



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ**

ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE NEUROCISTICERCOSIS PORCINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

HUMBERTO CISNEROS MURILLO

TUTORES:

ALINE SCHUNEMANN DE ALUJA

FMVZ UNAM

JOSE RAMIREZ LEZAMA

FMVZ UNAM

AGNES ODILE FLEURY

IIB UNAM

MÉXICO, D.F. JULIO 2014



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.

DEDICATORIAS.

Dedico esta tesis con todo mi amor a mi madre: María Trinidad Murillo Vega, por su amor, comprensión y paciencia, por ser un ejemplo de lucha incansable para sus hijos.

A mis hermanos Martín, Elia, Javier, Carlos y María Eugenia por su cariño y apoyo incondicional durante el camino recorrido. Los amo.

Al amor de mi vida Elisa Guzmán Medina, por compartir los momentos más hermosos de mi vida, por estar a mi lado impulsándome y sacar lo mejor de mí. Gracias por llenar mi vida de colores. Te amo preciosa.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco infinitamente a Dios por llenar mi vida de bendiciones, por acompañarme a cada paso de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) le agradezco el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias.

Agradezco a mis tutores: Dra. Aline Schunemann de Aluja, Dra. Agnes Fleury y Dr. José Ramírez Lezama por la confianza que depositaron en mí para realizar este importante trabajo y por compartir sus invaluable conocimientos.

Agradezco al departamento de Pequeñas Especies, en especial al Dr. Ciriaco Tista Olmos por permitirnos el uso de las instalaciones de enseñanza quirúrgica para el desarrollo de las neurocirugías.

Agradezco a Maribel Nieto su invaluable ayuda en el procesamiento de las muestras para la realización del estudio histopatológico de esta investigación.

Al Neurocirujano Roberto Garcia-Navarrete le agradezco su apoyo en la realización de las neurocirugías y por compartir sus conocimientos.

Le agradezco a Leo Santacruz su apoyo en el manejo anestésico de los animales.

A las doctoras Gladis Fragoso y Nelly Villalobos les agradezco su apoyo durante el proceso de obtención, preparación de los parásitos y por compartir sus conocimientos y experiencia.

A Maricela Hernández por su colaboración en la preparación de las muestras y por compartir su experiencia en la realización de los ensayos de ELISA.

Al Dr. Santiago Aja Guardiola por su orientación en el manejo de los órganos del sistema nervioso central para su mejor procesamiento.

A los tesistas Humberto Iván Moreno Botello y Armando Trejo Torres por su colaboración en esta investigación.

Les agradezco a mis amigos Gilberto Morales Villafaña, Raúl Mendoza Moreno, Ismael Rivera, Francisco Yoshihein Loredo Flores por su ayuda en el manejo y cuidado de los animales durante las neurocirugías.

RESUMEN

La Teniasis-cisticercosis representa un problema de salud pública en México y en otros países en vías de desarrollo al provocar la enfermedad conocida como neurocisticercosis (NCC), causada por la implantación de metacestodos de *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC) del ser humano; lo que puede causar signos neurológicos y en ocasiones la muerte del individuo afectado. Este trabajo se centró en la estandarización de un modelo de NCC porcina por medio de la inoculación directa de oncosferas activadas de *Taenia solium* en el SNC. Se identificó a una persona portadora del parásito adulto y se le administraron 2g de niclosamida vía oral y una purga intestinal; se obtuvo la *Taenia* y se colocó en solución salina fisiológica con antibióticos a 4°C; Con base en su morfología se identificó como *Taenia solium*. Se obtuvieron los huevos de los proglótidos grávidos; Las oncosferas se activaron con el método de hipoclorito de sodio y el método enzimático y se inocularon en encéfalos de 12 cerdos de granja a través de craneotomías en la región frontoparietal. Se utilizaron dos dosis: 100 a 150 oncosferas y 1000 a 1500 oncosferas y dos vías de inoculación: subaracnoidea e intraventricular. Se observaron los cerdos durante un periodo máximo de 126 días y se realizó la eutanasia para extraer los encéfalos; se colocaron en formalina buferada al 10% por 7 días; posteriormente fueron lavados con agua corriente y se realizaron cortes transversales; se tomaron muestras para histopatología y se revisaron al microscopio. Tres cerdos presentaron el desarrollo de un metacestodo; de los cuales dos se inocularon por vía intraventricular con dosis alta y un cerdo se inoculó por vía subaracnoidea con dosis alta. En el presente estudio no se logró desarrollar el modelo de NCC porcina; sin embargo, se establecieron las bases para la estandarización de un modelo de NCC porcina en futuras investigaciones.

Palabras Clave:

Neurocisticercosis, *Taenia solium*, Modelo porcino, craneotomías, inoculación de oncosferas activadas,

ABSTRACT

Taeniasis-cysticercosis represents a public health problem in Mexico and other developing countries causing the disease known as neurocysticercosis (NCC), due to the implantation of *Taenia solium* metacestodes in the central nervous system (CNS) of human beings, which can provoke neurological signs and sometimes death of the affected individual. This work focused on the standardization of a model of swine NCC by direct inoculation of activated oncospheres of *Taenia solium* in the CNS. The person carrying the adult parasite was identified and 2g of niclosamide were administered orally followed by an intestinal purge. A taenia was obtained and placed in physiological saline with antibiotics at 4 ° C. based on its microscopic morphology it was identified as *Taenia solium*. Eggs were obtained from gravid proglottids and incubated at 37° C. The oncospheres were activated with sodium hypochlorite and an enzymatic method and inoculated into the brains of 12 farm pigs through craniotomies in the front parietal region. Two doses were used: 100 a150 oncospheres and 1000-1500 oncospheres and two routes of inoculation: subarachnoid and intraventricular. Pigs were observed for a maximum period of 126 days and were euthanized to remove the brains, which were placed in 10% buffered formalin for 7 days, then were washed with tap water and cross sectioned, samples were taken for histopathology and were observed in the microscope. Three pigs showed the development of a metacestodo each of which two were inoculated with the high dose by the intraventricular route and one with the high dose by the subarachnoid route. With the method used in this study, a model for swine NCC could not be developed, however, the bases for the standardization of a swine model for NCC was established for future research.

Key words:

Neurocysticercosis, *Taenia solium*, Swine model, Craneotomies, inoculation of activated oncospheres.

CONTENIDO	
INTRODUCCIÓN	1
La Neurocisticercosis en México	1
Clínica y patología de la neurocisticercosis	2
Problemática en el diagnóstico y tratamiento de la neurocisticercosis	3
Importancia del desarrollo de un modelo de neurocisticercosis porcina	5
HIPOTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
ALCANCE DE LA TESIS	9
MATERIAL Y METODOS	9
1. Obtención de la <i>Taenia solium</i>	9
2. Eclosión de las oncosferas (hatching)	10
3. Animales e instalaciones	11
4. Realización de las neurocirugías y obtención de muestras de LCR para la detección de anticuerpos contra <i>Taenia solium</i> y antígeno HP10 antes de la infección	12
5. Obtención de muestras de sangre para la detección de anticuerpos contra <i>Taenia solium</i> y antígeno HP10 en suero	17
6. Necropsias y obtención del SNC para la evaluación del desarrollo de metacestodos y extracción de LCR para la detección de anticuerpos contra <i>Taenia solium</i> y antígeno HP10	18
7. Detección de anticuerpos anti <i>Taenia solium</i> en el suero y LCR de los cerdos infectados, por medio de ELISA indirecto	19
8. Detección de antígeno HP10 en el suero y LCR de cerdos infectados por medio de ELISA directo	20
RESULTADOS	21
Cerdos inoculados por vía intraventricular (IV) a dosis baja (DB)	23
Cerdo 89	23
Cerdo 99	25
Cerdo 100	27

Cerdos inoculados por vía IV a dosis alta (DA).....	29
Cerdo 91.....	29
Cerdo 94.....	34
Cerdos inoculados por vía subaracnoidea (SA) a DB	38
Cerdo 92.....	38
Cerdo 97.....	40
Cerdos inoculados por vía SA a DA.....	42
Cerdo 90.....	42
Cerdo 93.....	44
Cerdo 95.....	49
Cerdo 96.....	51
Cerdo 98.....	53
Correlación de los resultados encontrados al estudio histopatológico con los resultados en los estudios inmunológicos de Ac´s anti-TS y de AgHP10.....	55
Discusión y conclusiones	58
REFERENCIAS	65

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Resultados del experimento	22
Cuadro 2. Cerdos con títulos positivos a Ac's anti-TS en suero.....	57
Cuadro 3. Cerdos con títulos positivos a AgHP10 en suero.....	57
Cuadro 4. Cerdos en los que se desarrolló un metacestodo de <i>Taenia solium</i>	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área quirúrgica después de realizada la asepsia previa a la cirugía en un cerdo.....	14
Figura 2. Colocación de la sonda endotraqueal en el cerdo anestesiado....	15
Figura 3. Incisión en la región fronto-parietal del cráneo de un cerdo.....	15
Figura 4. Realización de la craneotomía en el sitio de la incisión.....	16
Figura 5. Inoculación de las oncosferas por vía intraventricular, a través de una sonda de látex conectada directamente al ventrículo lateral.....	16
Figura 6. Sutura de piel, una vez terminada la cirugía para el afrontamiento de los tejidos.....	17
Figura 7. Anticuerpos (Ac's) anti <i>Taenia solium</i> (TS) y antígeno (Ag) HP10 en el suero del cerdo 89.....	24
Figura 8. Valores de Ac's anti -TS y Ag HP10 en el LCR del cerdo 89.....	25
Figura 9. Valores de Ac's anti TS y AgHP10 en el suero del cerdo 99.....	26
Figura 10. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10, en el LCR del cerdo 99.....	27
Figura 11. Valores de Ac's anti TS y Ag HP10 del cerdo 100.....	28
Figura 12. Valores de Ac's y Ag HP10 en las muestras de LCR del cerdo 100.....	29
Figura 13. Cavidad ocasionada por un metacestodo de <i>T. solium</i> en el encéfalo del cerdo 91.....	30
Figura 14. Estructura compatible con el escólex de un metacestodo de <i>T. solium</i> , localizado en el encéfalo del cerdo 91.....	30
Figura 15. Metacestodo en estado vesicular, localizado en el encéfalo del cerdo 91.....	31
Figura 16. Respuesta inflamatoria (RI) asociada a un metacestodo de <i>T. solium</i> a los 139 días postinfección vista al microscopio.....	32

Figura 17. Resultados de los títulos de Ac´s anti TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 91.....	33
Figura 18. Valores de Ac´s anti-TS y AgHP10 en las muestras de LCR del cerdo 91.....	34
Figura 19. Sitio donde se localizó el metacestodo de T. solium en el encéfalo del cerdo 94.....	35
Figura 20. Área donde se localizó el metacestodo, vista al microscopio.....	36
Figura 21. Respuesta inflamatoria asociada al metacestodo, vista al microscopio.....	36
Figura 22. Valores de Ac´s anti-TS y AgHP10 en muestras de suero del cerdo 94.....	37
Figura 23. Valores de Ac´s anti-TS y de AgHP10 en las muestras de LCR del cerdo 94.....	38
Figura 24. Valores de Ac´s anti-TS y AgHP10 en muestras de suero del cerdo 92.....	39
Figura 25. Valores de Ac´s anti-TS y AgHP10 en las muestras de LCR del cerdo 92.....	40
Figura 26. Valores de Ac´s anti-TS y AgHP10 en muestras de suero del cerdo 97.....	41
Figura 27. Los valores de Ac´s anti-TS y Ag HP10 en las muestras de LCR del cerdo 97.....	42
Figura 28. Títulos de Ac´s anti- TS y AgHP10 en las muestras de suero del cerdo 90.....	43
Figura 29. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 de las muestras de LCR del cerdo 90.....	44
Figura 30. Corte transversal del encéfalo del cerdo 93 a nivel del sitio de inoculación.....	45
Figura 31. Metacestodo en estado vesicular encontrado en el encéfalo del cerdo 93.....	46
Figura 32. Respuesta inflamatoria asociada al metacestodo de T. solium encontrado en el encéfalo del cerdo 93.....	47

Figura 33. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP1 de las muestras de suero del cerdo 93.....	48
Figura 34. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 en LCR del cerdo 93.....	48
Figura 35. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 95.....	50
Figura 36. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 de las muestras de LCR del cerdo 95.....	51
Figura 37. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 en las muestras de suero del cerdo 96.....	52
Figura 38. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 fueron negativos en las muestras de LCR del cerdo 96.....	53
Figura 39. Títulos de Ac´s anti-TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 98.....	54
Figura 40. Títulos de Ac´s y AgHP10 de las muestras de suero de LCR del cerdo 98.....	55

Introducción.

El binomio Teniasis-cisticercosis representa un problema de salud pública en México y en otros países de Latinoamérica, en África y Asia al provocar en los seres humanos la enfermedad conocida como neurocisticercosis (NCC). Estimaciones conservadoras calculan 50,000 muertes cada año en el mundo, debido a esta enfermedad. La NCC es causada por el alojamiento del metacestodo de *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC) del ser humano, lo que puede causar incapacidad física, signos neurológicos y en ocasiones la muerte del individuo afectado.^{1, 2, 3, 4, 5,}

El cerdo también se ve afectado, cuando el parásito se aloja en áreas específicas del SNC, ocasionándole Ataxia, paresia, flacidez de la lengua, mioclonos y convulsiones.⁶

La neurocisticercosis en México.

En México se realizaron dos estudios epidemiológicos en comunidades rurales de los estados de Morelos y Puebla, en los que se encontraron prevalencias de NCC en seres humanos de entre 9 y 9.5% utilizando como criterio diagnóstico los resultados de la tomografía computarizada.^{7, 8} Así mismo, estudios llevados a cabo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México, entre 1995 y 2001 mostraron que la NCC fue la novena causa de mortalidad hospitalaria y la quinta causa de morbilidad; mientras que un estudio reciente no mostró

diferencias en el ingreso de nuevos pacientes en esta misma institución entre el año 1994 y el año 2004.^{9,10,11, 12}

Clínica y Patología de la neurocisticercosis.

