disminuyen su convertibilidad en tenias en el hámster. Resalta que los cisticercos se rejuvenecen con un solo pase a su estado adulto al infectar el intestino de perros. Se comentó que ocurren trastornos diversos (masa corporal, longitud) en otras especies de parásitos también capacitados para reproducción asexual por varias generaciones, sin pasar por una fase de reproducción sexual. Sin embargo, la pérdida de infectividad que se observa en *T. crassiceps* parece única y de posible gran trascendencia para la biología del parásito y para la parasitología experimental comparada, aún dentro

de la misma especie y cepa. En cuanto al mecanismo del envejecimiento se especuló sobre los cambios hormonales en el hospedero durante la infección, la acumulación de varios errores genéticos y el apagamiento por desuso de la expresión de los genes necesarios para la reproducción (Séptima Mesa Redonda de CISTIMEX, 5 de Junio 2006, Modelos Experimentales de Teniasis Kaethe Willms (<http://cistimex.biomedicas.unam.mx>)). En síntesis, en cada ciclo de infección se recuperan menos parásitos grávidos con una tendencia a la no infección, lo que remarca la condición de adaptabilidad y no de adecuación del género *Taenia* en los hospederos experimentales

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Afedia S, Ogunrinade, A. 1988. A comparison of two proteolytic techniques for hatching *Hymenolepis diminuta* eggs. *Vet Parasitol* 27: 277-281.
- Aguilar L. 1995. Tesis de Licenciatura. Efecto de la carga parasitaria y la dosis del esteroide metal prednisolona en el desarrollo de *Taenia solium* en el modelo experimental de *Mesocricetus auratus*. Fac. de Ciencias, UNAM. México DF. 84p.
- Allan JC, Ávila G, García Noval J, Flisser A, Craig PS. 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* (3): 473-477.
- 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. 29-37p.
- Aluja A, Martínez M, Villalobos A. 1998. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. *Vet Parasitol* 76: 71-79.
- Ávila G, Aguilar L, Benítez S, Yopez-Mulia L, Lavenat I, Flisser A. 2002. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *Int J Parasitol* 9: 1301-1308.
- Ávila G, Benítez M, Aguilar-Vega L, Flisser A. 2003. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitol Res* 3: 284-289.
- Ávila G, Terán N, Aguilar L, Maravilla P, Mata P, Flisser A. 2006. Laboratory animal models for human *Taenia solium*. *Parasitol Inter* 55: 99-103.
- Barker IK. 1970. The penetration of oncospheres of *Taenia pisiformis* into the intestine of the rabbit. *Can J Zool* 48: 1329-1332.

- Boero JJ. 1976. Parasitosis animales. Edit. Universitaria de Buenos Aires. Argentina.
- Borchert A. 1981. Parasitología Veterinaria. Edit. Acribia España 180-185
- Brandt A, Sewell M. 1981. *In vitro* hatching and activation of *Taenia taeniaeformis* oncospheres. Vet Res Commun 5: 193-199.
- Brusca R, Brusca G. 1990. Invertebrates. Sunderland. EUA. 922 p.
- Bush A, Fernández J, Esch G, Seed J. 2001. Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Edit. Cambridge
- Coman B, Rickard M. 1977. A comparison of *in vitro* and *in vivo* estimates of the viability of *Taenia pisiformis* eggs aged under controlled conditions, and their ability to immunize against a challenge infection. Int J Parasitol 7: 15-20
- Coman B. 1975. The survival of *Taenia pisiformis* eggs under laboratory conditions and in the field environment. Australian Veterinary Journal 51: 560-565p.
- Coop RL, Kyriazakis I. 1999 .Nutrition parasite interaction. Vet Parasitol 84(3-4): 187-204.
- Craig P, Zumbuehl O. 1988. Immunization against experimental rabbit cysticercosis using liposome-associated antigen preparation. J Helmithol (1): 58-62.
- Cremaschi D, James P, Meyer G, Rossetti C, Smith M. 1986. Intracellular potassium as a possible inducer of amino acid transport across hamster jejunal enterocytes. J Physiol 375: 107-119.
- Cunningham J. 2003. Fisiología Veterinaria. Edit. Elsevier. México. 222-279.
- Davies SJ, Mckerrow JH. 2003. Developmental plasticity in schistosomes and other helminths. Int J Parasitol 33 (11): 1277-1284.
- Dickson J. 1970. The uptake of non-metabolizable amino acids as an index of cell viability *in vitro*. Exp Cell Res 61: 235-245.
- Dolan M. 1965. Viability assays a critique. Fed Amer Soc Exp Biol 15: 275-279.