La NCC es una enfermedad que se caracteriza por la enorme variabilidad de sus manifestaciones clínicas y por su amplio espectro patológico; el cual, puede adoptar distintas formas según la localización, el número y el estado biológico del parásito, el grado y tipo de inflamación del tejido del huésped y las estructuras neurológicas afectadas. Últimamente se ha hecho énfasis en el papel de factores propios del hospedero en la modulación de estos parámetros. Se ha demostrado que el género y la edad influyen sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria desarrollada a raíz de la presencia del parásito. Así, el cuadro de encefalitis se ve preferentemente en los niños y en las mujeres jóvenes; mientras que las mujeres desarrollan una reacción inflamatoria más severa que los hombres; así mismo, La NCC afecta con mayor frecuencia a adultos jóvenes en edad productiva.^{5, 13}

Los pacientes con NCC se pueden dividir en 2 grandes grupos; el primer grupo esta constituido por pacientes con parásitos localizados a nivel del parénquima o de los surcos de la convexidad del encéfalo. Estos casos generalmente son los más “benignos” ya que responden al tratamiento específico con albendazol y praziquantel y en su mayoría tienen buen pronóstico debido a la involución mas rápida de los parásitos y por las características de la reacción inflamatoria que permanece localizada, aunado a esto, si el número de metacestodos es pequeño, estos pueden ser eliminados rápidamente con el tratamiento.

El segundo grupo esta conformado por los pacientes con parásitos localizados en el espacio subaracnoideo de la base o en los ventrículos. En estos casos, el cuadro neurológico incluye: cefaleas intensas, hipertensión intracraneana, afección de los nervios craneales o afección vascular. Además de la severidad clínica existen diferentes factores que contribuyen a la gravedad de estas formas, entre los que se pueden mencionar la frecuente necesidad de colocar una derivación ventrículo peritoneal de manera urgente para controlar la hipertensión intracraneana asociada al bloqueo del flujo del líquido cefalorraquídeo. Aunque esta colocación generalmente es imprescindible, se ha demostrado que representa un factor de mal pronóstico, debido al riesgo de infección que conlleva.

5, 14, 15

Problemática en el diagnóstico y tratamiento de la neurocisticercosis.

El diagnóstico de NCC es difícil, ya que las manifestaciones clínicas son inespecíficas, los hallazgos radiológicos no son patognomónicos; además de que las técnicas de Tomografía Computarizada y Resonancia Magnética en ocasiones no son suficientes para determinar con seguridad la persistencia o desaparición completa de los parásitos después del tratamiento y algunas pruebas serológicas tienen poca sensibilidad o especificidad;¹² asimismo, en los casos donde hay persistencia o se duda de la eliminación de los parásitos, se deben repetir los estudios, lo cual representa un costo muy elevado para el paciente como lo comprobó un estudio realizado en 2007 en Perú.¹⁶ Otro factor importante en la NCC, es la heterogeneidad en la eficiencia de los fármacos cestícidias, pues a pesar de administrar dosis más elevadas de fármacos (por ej. 30 mg. en lugar de

15 mg/Kg./día de albendazol), se requieren varios ciclos de medicamento para poder destruir a todos los parásitos y en algunas ocasiones esta aplicación repetitiva no da resultado. Además, la mayoría de estas formas se acompaña de una inflamación severa que puede ser el origen de serias complicaciones mecánicas y vasculares; por lo que frecuentemente es necesario administrar altas dosis de corticoesteroides por periodos prolongados con los riesgos y efectos colaterales que conlleva tal administración.^{17, 18} La gravedad asociada a la inflamación ha llevado a algunos especialistas a proponer la utilización de fármacos inmunosupresores potentes para tratar de resolver estas formas, como el metotrexato,¹⁹ que es utilizado principalmente como antineoplásico antimetabolito de la fase S y participa en la inhibición competitiva de la enzima ácido fólico reductasa, con lo cual bloquea la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato afectando la producción de purinas y pirimidinas. Las células de rápida proliferación como las neoplásicas, las células de la médula ósea, epitelio del conducto digestivo y células fetales son más sensibles a los efectos del fármaco. El metotrexato tiene capacidad inmunosupresora, posiblemente debido a sus efectos sobre la replicación de los linfocitos; sin embargo, su uso en la NCC es controversial por la cantidad de efectos secundarios que causa.^{19, 20}

Otra alternativa para el tratamiento de esta enfermedad podría ser la ivermectina. Los mecanismos de acción conocidos atribuidos a la ivermectina son: 1) Actúa como agonista de ácido γ -aminobutírico (GABA); 2) Estimula la liberación presináptica de GABA, y 3) Potencia la unión de GABA a su receptor. La ivermectina es un antiparasitario veterinario y humano de gran eficacia, seguro, el

cual se ha usado ampliamente desde hace más de 25 años a nivel mundial para tratar parasitosis de difícil control, como la filariasis, la oncocercosis, la estrogiloidiasis, entre otros; así como en ectoparásitos, como la pediculosis capitis y la miasis, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Un reciente artículo reporta eficacia de este fármaco en los sujetos no respondedores a los tratamientos cisticidas clásicos. Este fármaco es utilizado frecuentemente en el cerdo para tratar las nemátodos gastrointestinales y pulmonares, piojos y sarna.^{20, 21}

La problemática de la NCC muestra la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para destruir el parásito y para controlar la inflamación generada. Con el propósito de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y conocer la enfermedad se han realizado estudios de la respuesta inflamatoria asociada a la neurocisticercosis; se ha encontrado que la NCC severa se acompaña de un aumento de IL5, IL6 e IL10 en el líquido cefalorraquídeo (LCR).²² Las células que participan en la neuroinflamación asociadas a esta parasitosis también se han estudiado por inmunohistoquímica, lo que permitió mostrar que en los granulomas que se forman alrededor de los parásitos se encontraban células mononucleares, eosinófilos, así como linfocitos B. Este resultado concuerda con lo reportado previamente en porcino y ser humano.^{23, 24}

Importancia del desarrollo de un modelo de Neurocisticercosis porcina.

En la actualidad se desconocen muchos de los fenómenos que ocurren durante la infección y desarrollo de la neurocisticercosis; por lo que resulta de vital importancia dilucidar los procesos biológicos involucrados en la interacción

huésped- parásito, principalmente los que están relacionados con los mecanismos de respuesta inmunológica a nivel tisular, humoral y molecular; con la finalidad de encontrar alternativas que permitan obtener un diagnóstico certero y brindar un manejo terapéutico efectivo contra la enfermedad, enfocados a disminuir la prevalencia de la enfermedad y los daños provocados a la economía y salud de las personas afectadas por la neurocisticercosis.

En la Actualidad se utiliza como modelo experimental de cisticercosis la infección por vía oral con huevos o proglótidos que resulta en el establecimiento de quistes en todas las masas musculares, así como en el sistema nervioso central (SNC) del cerdo; pero esta estrategia es poco eficiente: un estudio mostró que solamente el 35.7% de los animales que habían ingerido 1,000 o más huevos desarrollaba NCC.²⁵ Un modelo de neurocisticercosis murina donde se utilizó al parásito *Mesocestoides corti* también se ha desarrollado y ha resultado de interés para ahondar en el conocimiento del fenómeno neuroinflamatorio en esta enfermedad; sin embargo, el uso de un parásito distinto presenta limitantes y la extrapolación de los resultados obtenidos a la infección por *Taenia solium* puede ser errónea;²⁶ otro grupo de investigación reporta el desarrollo de un modelo de NCC causado por el metacestodo de *Taenia solium* en ratones;²⁷ aunque no se ha confirmado la viabilidad de este modelo pues no ha sido utilizado en estudios posteriores.

El cerdo parece ser la especie mas adecuada para estandarizar un modelo experimental de NCC por ser el hospedero intermediario natural de la *Taenia solium*, y permitir el desarrollo de los metacestodos en el sistema nervioso central;

al mismo tiempo se considera que dicha infección puede provocar la manifestación de signos neurológicos en los animales;⁶ además, en la especie porcina se ha logrado desarrollar la cisticercosis muscular por medio de la inoculación de oncosferas activadas directamente en masas musculares.²⁸

El propósito de este estudio fue desarrollar un modelo de NCC porcina mediante la inoculación de oncosferas activadas directamente en el encéfalo de los animales; principalmente en el espacio subaracnoideo y en cavidades ventriculares por medio del abordaje quirúrgico a la cavidad craneana, sin tomar en cuenta la heterogeneidad asociada a los fenómenos de eclosión y distribución de las oncosferas a través del sistema circulatorio. Con el desarrollo de un modelo de NCC porcina se pretende evaluar diferentes esquemas con posible aplicación para el tratamiento de pacientes con neurocisticercosis, así como estudiar la enfermedad de manera controlada, principalmente en los aspectos neuroinflamatorios que resultan críticos para el desarrollo de la enfermedad.

Hipótesis.

La inoculación directa de oncosferas activadas de *Taenia solium* en el espacio subaracnoideo y en cavidades ventriculares del encéfalo de cerdos permitirá el desarrollo de los parásitos hasta la etapa de metacestodos.

Objetivo general.

Estandarizar un modelo de neurocisticercosis porcina a través de la inoculación directa de oncosferas activadas de *Taenia solium* en el sistema nervioso central.

Objetivos específicos

- Evaluar dos diferentes vías de inoculación de las oncosferas activadas de *Taenia solium*: una vía ventricular y una vía subaracnoidea.
- Evaluar dos diferentes dosis infectivas: una de 100 a 150 oncosferas y otra de 1000 a 1500 oncosferas.
- Evaluar la presencia de anticuerpos anti *Taenia solium* en el suero y LCR de los cerdos infectados por medio de la prueba de ELISA indirecta.
- Evaluar la presencia de Antígeno HP10 en suero y LCR de los cerdos por medio de ELISA directo.
- Correlacionar la presencia de anticuerpos anti *Taenia solium* y Antígeno HP10 con los resultados de la necropsia de los animales infectados en cuanto al número, estado y localización de los parásitos en el sistema nervioso central para determinar cual vía y dosis de infección es la más adecuada para el desarrollo del modelo de NCC.

Alcances de la tesis:

- Evaluar la factibilidad del desarrollo de un modelo de NCC porcina.
- Aumentar los conocimientos acerca de los componentes de la reacción inmunológica e inflamatoria a nivel local y sistémico asociados a la neurocisticercosis.

Material y Métodos.

1. Obtención de la *Taenia solium*.

La *Taenia solium* se obtuvo a través del interrogatorio y posterior análisis coproparasitológico realizado a personas que radican en comunidades rurales con alta prevalencia de cisticercosis porcina, en los estados de Guerrero y Morelos. A las personas identificadas como portadoras se les administró un tratamiento con niclosamida (Yomesan®, Bayer S.A.), a una dosis de 2 gramos vía oral, seguido por una purga intestinal 2 horas después; este tratamiento se administró bajo supervisión médica. Una vez obtenido el parásito, se realizó la identificación microscópica basada en las características morfológicas, principalmente en la existencia de un róstelo armado con una doble corona de ganchos en el escólex y en la presencia de 7 a 15 ramas laterales del útero, localizado en los proglótidos para diferenciar *Taenia solium* de *Taenia saginata*, la cual carece del róstelo y contiene de 12 a 30 ramas laterales en el útero;⁵ una vez hecha la identificación se trasladó al laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde se lavaron los proglótidos en tres ocasiones con solución

salina fisiológica (SSF) para eliminar los restos de materia fecal. Los proglótidos se conservaron en SSF y solución buffer de fosfatos (PBS) con antibióticos (penicilina-estreptomina) a 4° C. El parásito se mantuvo en refrigeración por 4 semanas, hasta su utilización.

2. Eclosión de las oncosferas (hatching).

La activación de las oncosferas se realizó por medio del procedimiento de “hatching” descrito por Wang et al, en 1997.²⁹ Se rompieron los proglótidos grávidos de la *Taenia solium* y se contaron 200,000 huevos con una cámara de Neubauer.³⁰ Los huevos fueron colocados en 3 ml de PBS con antibióticos (800,000 UI de penicilina), se agregaron 3ml de una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% en agua y se incubaron por un periodo máximo de 10 minutos , se observó al microscopio hasta que el 90% de todos los huevos rompieron la estructura externa y liberaron a las oncosferas. Inmediatamente se aforó el contenido del tubo a 50 ml con PBS, se centrifugó a 1000rpm por 5 minutos y se lavaron dos veces más con PBS.

Para la activación se colocaron las 200,000 oncosferas en 2.5 ml de PBS con antibióticos y se aforó a 10ml con una solución de Tripsina, se agregaron 5ml de bilis de cerdo centrifugada y filtrada. Se incubaron a 39°C por 45 minutos, agitando vigorosamente por un minuto cada 10 minutos. Se tomó una muestra y se observó al microscopio para corroborar que el 90% de las oncosferas estuvieran activadas; lo cual se verificó al observar los movimientos activos de los parásitos

contenidos en la muestra. Al finalizar se añadió solución salina isotónica (SSI) precalentada a 37°C y se aforó a 50ml; se centrifugó a 1000rpm por 5 minutos. Se repitió el lavado 3 veces y se observó al microscopio, se contó el número de oncosferas activadas en 5µl de suspensión y se mantuvieron a una temperatura de 37°C y se trasladaron al área de quirófanos de la FMVZ de la UNAM, donde estaban preparados los cerdos para la inoculación de las oncosferas.

3. Animales e instalaciones.

Se utilizaron 12 cerdos clínicamente sanos y libres de cisticercosis, cruce de Landrace y Yorkshire, de dos meses de edad, 6 hembras y 6 machos, los cuales se compraron en el Centro de Enseñanza, Investigación y Experimentación en Producción Porcina (CEIEPP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Jilotepec Estado de México. Los animales se trasladaron a las instalaciones de la FMVZ en Ciudad Universitaria y se alojaron en los corrales de investigación de cisticercosis. Los corrales tienen un área de 8.8m² y cuentan con paredes, piso y techo de concreto, iluminación, ventilación, drenaje y bebederos de chupón. Los cerdos fueron alimentados una vez al día con alimento procesado en el CEIEPP, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

4. Realización de las Neurocirugías y obtención de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), para la detección de anticuerpos contra *Taenia solium* y antígeno HP10, antes de la infección.