- Fairweather I, Threagold L. 1981. *Hymenolepis nana*: the fine structure of the embryonic envelopes. Parasitology 82: 429-443.
- Field KJ, Sibold AL. 1999. The laboratory hamster and gerbil. Ed. M Suckow Boca Ratón. FL CRC Press.
- Flisser A, Correa D, Ávila G, Maravilla P. 2005. Chapter 1: Biology of *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiática*. WHO/FAO/OIE guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/ cysticercosis.
- Flisser A, Lightowers M. 2001. Vaccination against *Taenia solium* cisticercosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 353-356
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1997. Cisticercosis Humana. Manual Moderno. México D.F. 176p.
- Flisser A. 1994. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. Prog Clin Parasitol 4: 77-116.
- Flynn E, McManus C, Bradley K, Sang Don Koh, Hegarty T, Horowitz B, Sanders K. 1999. J Physiol 518: 247-256.
- Ford S, Chintala M, Bushek D. 2002. Comparison of *in vitro* cultured and wild type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. Dis aquat organ 51: 187-201.
- Foronda P, Del Castillo A, Abreu N, Figueruelo E, Pinero J, Casanova J. 2003. Parasitic helminths of the wild rabbits *Onycholagus cuniculus* in different bioclimatic zones in Tenerife, Canary Island. J helminthol (4): 305-309.
- Gaceta Oficial del Distrito Federal. 26 de Febrero de 2002.
- Garza A. 2001. Tesis de Licenciatura. Desarrollo de *Taenia solium* en el modelo experimental de (*Chinchilla laniger*) Fac. de Ciencias. México DF. 62p.

- Garza-Rodríguez A, Maravilla P, Mendlovic F, Mata-Miranda P, Robert L, Flisser A. 2006. Lack of postmortem digestion of tapeworms in golden hamsters experimentally infected with *Taenia solium*. *Vet Parasitol* Dec 19.
- Gnezdilov V. 1957. The golden hamster (*Mesocricetus auratus* Watherhouse) as potencial definitive host of tapeworm *Taenia solium*. *Zoologicheshi Zhurnal* 36: 1770-1773.
- Gómez B. 2004. Tesis de Licenciatura. Valoración de la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de huevos de *Taenia solium* obtenidos de *Chinchilla laniger*. Fac. de Ciencias. México DF 49p.
- Guaderrama-Díaz M, Solis C, Velasco-Loyden G, Laclette J, Mas-Oliva J. 2005. Control of scavenger receptor mediated endocytosis by novel ligands of different length. *Mol Cell Biochem* 271(1-2): 123-132.
- Hart JR, Kidder DE. 1978. The quantitative assessment of normal canine small intestinal mucosa. *Res Vet Sci* 25: 157-162.
- Hart JR, Kidder DE. 1978. The quantitative assessment of mucosa in canine small intestinal malabsortion. *Res Vet Sci* 25: 163-167.
- Heath DD, Smyth J. 1970. *In vitro* cultivation of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. serialis* from oncosphere to cystic larva. *Parasitology* 61: 329-343.
- Heath DD. 1971. The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *T. serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host. *Int J Parasitol* (1): 145-152.
- Heath DD. 1982. *In vitro* culture of cysticerci: an aid to investigations of morphological development and host-parasite relationships.

- Holcman B, Heath D, Shaw, R. 1994. Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestodo development of *Echinococcus granulosus*. Int J Parasitol (5): 623-635.
- Holmes J. 2002. Effects of concurrent infections on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Miniliformis dubis* (Acanthocephala) I. General effects and comparison with crowding 1961. J Parasitol Jun 88(3): 434-439.
- Huerta M, Sciutto E, García G, Villalobos N, Hernández M, Fragoso G, Díaz J, Díaz A, Ramírez R, Luna S, García J, Aguilar E, Espinoza S, Castilla G, Bobadilla J, Ávila R, Jose MV, Larralde C, de Aluja AS. 2000. Vaccination against *Taenia solium* cisticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age genetic background and antibody response. Vet Parasitol 90(3): 209-219.
- Ins Lab An Res: Commission on Life Sciences National Reserch Council of the Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, D.C.1999. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Traducción de la Academia Nacional de Medicina. México D.F.
- Jonson SS, Conder GA. 1996. Infectivity of *Hymenolepis diminuta* for the jird, *Meriones unguiculatus* and utility of this model for anthelmintic studies. J Parasitol 82(3): 492-495.
- Kamiya M, Sato H, Kitaoka M, Ishiwata K, Oku Y, Ito M, Gathura P. 1991. Laboratory rodent models for the taperworm stage of *Taenia saginata* and other related taeniid species. Southeast Asian J Trop Med Public Health Dec 22: 262-267.
- Kamiya M, Sato H. 1990. Complete life cycle of the canid tapeworm, *Echinococcus multilocularis*, in laboratory rodents. The FASEB Journal 4: 3334-3339.