Los animales fueron sometidos a un ayuno de 8 horas previo a las cirugías para evitar complicaciones durante el manejo anestésico. Antes de la cirugía los animales fueron pesados, posteriormente se indujeron al plano anestésico utilizando una combinación de xilacina a una dosis de 2.2mg/kg, Ketamina a 2.2mg/kg y Tiletamina-Zolacepam a 4.4mg/kg de peso vivo, vía intramuscular aplicada en la tabla del cuello. Una vez anestesiados los animales fueron llevados al área de preparación de los quirófanos de la FMVZ, donde se canalizaron con solución isotónica de cloruro de sodio en la vena marginal de la oreja; se realizó la limpieza y asepsia del área quirúrgica (nasal, temporal, parietal y occipital); se les colocó a los animales una sonda endotraqueal adecuada al tamaño de cada cerdo, **(Figura 1 y 2)**. Los animales fueron trasladados a la mesa de cirugía donde la sonda endotraqueal se conectó al aparato de anestesia inhalada. Para mantenerlos en plano anestésico se utilizó isoflurano con una tasa de flujo entre un 2 y 3%. Se realizó una incisión lineal de 3 cm en la piel con una hoja de bisturí del número 15, en dos tiempos; cuyo centro se encontró a 2 cm en sentido rostral del conducto auditivo externo y a 2 cm a partir de la línea media en sentido lateral, **(Figura 3)**. La hemostasia se realizó por medio del uso de un electrodo bipolar de Malis y se colocó un separador autoestático en el sitio de la incisión; se legró el periostio y con un equipo para craneotomía de alta velocidad (Midas Rex®) se

realizó una trepanación en el punto mencionado, **(Figura 4)**; se regularizaron los bordes del trepano con una cucharilla de Volkman y se incidió la duramadre con una hoja de bisturí del número 11. Los bordes de la meninge fueron electrocoagulados. En todos los cerdos se realizó una corticectomía y se puncionó el encéfalo en el área del lóbulo parietal con un catéter recubierto por una sonda de látex de 5mm de diámetro hasta que se alcanzó una profundidad de 2cm a partir de la superficie externa del cráneo; se comprobó que el catéter se encontrará en el ventrículo lateral al extraer LCR. Se obtuvieron volúmenes de 2ml de LCR por cada cerdo; las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C hasta su utilización como muestra control para la detección de anticuerpos específicos contra *Taenia solium* y antígeno HP10. La inoculación de las oncosferas se realizó después de la obtención de LCR de la siguiente manera: los cerdos identificados con los números 90, 93, 95, 96 y 98, se inocularon con dosis alta de 1000 a 1500 oncosferas, por vía subaracnoidea; los animales identificados con los números 92 y 97, se inocularon con dosis baja de 100 a 150 oncosferas, por vía subaracnoidea; los cerdos 91 y 94 se inocularon con dosis alta por vía ventricular y los animales 89, 99 y 100 se inocularon con dosis baja por vía ventricular. En los cerdos que fueron inoculados por vía subaracnoidea se desplazó la corteza cerebral de las circunvoluciones para depositar a las oncosferas en el fondo del surco. La inoculación por vía ventricular se realizó utilizando la sonda de látex **(Figura 5)**; colocada en el ventrículo lateral para la extracción de LCF; al término de la implantación de las oncosferas se retiró la sonda y se corroboró la hemostasia de la duramadre; se aplicaron fragmentos de

esponja estéril de gelatina natural absorbible (gelfoam®) en el sitio de la durotomía y se aplicó un fragmento de cera para hueso en el sitio de la trepanación. La sutura de los tejidos se realizó por planos; primero la aponeurosis epicraneal y los tejidos subcutáneos con Vycril del número 1 y después la piel con Nylon del número 0, **(Figura 6)**. Una vez terminadas las cirugías, los cerdos se trasladaron a un corral de observación donde fueron vigilados hasta que se restablecieron completamente de los efectos de la anestesia y se les aplicó una combinación de penicilina, estreptomicina y dexametasona (Shotadex®) a una dosis de 40,000 UI/kg, Enrofloxacin a una dosis de 5mg/kg y flumixin de meglumina a una dosis de 2mg/kg de peso vivo, vía intramuscular, cada 24 horas por 5 días; durante este tiempo se realizaron los cuidados de limpieza y asepsia del área quirúrgica hasta que la herida cicatrizó. Las suturas externas fueron retiradas a los 10 días posteriores a la cirugía.



Figura 1. Área quirúrgica después de realizada la asepsia previa a la cirugía en un cerdo. (flecha roja).



Figura 2. Colocación de la sonda endotraqueal en un cerdo anestesiado.



Figura 3. Incisión en la región fronto-parietal del cráneo de un cerdo.



Figura 4. Realización de la craneotomía en el sitio de la incisión.

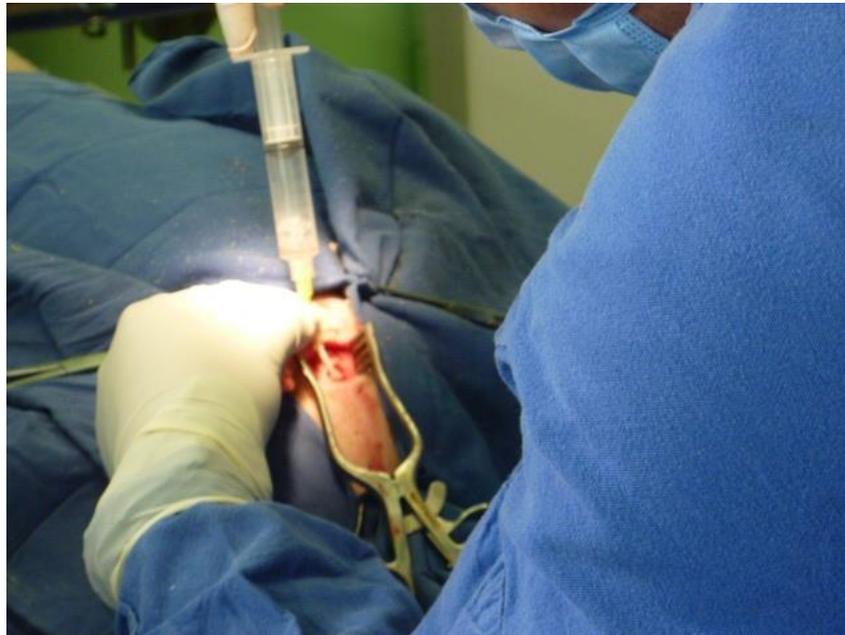


Figura 5. Inoculación de las oncosferas por vía intraventricular, a través de una sonda de látex conectada directamente al ventrículo lateral de un cerdo.



Figura 6. Sutura de piel, una vez terminada la cirugía para el afrontamiento de los tejidos.

5. Obtención de las muestras de suero.

Se obtuvieron mediante la sujeción física de los cerdos con lazatompas comerciales y se puncionó la vena yugular con sistemas de sangrado Sarstedt® sin anticoagulante con agujas del número 21G (color verde); el primer muestreo se realizó 15 días antes de la inoculación de las oncosferas para tener muestras controles negativos de referencia. Los muestreos siguientes se hicieron después de la inoculación de los parásitos con un lapso de 15 días entre cada muestreo por un periodo de 3 meses; una vez contenida la sangre dentro de los tubos y después de que se formaron los coágulos de sangre, los tubos se centrifugarán a 1000rpm por 5min para separar el suero, el cual se colocó en tubos Eppendorf. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso.

6. Necropsias y obtención del SNC para la evaluación del desarrollo de metacestodos y extracción de LCR para la detección de anticuerpos contra *Taenia solium* y antígeno HP10.

Los cerdos se mantuvieron bajo observación por un periodo máximo de 140 días para verificar la presencia de semiología nerviosa; una vez concluido este tiempo se realizó la eutanasia de los animales, utilizando electroinsensibilización y degüello, de acuerdo a lo especificado en la Norma Oficial Mexicana, de sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres (NOM-033-ZOO-1995; párrafo 5.3). El líquido cefalorraquídeo se obtuvo por medio de la punción en el foramen magno con una jeringa de 10 ml y fue procesado para la evaluación de la presencia de anticuerpos anti *Taenia solium* y antígeno HP10. El encéfalo se extrajo abriendo la cavidad craneana y la médula espinal realizando un corte sagital sobre la columna vertebral. El encéfalo y médula espinal de cada cerdo fueron identificados y colocados en frascos con formalina al 10% con pH 7 por un lapso de 7 a 10 días; después de este tiempo fueron lavados con agua corriente por 10 minutos y se procedió a realizar los cortes transversales con un grosor de 0.5cm para verificar la implantación y desarrollo de las oncosferas hasta la etapa de metacestodos. Los cortes que contenían metacestodos fueron procesados por medio de técnicas convencionales de histología y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H/E) para su estudio microscópico, en el que se clasificó el tipo de respuesta inflamatoria que presentaron las lesiones, de acuerdo con Aluja y Vargas.³¹

7. Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* en el suero y LCR de los cerdos infectados por medio de ELISA indirecto.

Se sensibilizó la placa con una muestra de antígenos de *T. solium* a 4.2mg/ml. En una solución de buffer de carbonatos a un pH de 9.6 (95.2µl en 40 ml de buffer) a una concentración de 1µl/pozo a una temperatura de 4°C durante 8hrs. Posterior a esto, se realizó un primer lavado de la placa cuatro veces con una solución PBS-Tween al 0.3% en un lavador de placas para ELISA Marca Labssystem, Modelo Wellwash 4; después se bloqueó con PBS-BSA al 1%-Tween al 0.3%, cantidad/pozo 200µl. se incubó por 1 hora a una temperatura de 37°C. Se realizó un segundo lavado de la placa cuatro veces con solución PBS-Tween al 0.3%, se agregó el suero/LCR problema de cerdo a una dilución optimizada 1:100 en PBS-BSA al 1%-Tween al 0.3%, cantidad/pozo 100µl. incubándose a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Se realizó un tercer lavado cuatro veces PBS -Tween al 0.3%, después se adicionó el conjugado Anti-IgG total de Cerdo-HRP a una cantidad/pozo 100µl, luego se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos; se realizó un cuarto lavado de la placa cuatro veces con solución PBS -Tween al 0.3%, se agregó el sustrato a una cantidad/pozo de 100µl a una temperatura de 4°C, se esperó un tiempo máximo de 10 minutos para observar la reacción, posteriormente se realizó una lectura con el lector de placas para ELISA con filtros para leer densidad óptica a 450 nm y 650 nm. Marca Device Molecular Modelo Versa max microplate reader ®.

8. Detección de antígeno HP10 en el suero y LCR de cerdos infectados.

Se sensibilizó la placa con un anticuerpo monoclonal Anti-HP10 a 5mg/ml en un buffer de boratos a un pH de 8.2 (20µl de anticuerpos en 10ml de buffer) a una concentración/pozo 100µl a una temperatura de 4°C durante 8 horas, se realizó un primer lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, en un lavador de placas para ELISA Marca Labsystem, Modelo Wellwash 4; se bloqueó con PBS-BSA al 1%-Tween 0.05% cantidad/pozo 200µl a temperatura ambiente por 1 hora, se realizó un segundo lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó el suero/LCR problema sin diluir en una cantidad/ por pozo de 100µl, se incubó a 37°C por 30 minutos. Se realizó un tercer lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó un primer conjugado Anticuerpos anti-HP10 biotinilado a una dilución optimizada a 1:4000 en PBS-BSA al 1%-Tween 0.05% cantidad/pozo 100µl, se incubó a una temperatura de 37°C por 1 hora, se realizó un cuarto lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó un segundo conjugado de Streptoavidina-HRP (Peroxidasa) a una dilución optimizada de 1:4000 en PBS-BSA 1%-Tween 0.05% cantidad/pozo 100µl, se incubó a 37°C por 30 minutos; se realizó un quinto lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó el sustrato cantidad/pozo 100µl a una temperatura entre 4-37°C por 30 minutos, se realizó la lectura con el lector de placas para ELISA con filtros para leer densidad óptica a 450 nm y 650 nm. Marca Device Molecular Modelo Versa max microplate reader. Se obtuvo la densidad óptica por cada muestra y se realizaron los cálculos para determinar

cuales animales fueron positivos a la presencia de anticuerpos anti *Taenia solium* y positivos a la presencia de antígeno HP10.

Los resultados que se obtuvieron se correlacionaron con los resultados de la necropsia de los animales con respecto al número, localización y estado de los metacestodos en el SNC.

RESULTADOS.

Tres de los doce cerdos presentaron desarrollado de un metacestodo; de los cuales, dos se inocularon por vía intraventricular; sin embargo, los parásitos se encontraron en la superficie del parénquima cerebral, cerca de la zona de inoculación. El otro cerdo fue inoculado por vía subaracnoidea. Los tres cerdos en los que se encontraron los parásitos, fueron inoculados con dosis altas de 1000 a 2500 oncosferas. Siete cerdos presentaron títulos positivos de anticuerpos anti-*Taenia solium* en suero. Tres cerdos presentaron títulos positivos al Ag HP10 en suero. Un cerdo presento títulos positivos al AgHP10 en LCR. **(Cuadro 1)**

ID	VI	DI	TI días	Ac's suero	Ac LCR	Ag HP10 suero	Ag HP10 LCR	Cerdos positivos a NCC
92	SA	Baja	126	3+	(-)	(-)	(-)	(-)
97	SA	Baja	105	4+	(-)	1+	(-)	(-)
89	IV	Baja	119	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
99	IV	Baja	102	4+	(-)	(-)	(-)	(-)
100	IV	Baja	102	4+	(-)	1+	(-)	(-)
90	SA	Alta	119	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
93	SA	Alta	27	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
95	SA	Alta	116	4+	(-)	(-)	(-)	(-)
96	SA	Alta	119	1+	(-)	(-)	(-)	(-)
98	SA	Alta	102	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
91	IV	Alta	122	5+	(-)	(-)	(-)	(+)
94	IV	Alta	101	(-)	(-)	1+	(+)	(+)

Cuadro 1.Resultados del experimento.

ID: identificación de los cerdos; **VI:** vía de inoculación; **SA:** subaracnoidea; **IV:** intraventricular; **DI:** dosis infectiva; **TI:** Tiempo de infección en días. Las columnas de Ac's y AgHP10 en suero muestran las veces en que los cerdos presentaron títulos positivos ej. 3+= 3 muestreos positivos.

Cerdos inoculados por vía intraventricular (IV) a dosis baja (DB).

Tres cerdos fueron inoculados IV con DB, los cuales se identificaron con los números 89, 99 y 100.

CERDO 89.

a) Estudio macroscópico y microscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC. El cerdo 89 no presentó desarrollo de metacestodos, ni lesiones sugerentes a la implantación de los parásitos en el encéfalo o médula espinal.

b) Detección de anticuerpos anti-*Taenia solium* y Antígeno HP10 en suero. El cerdo 89 presentó títulos positivos a la presencia de anticuerpos en el sexto muestreo, 87 días postinfección, con una DO de 0.7355nm; para el séptimo muestreo, los resultados de los títulos fueron negativos; mientras que, a partir del octavo muestreo presentó un incremento constante de los anticuerpos que se mantuvo hasta la eutanasia del cerdo, a los 136 días postinfección. Los valores de DO de las muestras positivas fueron 0.438nm, 0.636nm, 0.919nm. La prueba de detección de antígeno HP10 en suero fue negativa. **Figura 7.**

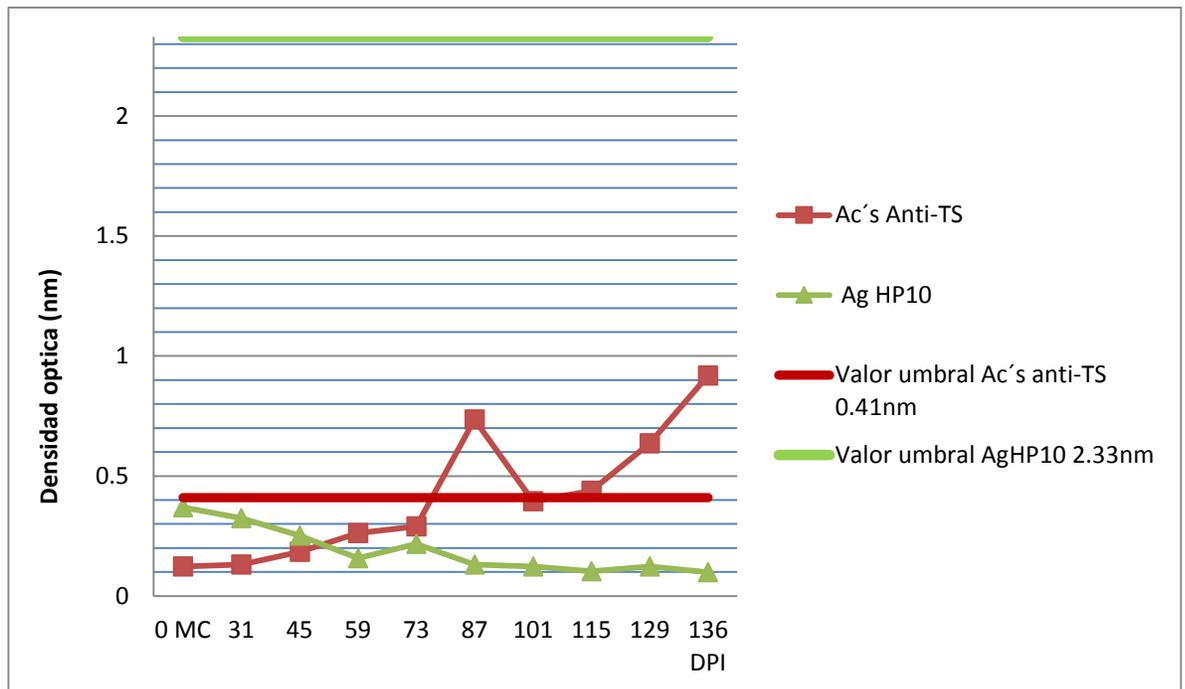


Figura 7. Anticuerpos (Ac's) anti *Taenia solium* (TS); y antígeno (Ag) HP10 en el suero del cerdo 89.

MC: Muestra control; **DPI:** días post-infección; **VU:** valor umbral para determinar a una muestra como positiva; **nm:** nanómetros.

c) Detección de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR. El valor umbral que se determinó para considerar a un animal como positivo a la presencia de anticuerpos anti *Taenia solium* fue de 0.5nm. La muestra de LCR del cerdo 89 obtuvo una DO de 0.1045nm. El valor umbral establecido para considerar a una muestra positiva a la presencia de antígeno HP10 fue de 1.67nm. El valor promedio de la DO de la muestra de LCR fue de 0.3nm. **Figura 8.**

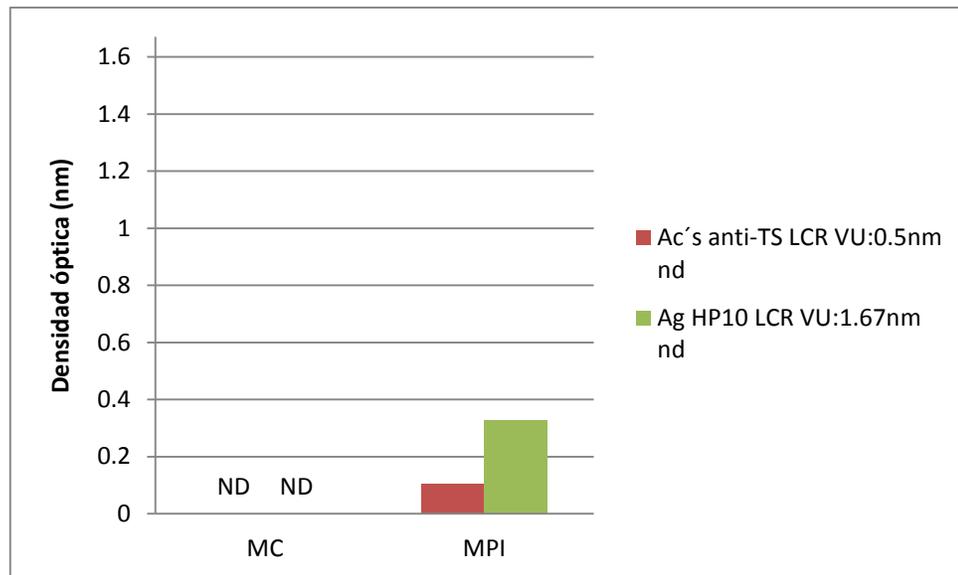


Figura 8. Valores de Ac's anti -TS y Ag HP10 en el LCR del cerdo 89.

CERDO 99.

- a) Estudio macroscópico y microscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** El cerdo 99 no presentó desarrollo de metacestodos de *Taenia solium* y tampoco se encontraron lesiones sugerentes a la implantación de los parásitos en el SNC.
- b) Detección de anticuerpos anti-*Taenia solium* y AgHP10 en suero.** El valor umbral de DO para la medición de Ac's anti-TS se determinó en 0.43nm. los valores promedio de DO, obtenidos para las diferentes muestras de suero del cerdo 99 se encontraron por debajo del valor umbral. El valor umbral de DO para la medición de AgHP10 se determinó en 1.13nm. Los valores de DO para las muestras de suero se encontraron por debajo del valor umbral. **Figura 9.**

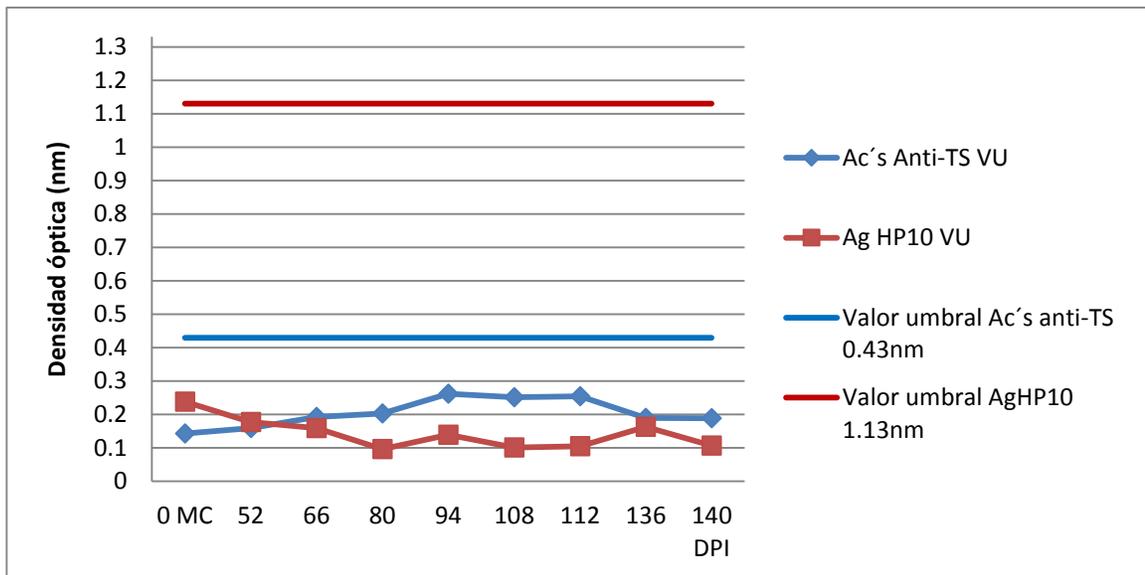


Figura 9. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en el suero del cerdo 99

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.

El valor umbral de DO se determinó en 0.5nm. Los valores de DO para las muestras de LCR del cerdo 99 se encontraron por debajo del valor umbral; por lo tanto, las muestras de LCR resultaron negativas a las presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium*. Los valores de DO de las muestras de LCR del cerdo 99 se encontraron por debajo del valor umbral de 1.67nm, por lo que las muestras resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10.

Figura 10.

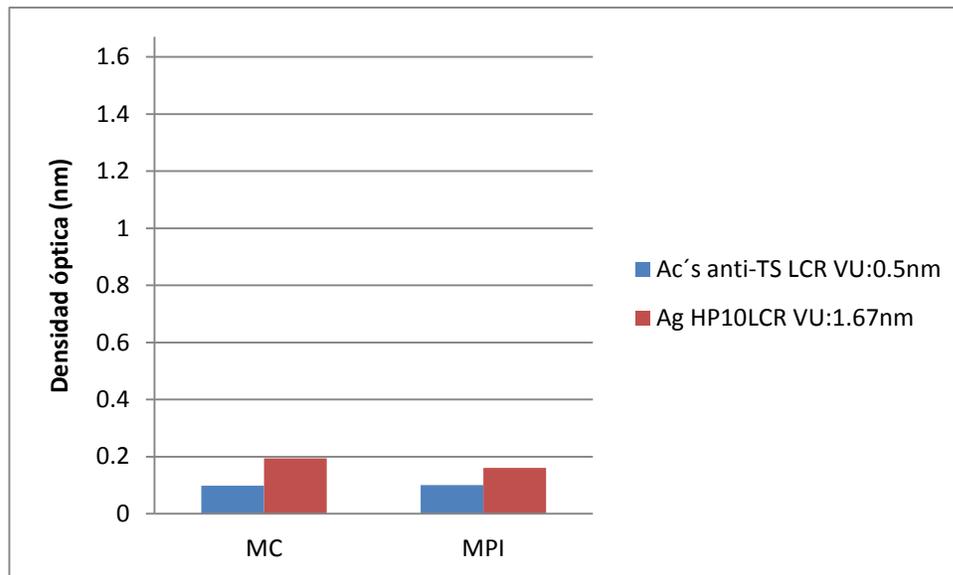


Figura 10. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 , en las muestras de LCR del cerdo 99.

CERDO 100

a) Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia*

***solium* en el SNC.** El cerdo 100 no presentó desarrollo de metacestodos de *Taenia solium* y tampoco se encontraron lesiones sugerentes a la implantación de los parásitos en el SNC.

b) Detección de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en suero. El

valor umbral de DO que se determinó para considerar a una muestra de suero positiva a la presencia de anticuerpos anti- *Taenia solium* se fijó en 0.43nm, el cerdo 100 comenzó a presentar títulos positivos a partir de la sexta muestra, es decir, 108 días después de la infección, conservando los niveles positivos hasta la necropsia en el noveno muestreo. Los valores de los muestreos 6, 7,8 y 9 fueron los siguientes: 0.559nm, 0.6855nm, 0.53nm y 0.5785nm, respectivamente. El valor umbral de DO para considerar a una

muestra positiva a la presencia de antígeno HP10 se fijó en 1.13nm. solo en el noveno (día 140 post infección) muestreo presentó títulos positivos, teniendo la muestra una DO de 1.4890nm. **Figura 11.**

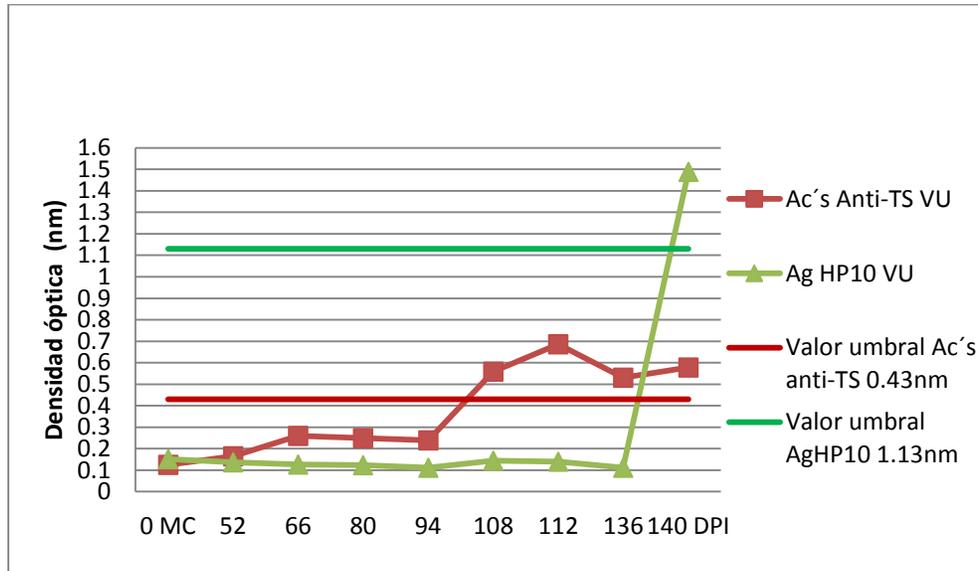


Figura 11. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en el suero del cerdo 100.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR. El valor umbral de DO para considerar a una muestra de LCR como positiva a la presencia de anticuerpos se estableció en 0.5nm. los valores de DO para los niveles de anticuerpos en las muestras de LCR del cerdo 100 se encontraron por debajo del valor umbral, por lo que las muestras fueron negativas a la presencia de anticuerpos. Los valores de DO para las muestras de LCR, en la detección de antígeno HP10 se mantuvieron por debajo del valor umbral de 1.13nm, por lo que, las muestras de LCR fueron negativas a la presencia del antígeno. **Figura 12.**

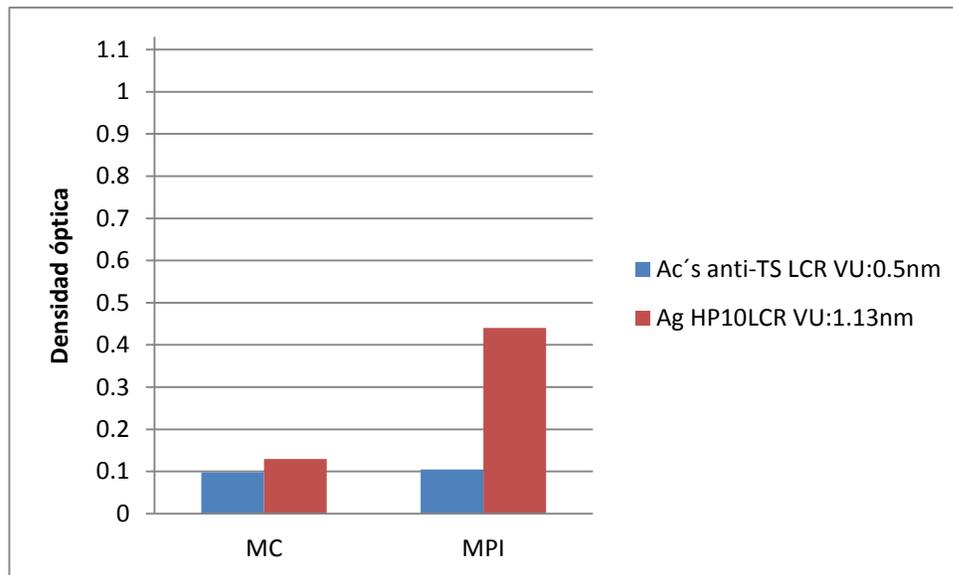


Figura 12. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en el LCR del cerdo 100.