- Kamiya M, Sato H. 1990. Survival, strobilation and sexual maturation of *Echinococcus multilocularis* in the small intestine of golden hamsters. *Parasitology* 100: 125-130.
- Kitaoka M, Oku Y, Okamoto M, Kamiya M. 1990. Development and sexual maturation of *Taenia crassiceps* (Cestoda) in the golden hamster. *J Parasitol* 76(3): 399-402.
- Knaus B, Lange U. 1987. The effect of anthelmintics on the viability of *Taenia saginata* oncospheres. *Angew Parasitol* 28(3): 133-136.
- Kyngdon C, Gauci C, Rolfe R, Velasquez J, Farfan M, Verastegui M, Gonzalez A, Garca H, Gilman R, Strugnell R, Lightowers M. 2006. *In vitro* oncosphere killing assays to determine immunity to the larvae of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *J parasitol* 92(2): 273-281.
- Lethbridge R, Gijssberg M. 1974. Penetration glands secretion by hexacanth of *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 68: 303-311.
- Little TJ, Watt K, Ebert D. 2006. Parasite-host specificity: experimental studies on the basis of parasite adaptation evolution. *Int J Org Evolution* (1): 31-38.
- Loos-Frank B. 2000. An up-date of Vester's (1969). Taxonomic revision of the genus *Taenia Linnaneus* (cestoda) in table format. *Syst Parasitol* 45: 155-183.
- Maravilla P, Ávila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. 1998. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol* 84(5): 882-886
- Maravilla P. 1996. Tesis de Licenciatura. Desarrollo de *Taenia solium* en diferentes modelos experimentales. Fac. de Química. UNAM. México DF. 81p.
- Mehlorn H, Piekarski G. 1993. *Parásitos del hombre y animales domésticos*. Edit. Acribia. España.

- Molina J, Castilla J, Gil T, Hortas M, Vergara F, Herruzo A. 1995. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Human Reprod* 10: 1280-1286.
- Molinari J, Tato P, Lara-Aguilera R, Clinton White A. 1993. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J Parasitol* 79(1): 124-127.
- Monroy-Ostria A, Monroy-Ostria J; Gómez J; Hernández M. 1993. Some studies on the experimental infection of golden hamster with *Taenia solium*. *Rev Lat Amer Microbiol* 35: 91-98.
- Morgan D. 1998. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol* 79: 179-183.
- 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. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Publicada el 6 de diciembre de 1999.
- Osborn P, Lawrence S, Heath D. 1982. The Chemical removal of embryophoric blocks from eggs of *Taenia ovis* and *Taenia Hydatigena* prior to *in vitro* cultivation. *J Parasitol* 68 (2): 339-341.
- Padgettka N, Munson L, Sacks B, Boyce W. 2005. Systematic of mesocestoides (Cestoda Mesocestoididae): evaluation of molecular and morphological variation among isolates. *J Parasitol* (6): 1435-1443.
- Pappas P, Durka G. 1991. Purification, quantification and mechanical hatching of eggs of the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Inter J Parasitol* 21(6): 727-729.
- Pathak K, Gaur S. 1985. Effect of immunosuppressants and antihistaminies on the development of *Taenia solium* in golden hamsters. *Indian J Vet Med* 5 (1): 10-12.

- Patterson M. 1979. Measurement of growth and viability of cell in culture. Meth Enzymol 58: 141-151.
- Pawlikowska P, Gajkowska B, Hocquette F, Orzechowki A. 2006. Not only insulin stimulates mitochondriogenesis in muscle cells but mitochondria are also essential for insulin mediated myogenesis. Cell Prolif April 39: 127-135.
- Presas AM, Robert L, Jiménez JA, Willms K. 2005. Apoptosis patterns in experimental *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* strobilae from golden hamsters. Parasitol Res 96(1): 1-5.
- Quiroz-Romero H. 1986. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Edit. Limusa. México. 305-342
- Rabiela M. Rivas A, Flisser A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. Parasitology Today. 5 (11): 357-359.
- Rajasekariah G, Rickard M. 1980. Density-gradient separation of *Taenia pisiformis* oncospheres. J Parasitol. 66(2): 355-356.
- Rasmussen H, Mirtaheri P, Dirven H, Johnsen H, Kvarstein G, Tonnesen TI, Midtvedt T. 2002. PCO₂ in the large intestine of mice, rats, guinea pigs and dogs and effects of the dietary substrate. J Appl Physiol 92: 219-224.
- Read C. 1928. Parasitismo Animal. Edit. Continental. México. 97-110.
- Rickard M. 1974. Hypothesis for the long term survival of *Taenia pisiformis* cysticerci in rabbits. Z. Parasitenk (44): 203-209.
- Romero-Montoya L, Cruz-Soto M, Argüello-García R, Ortega-Pierres M. 2002. Variabilidad y variación en la susceptibilidad de aislados y clonas de *Giardia duodenalis* expuestos *in vitro* A 5-nitromidazoles y bencimidazoles. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN. México D.F:

- Salazar P, De Haro I, Voge M. 1984. Hatching *in vitro* of oncospheres of *Taenia solium*. J Parasitol 70(1): 161-162.
- Sato H, Kamiya M. 1989. Viable egg production of *Taenia crassiceps* developed in the intestine of prednisolone- treated golden hamsters. Jpn J Parasitol 38(1): 46-53.
- Sato H, Kamiya H, Oku Y, Kamiya M. 1994. Infection course of the strobilar stage of *Taenia crassiceps* in the golden hamsters, with reference to host responses. Parasitol Res 80: 99-103.
- Satomi K, Jenkins M, Ghiorce W, Bowman D. 2001. Chemical and physical factors affecting the excitation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Parasitol 87: 5575-581.
- Schmidt G, Roberts L. 1984. Fundamentos de Parasitología. Edit. Continental. México. 626p.
- Shively M. 1993. Anatomía Veterinaria: básica, comparativa y clínica. Edit. Manual Moderno. México.
- Silverman P. 1954. Studies on the biology of some tapeworm of the genus *Taenia*. Vet Rec 7:356-366.
- Sisson G, Grossman J. 1983. Anatomía de los animales domésticos. Edit. Salvat editores. México. Tomo II.
- Smyth JD. 1963. The biology of cestode life cycles. Technical Communication number 34 of the commonwealth bureau of Helminthology. St. Albans, Herts England.
- Smyth JD. 1969. Parasites as biological models. Parasitology (1): 73-91.
- Smyth J, Mc Manus D. 1989. The physiology and biochemistry of cestodos. Cambridge University Press. Gran Bretaña.

- Soulsby E. 1987. Helminths, arthropods and protozoa of domestic animals. Edit. Interamericana. México.
- Stevenson P. 1983. Observations on the hatching and activation of fresh *Taenia saginata* eggs. Ann Trop Med Parasitol 77(1): 399-404.
- Storey G, Phillips R. 1985. The survival of parasite eggs throughout the soil profile. Parasitol 91: 585-590.
- Swiderski Z, Tkach V. 1997. Differentiation and ultrastructure of oncospherical and uterine envelopes in the nematotaeniid cestode, *Nematotaenia dispar* (Goeze, 1782). Int J Parasitol 27(9): 1065-1074.
- Tsutsumi V, Shibayama M. 2006. Experimental amebiasis a selected review of some *in vivo* models. Arch Med Res (2): 210-220.
- Vester, A. 1974. The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. Onderstepoort J Vet Res 41: 23-28p.
- Vester, A. 1971. Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. Onderstepoort J Vet Res 38(1): 63-64p.
- Wang IC, Ma YX, Kuo C, Fan C. 1997. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs. Int J Parasitol 22(11): 1311-1314.
- Willis J, Herbert I. 1984. Some factors affecting the eggs of *Taenia multiceps*: their transmission into pasture and their viability. Ann Trop Med Parasitol 78: 236-242.
- Willms K, Presas A, Jiménez JA, Landa A, Zurabian R, Ugarte M, Robert L. 2005. Taeniid Taperworm responses to *in vitro* glucosa. Parasitol Res 96: 296-301.

- Yoshino K. 1993. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*
Part III. On the development of *cystycercus cellulosae* within the definite
intermediate host. J Formos Med Ass 32: 166-169.