Cerdos inoculados por vía IV a dosis alta (DA).

Dos cerdos fueron inoculados por vía IV con DA, los cuales se identificaron con los números 91 y 94.

Cerdo 91.

- a) Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** En la revisión del encéfalo se observó una cavidad de aproximadamente 0.5cm de diámetro (**figura 13**), en cuyo fondo se pudo apreciar la existencia de una estructura compatible con el escólex de un metacestodo (**figura 14**); la cavidad se localizó en el hemisferio izquierdo a nivel del surco cruciado.

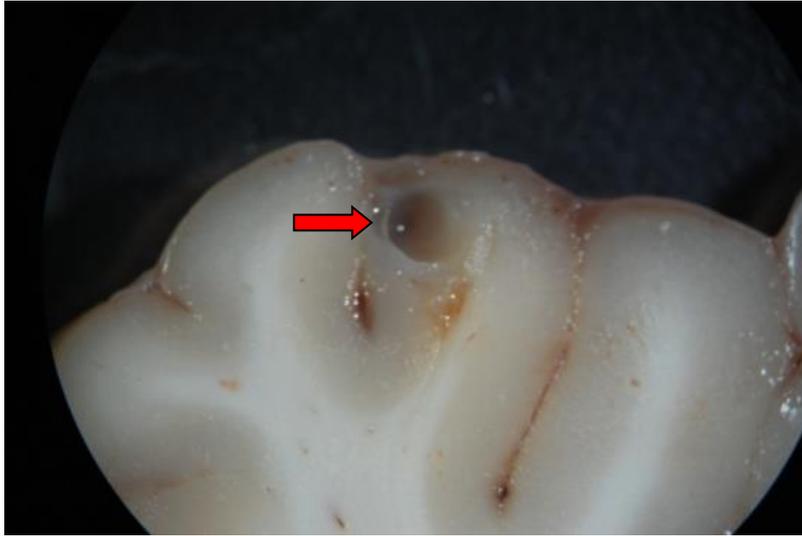


Figura 13. Cavidad ocasionada por un metacestodo de *T. solium* en el encéfalo del cerdo 91. (Flecha roja). Aumento1x.



Figura 14. Estructura compatible con el escólex de un metacestodo de *T. solium* localizado en el encéfalo del cerdo 91.

b) Estudio histopatológico. La revisión microscópica de la región del encéfalo con la lesión permitió observar el escólex y el tegumento del parásito, **(Figura 15)**. La respuesta inflamatoria que se presentó alrededor del metacestodo se caracterizó por presentar macrófagos, células gigantes, linfocitos, eosinófilos y se clasificó como grado III, de acuerdo a la clasificación de Aluja y Vargas.³¹ **(Figura 16)**.



Figura 15. Metacestodo en estado vesicular, localizado en el encéfalo del cerdo 91. Se aprecia el tegumento (T) y el escólex del parásito (E). H/E (10x).

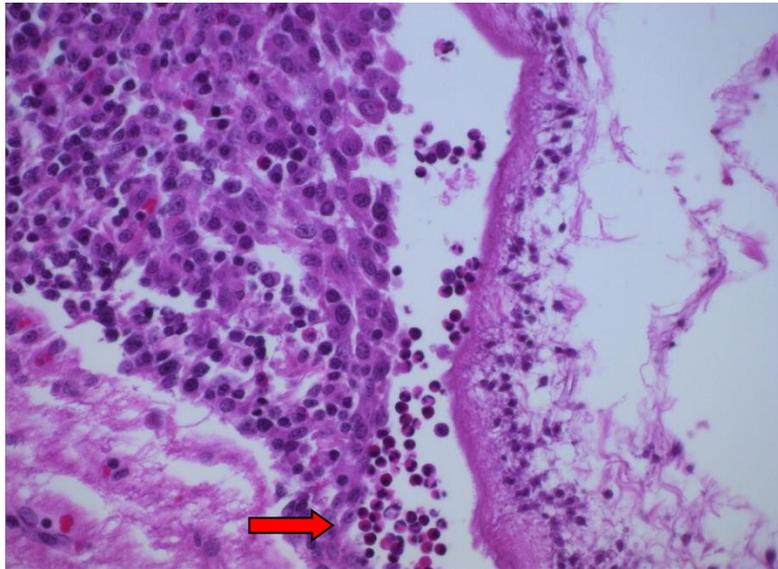


Figura 16. Respuesta inflamatoria (RI) asociada a un metacestodo de *T. solium*, a los 139 días post infección.

La respuesta inflamatoria esta caracterizada por abundantes linfocitos y escasos eosinofilos (flecha roja). Se clasificó grado III de acuerdo con Aluja y Vargas. H/E (40x).

- c) Detección de anticuerpos y AgHP10 en suero.** El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijo en 0.38nm. el cerdo 91 comenzó a presentar títulos positivos de anticuerpos a partir del quinto muestreo, 73 días después de la infección; manteniéndose por arriba del valor umbral hasta el noveno muestreo. Los valores de los muestreos positivos fueron 0.815nm, 0.9255nm, 0.6825nm, 0.5695nm y 0.4085nm. Los valores de DO de las muestras de suero para la detección del AgHP10 se mantuvieron por debajo del valor umbral de 2.33nm. **Figura 17.**

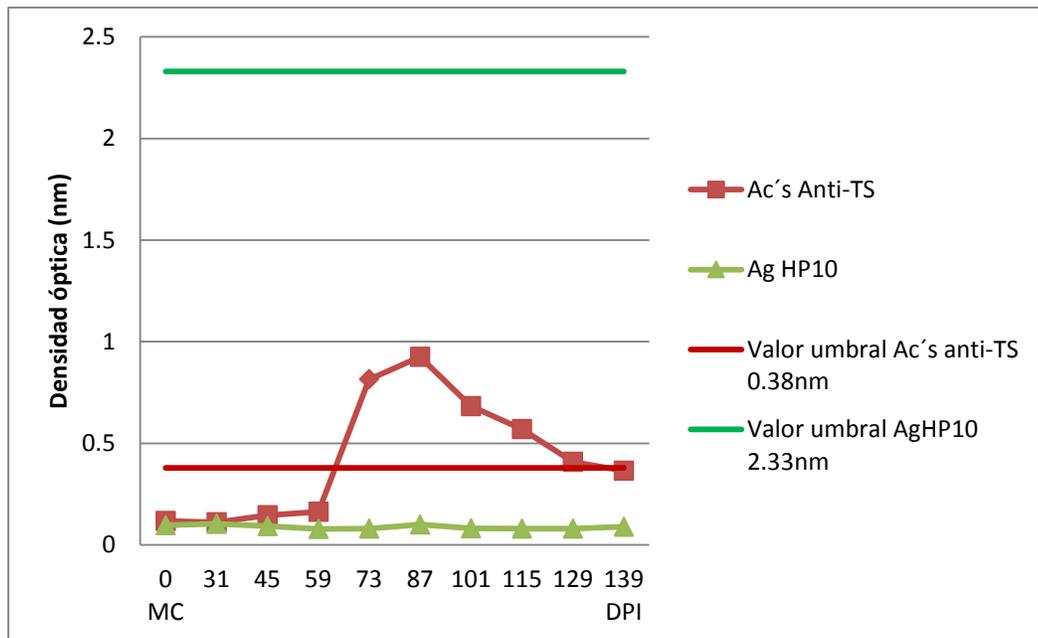


Figura 17. Resultados de los títulos de Ac's anti TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 91.

d) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos anti- *Taenia solium*; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de 0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10. El valor umbral fue de 1.67nm. **Figura 18.**

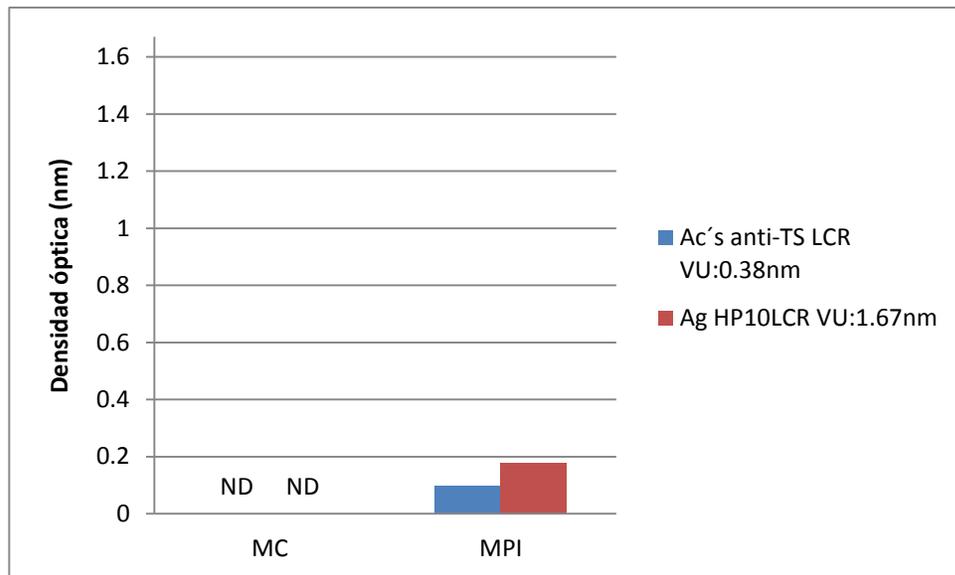


Figura 18. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en las muestras de LCR del cerdo 91.

Cerdo 94.

- a) **Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** Al revisar el encéfalo, se encontró a un metacestodo en el lóbulo parietal, cercano a la cisura interhemisferica y al surco cruciado; en el hemisferio izquierdo, (**Figura 19**).

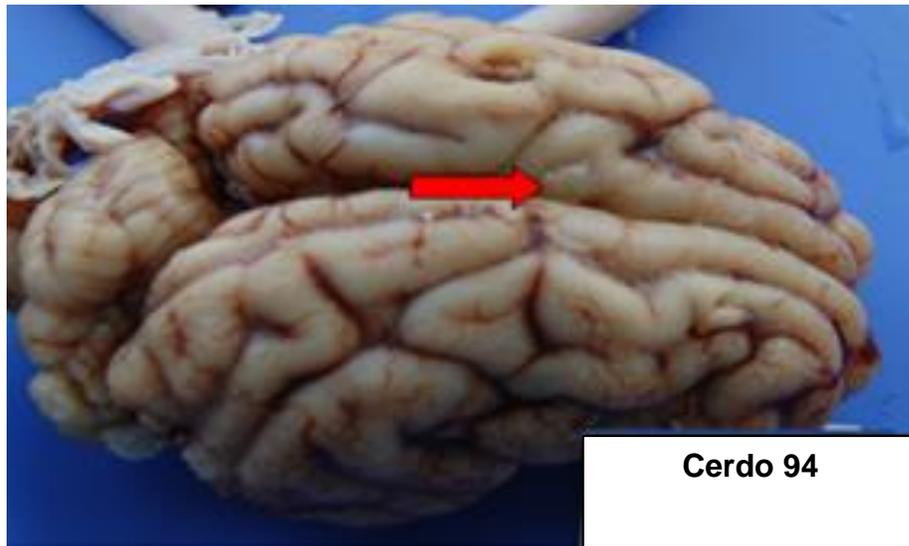


Figura 19. Sitio donde se localizó el metacestodo de *Taenia solium* en el encéfalo del cerdo 94. (Flecha roja).

b) Estudio histopatológico. Al hacer la revisión microscópica de la región, no se observaron estructuras parasitarias como el tegumento o el escólex, por que se perdieron durante el procesamiento de la muestra, **(Figura 20)**; sin embargo, si se pudo observar la respuesta inflamatoria caracterizada por un gran número de eosinofilos. La respuesta inflamatoria se catalogó como tipo IV; de acuerdo con Aluja y Vargas.³¹ **(Figura 21)**.

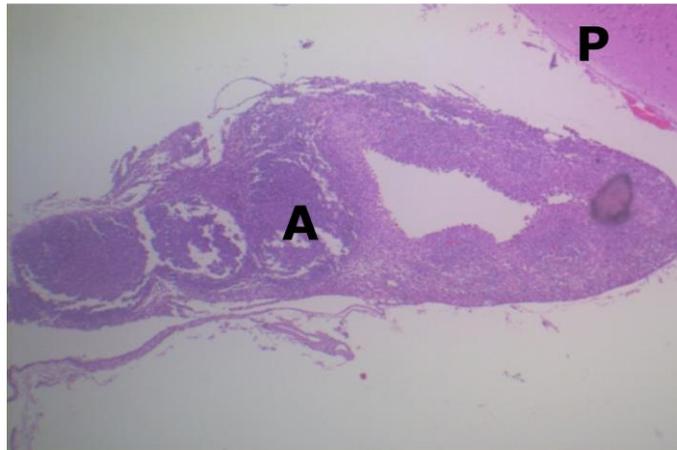


Figura 20. (A) área donde se localizó el metacestodo.

Las estructuras parasitarias no se pueden apreciar, pues estas se perdieron durante el procesamiento histopatológico. H/E. (10x).

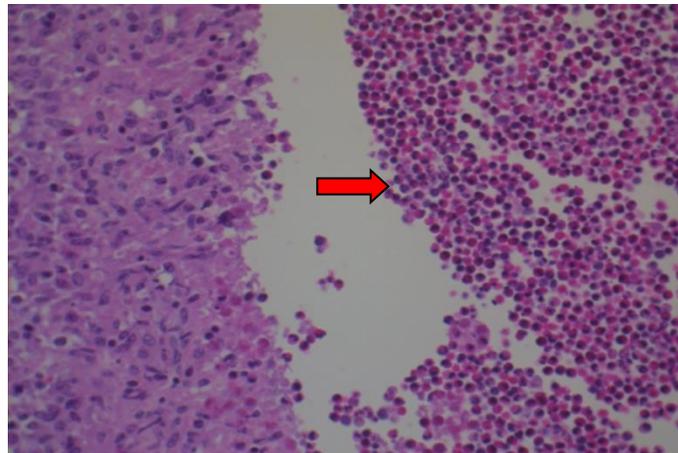


Figura 21. Respuesta inflamatoria asociada al metacestodo, de *Taenia solium* encontrado en el cerdo 94 vista al microscopio.

La respuesta inflamatoria observada en esta área se caracteriza principalmente por eosinofilos (flecha roja) e infiltración linfocitaria; sin embargo, en otras áreas, la respuesta predominante se asoció a linfocitos y macrófagos y se clasificó en un grado IV, de acuerdo con Aluja y Vargas; lo que indica que el parásito se encontraba en un estado inicial de degeneración. H/E. (40x).

c) **Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero.** Los valores de DO de las muestras de suero del cerdo 94, se mantuvieron por debajo del valor umbral de 0.38nm, por lo que resultaron negativas a la presencia de anticuerpos anti- *Taenia solium*. El valor umbral de DO se determinó en 1.12nm. el quinto muestreo (93 días PI), presentó títulos positivos al tener una DO de 1.7125nm; las otras muestras fueron negativas. **Figura 22.**

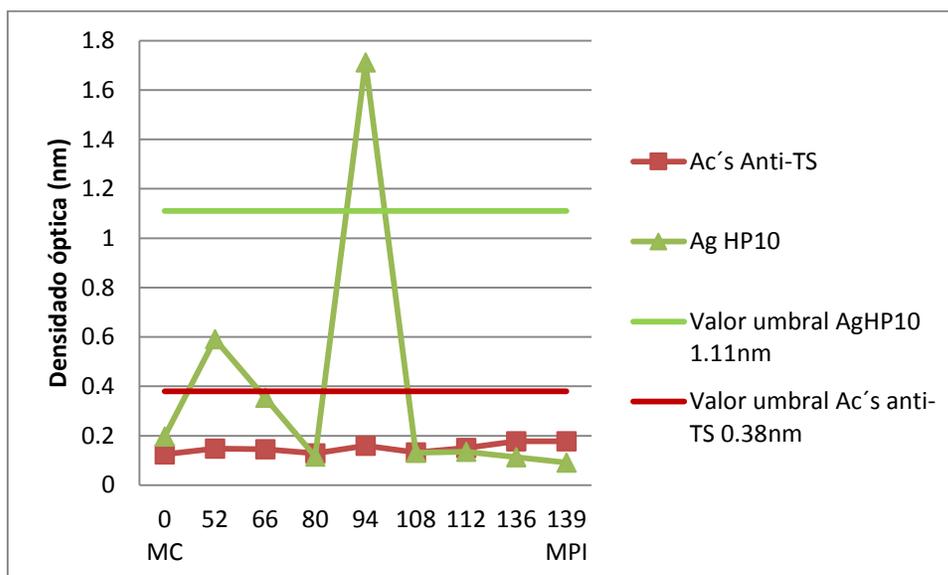


Figura 22. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en muestras de suero del cerdo 94.

d) **Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.**

Las muestras de LCR, resultaron negativas a la presencia de anticuerpos. El valor umbral se fijo en 0.5nm. La muestra de LCR fue positiva a la presencia de antígeno HP10 al tener una DO de 2.33nm, cuando el valor umbral se situó en 1.67nm. **Figura 23.**

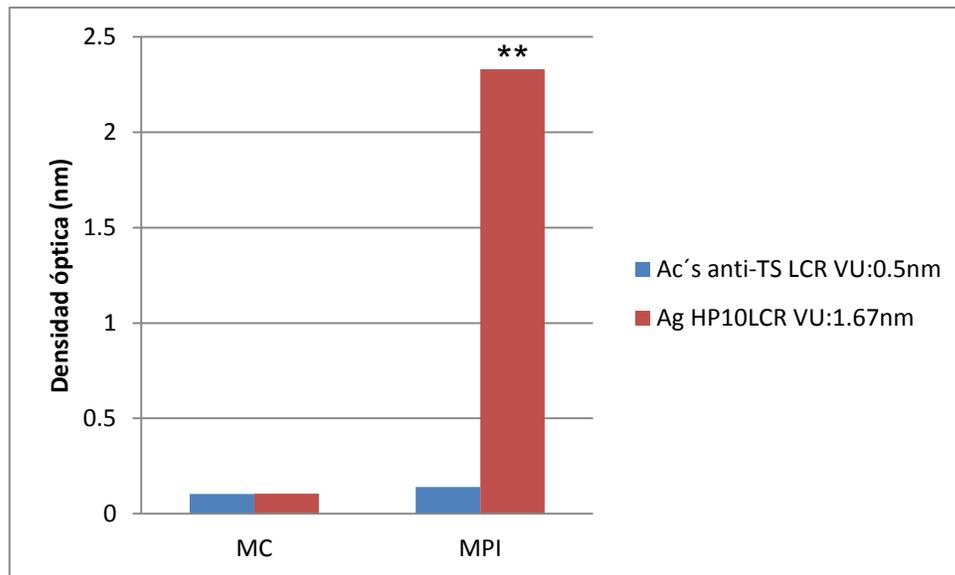


Figura 23. Valores de Ac's anti-TS y de AgHP10 en las muestras de LCR del cerdo 94.

Cerdos inoculados por vía Subaracnoidea (SA) a DB.

Dos cerdos fueron inoculados SA con DB; se identificaron con los números 92 y 97.

Cerdo 92.

a) Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC. En la revisión del SNC no se observaron estructuras parasitarias y tampoco lesiones sugerentes a la implantación de los metacestodos de *Taenia solium*.

b) Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero. El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijó en 0.38nm. el

cerdo 92 comenzó a presentar títulos positivos de anticuerpos a partir del octavo muestreo, 115 días después de la infección; manteniéndose por arriba del valor umbral hasta el décimo muestreo. Los valores de los muestreos positivos del octavo al décimo muestreo fueron 0.617nm, 0.5945nm y 0.503nm, respectivamente. Los valores de DO de las muestras de suero se mantuvieron por debajo del valor umbral de 2.33nm, por lo que fueron negativas a la presencia del antígeno HP10. **Figura 24.**

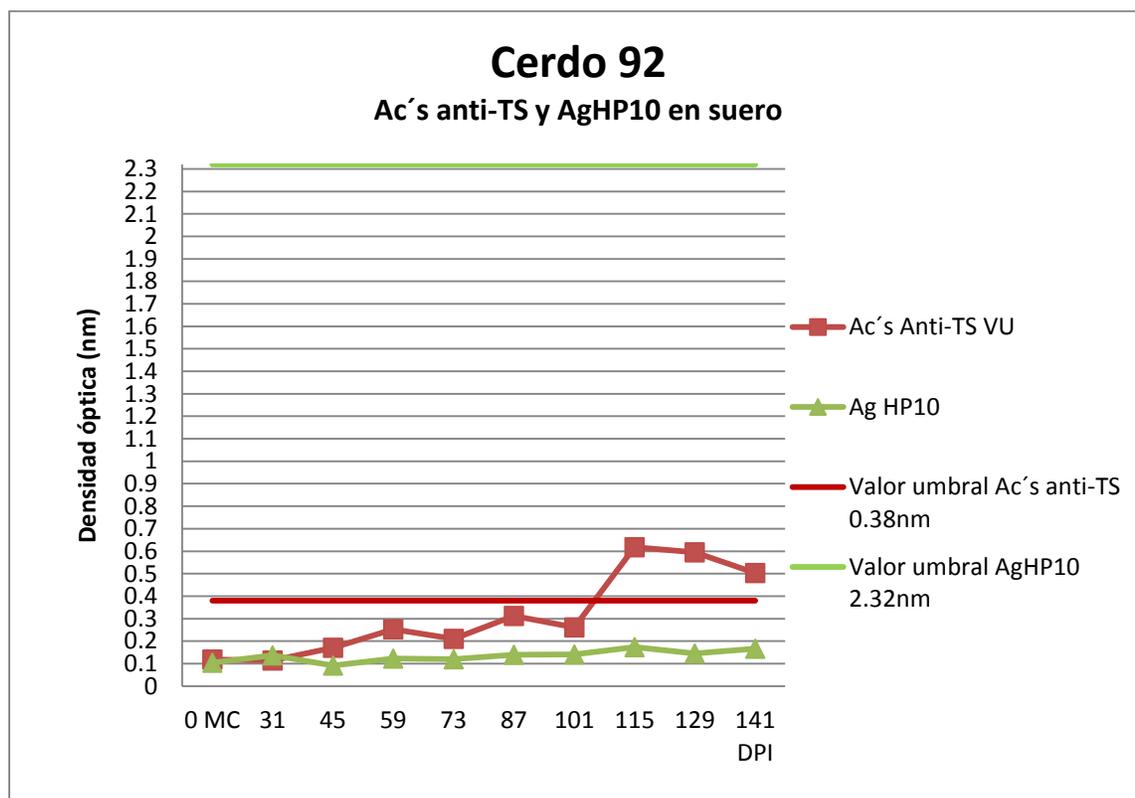


Figura 24. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en muestras de suero del cerdo 92.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHp10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de

0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10; con un valor umbral de 1.67nm. **Figura 25.**

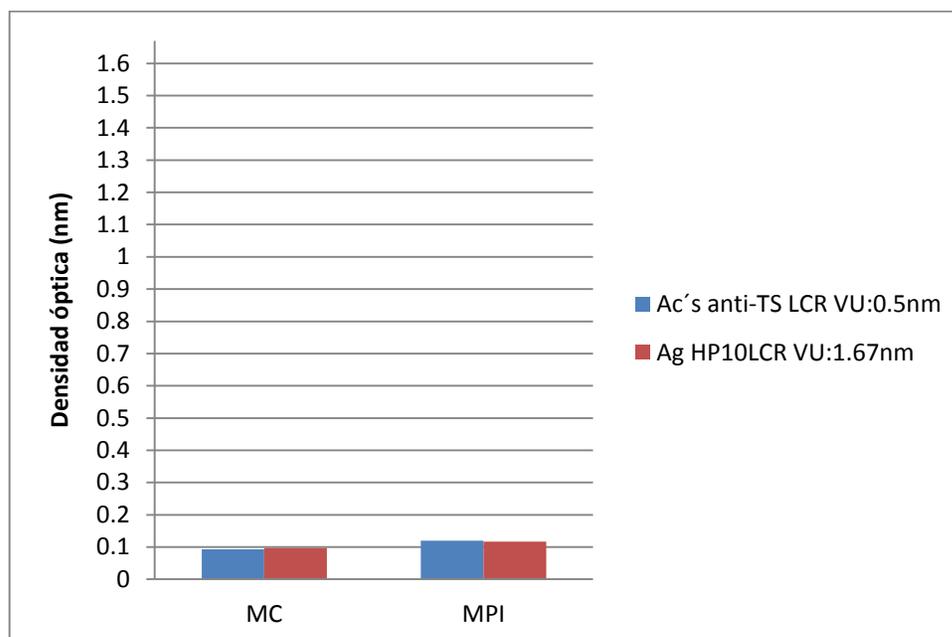


Figura 25. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en las muestras de LCR del cerdo 92.

Cerdo 97.

- a) **Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** En la revisión del encéfalo y médula espinal no se observaron estructuras parasitarias y tampoco lesiones sugerentes a la implantación de los metacestodos de *Taenia solium*.
- b) **Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero.** El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijó en 0.38nm. el cerdo 97 comenzó a presentar títulos positivos de anticuerpos a partir del

sexto muestreo, 108 días después de la infección; manteniéndose por arriba del valor umbral hasta el noveno muestreo. Los valores de los muestreos positivos del quinto al noveno muestreo postinfección fueron 0.4465nm, 0.876nm, 0.751nm y 0.826nm, respectivamente. El valor de DO del octavo muestreo fue de 1.6485nm; ubicándose por arriba del valor umbral de 1.12nm; resultando positivo a la presencia de antígeno HP10.

Figura 26.

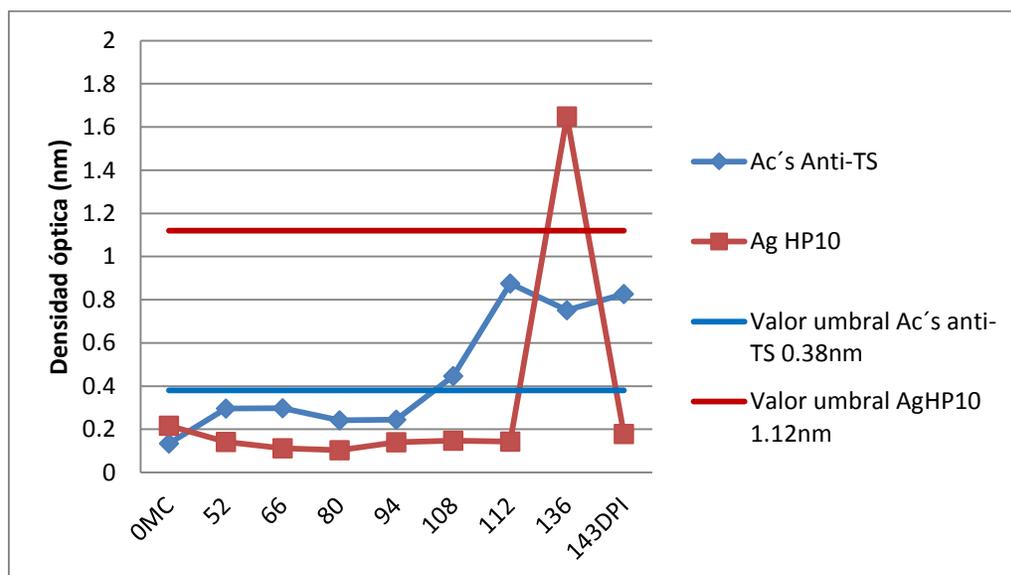


Figura 26. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en muestras de suero del cerdo 97.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de 0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10; con un valor umbral de 1.67nm. **Figura 27.**

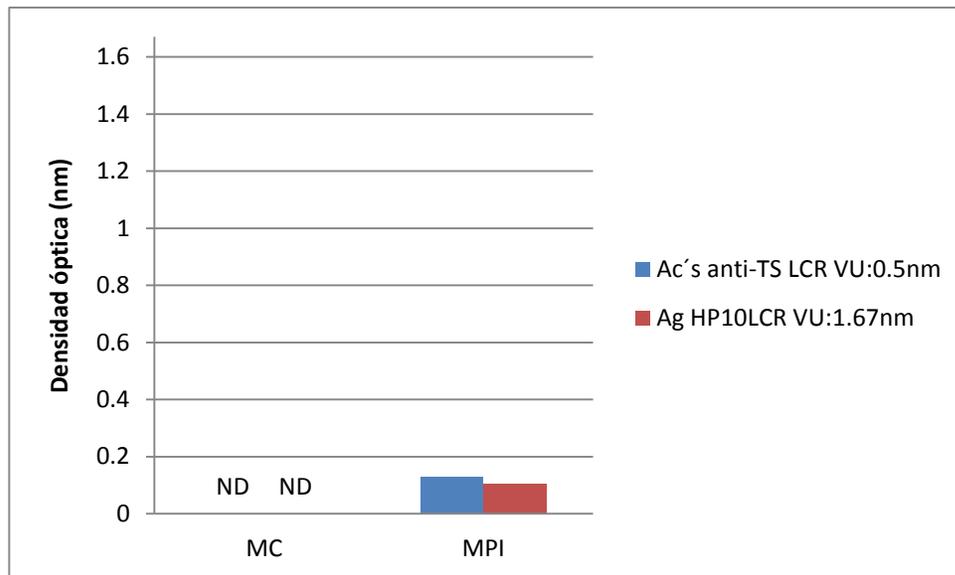


Figura 27. Los valores de Ac's anti-TS y Ag HP10 en las muestras de LCR del cerdo 97.

Cerdos inoculados por vía Subaracnoidea (SA) a Dosis Alta (DA).

Cinco cerdos fueron inoculados SA con DA; se identificaron con los números 90, 93, 95, 96 y 98.

Cerdo 90.

a) Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC. En la revisión del SNC no se observaron estructuras parasitarias y tampoco lesiones sugerentes a la implantación de los metacestodos de *Taenia solium*.

b) Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero. El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijó en 0.41nm. Los

valores de DO de las muestras de suero permanecieron por debajo del valor umbral. El valor umbral para la detección de antígeno HP10 fue de 2.33nm, los valores de DO de las muestras de suero se mantuvieron por debajo del valor umbral. **Figura 28.**

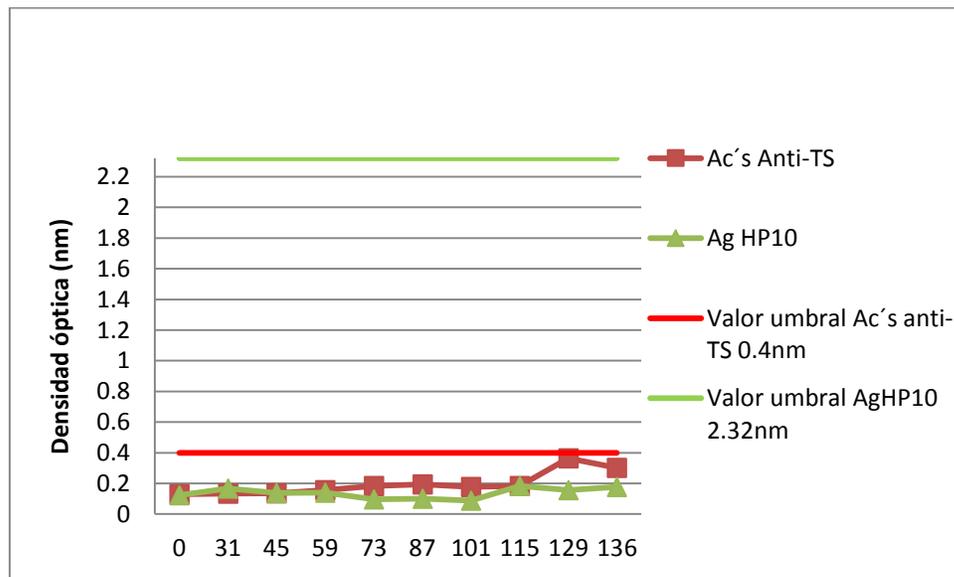


Figura 28. Títulos de Ac's anti- TS y AgHP10 en las muestras de suero del cerdo 90.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AhHP10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de 0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10; con un valor umbral de 1.13nm. **Figura 29.**

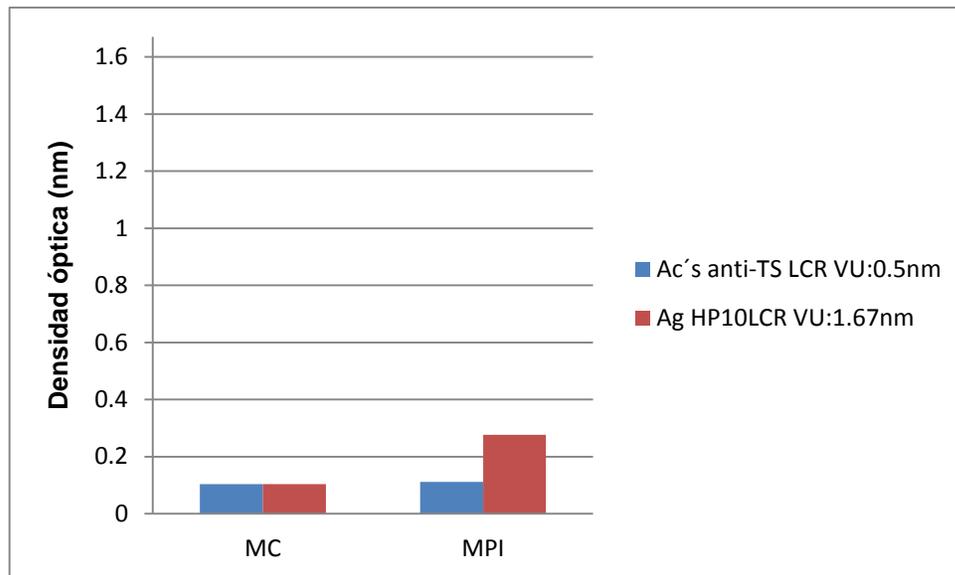


Figura 29. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 de las muestras de LCR del cerdo 90.

Cerdo 93.

El cerdo 93 se inoculo con una DA, SA de 2500 oncosferas; además presentó complicaciones postquirúrgicas al infectarse el área de la incisión, la secreción purulenta que se produjo penetró por el orificio de la craneotomía y afecto al encéfalo; la respuesta inflamatoria que se originó concluyó con la formación de un absceso que comprimió gran parte del hemisferio izquierdo y afecto al ventrículo lateral; esta condición desencadenó una serie de signos neurológicos, principalmente ataxia y paresia de los miembros pélvicos. Se lograron obtener 3 muestras de suero y la muestra de LCR se extrajo a los 30 días al momento de realizar la eutanasia al cerdo; después se extrajo el SNC para realizar el estudio macroscópico y microscópico.

a) **Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** Se realizaron los cortes transversales de encéfalo y médula espinal. A nivel del lóbulo parietal era posible apreciar los daños ocasionados por la diseminación de la infección a través del ventrículo lateral; el cual se encontraba lleno por un material caseoso originado por la consolidación del absceso. En el sitio de inoculación se puede apreciar el daño causado al parénquima encefálico y el ventrículo lateral del hemisferio izquierdo; por arriba del absceso se aprecia una pequeña cavidad de 2mm de largo por 0.5mm de ancho; se recorta el área donde se encuentra esta cavidad se procesa para histopatología y se observa al microscopio para su evaluación. **(Figura 30).**

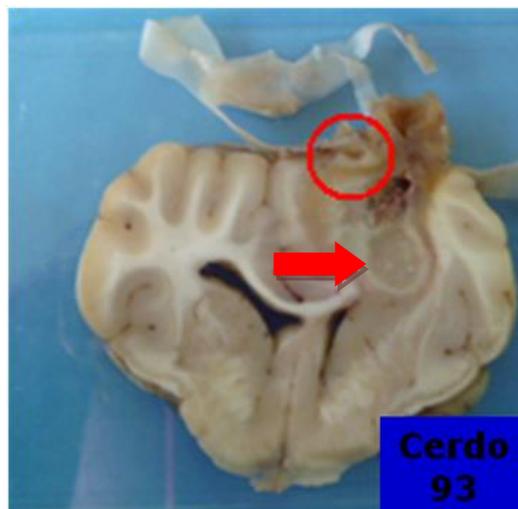


Figura 30. Corte transversal del encéfalo del cerdo 93 a nivel del sitio de inoculación.

Se observa el absceso que se formó a partir de la infección, (Flecha roja). En el interior del círculo rojo se observa una pequeña cavidad que corresponde al sitio donde se implantó un metacestodo. El tamaño de la cavidad es de 0.2cm x0.05cm. El cisticerco pudo ser visible a partir de los 30 días postinfección.

b) Estudio histopatológico. La revisión al microscopio del área afectada permitió observar el tegumento y el escólex de un metacestodo en estado vesicular, **(Figura 31)**. La respuesta inflamatoria asociada a la implantación del parásito se caracterizó por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y se clasificó en grado III, de acuerdo con Aluja y Vargas, **(Figura 32)**.

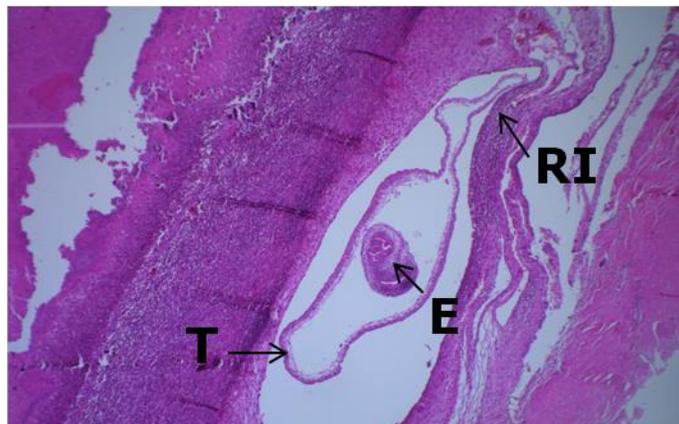


Figura 31. Metacestodo en estado vesicular encontrado en el encéfalo del cerdo 93. Se observa el tegumento (T) y el escólex (E). El estado del parásito es vesicular. Se puede observar un área con intensa respuesta inflamatoria (RI). H/E. (10x).

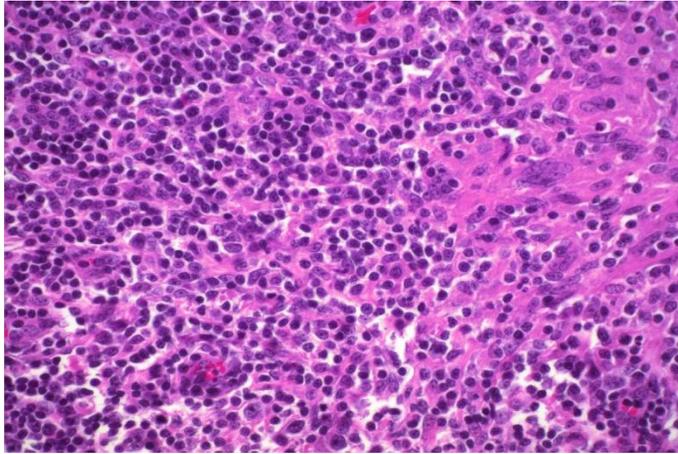


Figura 32. Respuesta inflamatoria asociada al metacestodo de *Taenia solium*, encontrado en el encéfalo del cerdo 93.

Se caracteriza por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. La RI se clasificó en grado III. H/E (40x).

c) Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero y LCR.

Las pruebas para detectar anticuerpos anti- *Taenia solium* y antígeno HP10 en suero y LCR resultaron negativas. Los valores de Ac's en las tres muestras de suero fueron 0.119, 0.1355 y 0.1385nm, (**Figura 33**). Los títulos de AgHP10 en suero fueron 0.183 y 0.1995nm. Los valores de Ac's en LCR fueron 0.151nm y AgHP10 en LCR fueron 0.125nm. **Figura 34.**

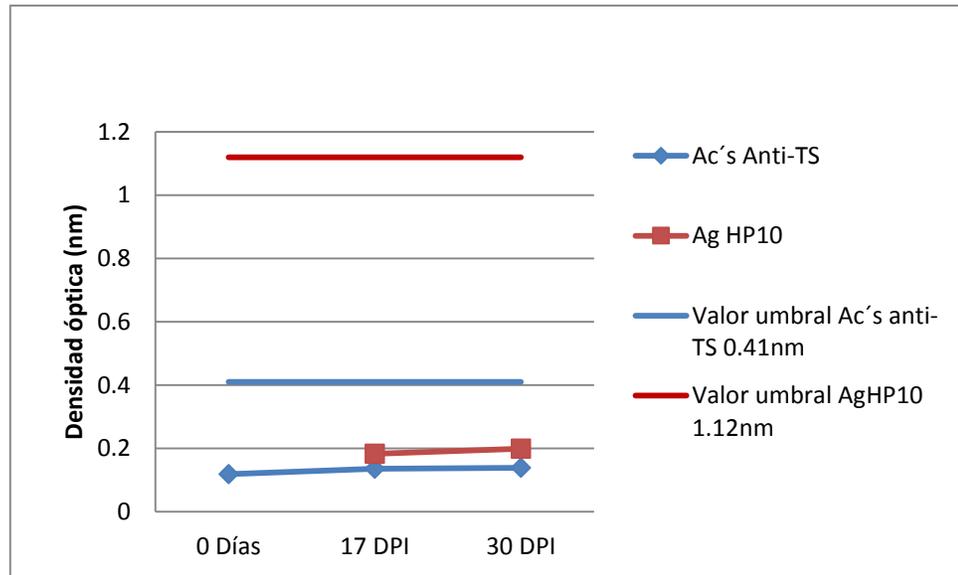


Figura 33. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 93.

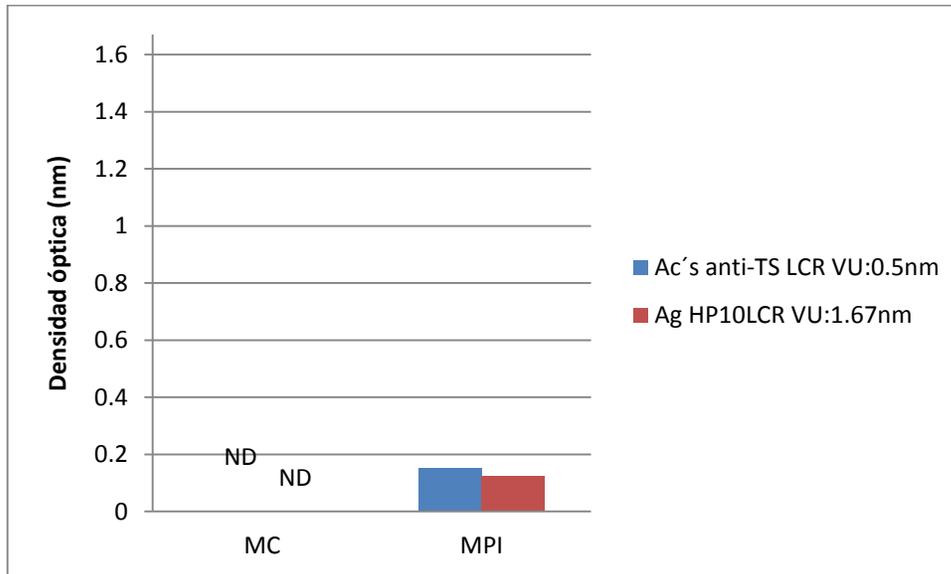


Figura 34. Valores de Ac's anti-TS y AgHP10 en el LCR del cerdo 93.

Cerdo 95.

a) Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC. En la revisión del encéfalo y médula espinal no se observaron estructuras parasitarias y tampoco lesiones sugerentes a la implantación de los metacestodos de *Taenia solium*.

b) Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero. El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijó en 0.41nm. El cerdo 95 comenzó a presentar títulos positivos de anticuerpos a partir del sexto muestreo, 72 días postinfección y se mantuvo así hasta el noveno muestreo; el decimo muestreo presentó títulos negativos para la presencia de anticuerpos. Los valores de DO para los muestreos fueron los siguientes: 0.5865nm, 0.789nm, 0.563nm y 0.409nm. Los valores de DO de las muestras de suero se mantuvieron por debajo del valor umbral de 1.12nm, por lo que fueron negativas a la presencia del antígeno HP10.

Figura 35.

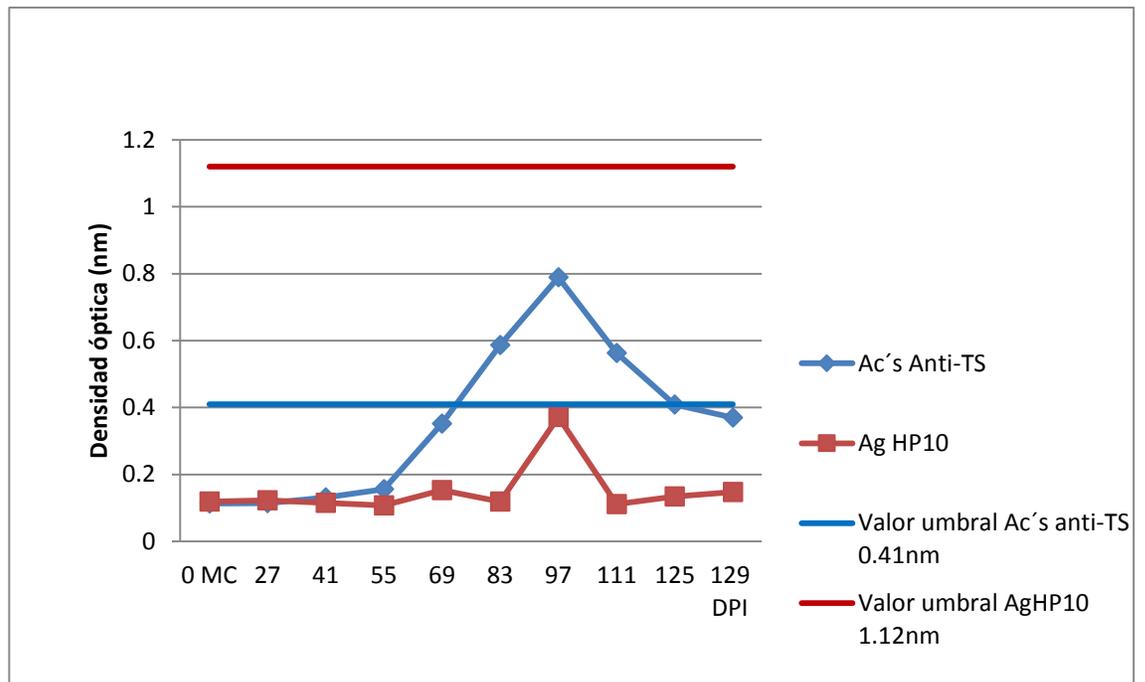


Figura 35. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 95.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de 0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10; con un valor umbral de 1.67nm. **Figura 36.**

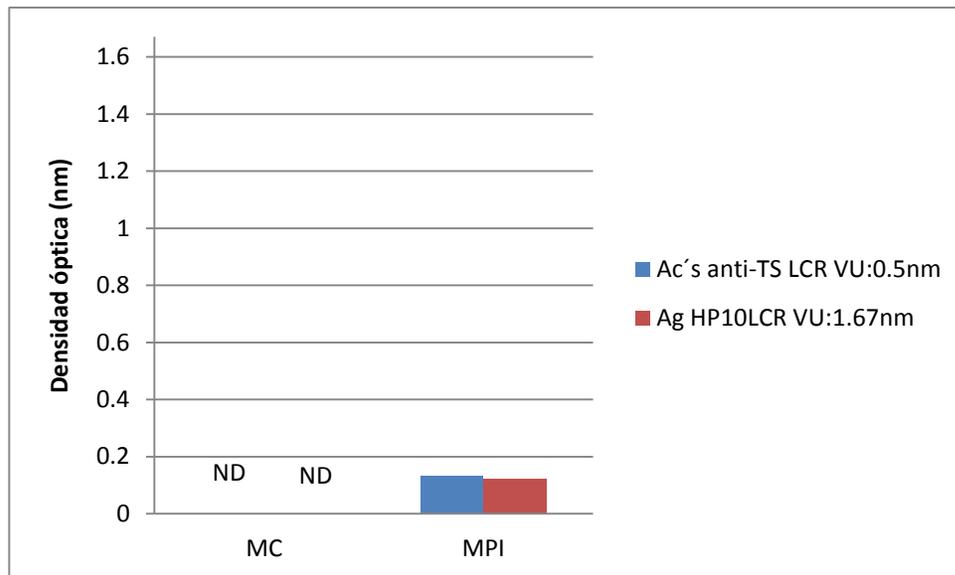


Figura 36. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 de las muestras de LCR del cerdo 95.

Cerdo 96.

- a) **Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** En la revisión del SNC no se observaron estructuras parasitarias y tampoco lesiones sugerentes a la implantación de los metacestodos de *Taenia solium*.
- b) **Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero.** El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijó en 0.41nm. El cerdo 96 presentó títulos positivos en el cuarto muestreo con una DO de 0.4145nm. Los valores de DO de las muestras de suero se mantuvieron por debajo del valor umbral de 1.12nm, por lo que fueron negativas a la presencia del antígeno HP10. **Figura 37.**

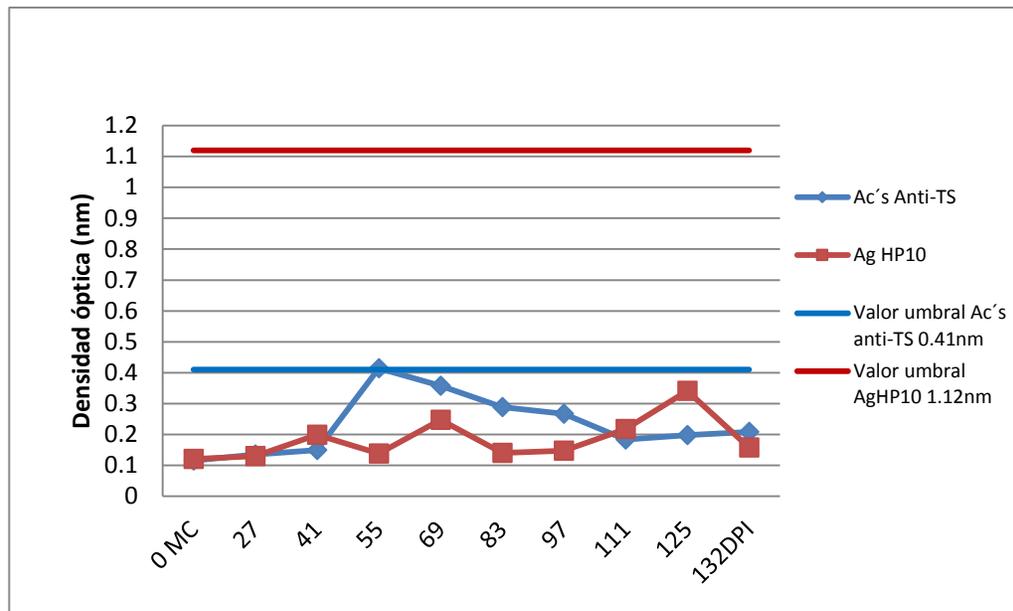


Figura 37. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 en las muestras de suero del cerdo 96.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de 0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10; con un valor umbral de 1.67nm. **Figura 38.**

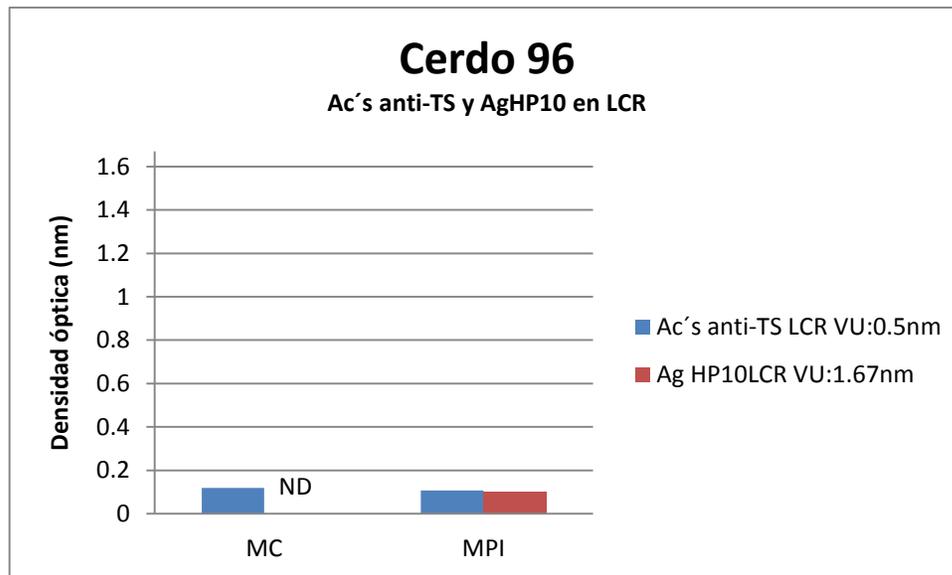


Figura 38. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 en el LCR del cerdo 96.

Cerdo 98.

- a) **Estudio macroscópico para la localización de metacestodos de *Taenia solium* en el SNC.** En la revisión del SNC no se observaron estructuras parasitarias y tampoco lesiones sugerentes a la implantación de los metacestodos de *Taenia solium*.
- b) **Detección de anticuerpos anti *Taenia solium* y AgHP10 en suero.** El valor umbral de DO para determinar a una muestra de suero como positiva a la presencia de anticuerpos anti-*Taenia solium* se fijó en 0.43nm. Los valores de DO de las muestras de suero permanecieron por debajo del valor umbral. Los valores de DO de las muestras de suero se mantuvieron por debajo del valor umbral de 1.13nm, por lo que fueron negativas a la presencia del antígeno HP10. **Figura 39.**

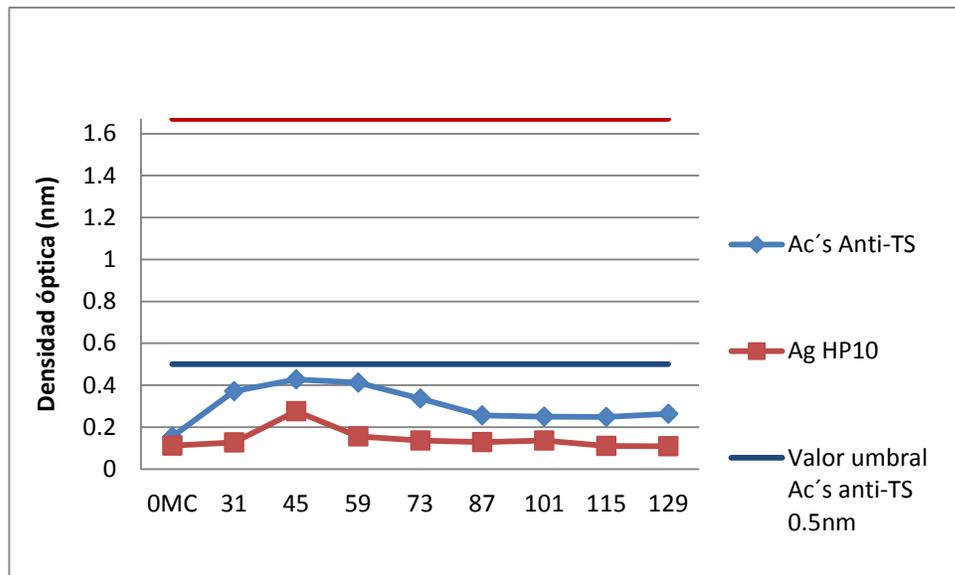


Figura 39. Títulos de Ac's anti-TS y AgHP10 de las muestras de suero del cerdo 98.

c) Determinación de anticuerpos anti- *Taenia solium* y AgHP10 en LCR.

La muestra de líquido cefalorraquídeo resultó negativa a la presencia de anticuerpos; el valor de la DO se mantuvo por debajo del valor umbral de 0.5nm. Las muestras de LCR resultaron negativas a la presencia del antígeno HP10; con un valor umbral de 1.67nm. **Figura 40.**

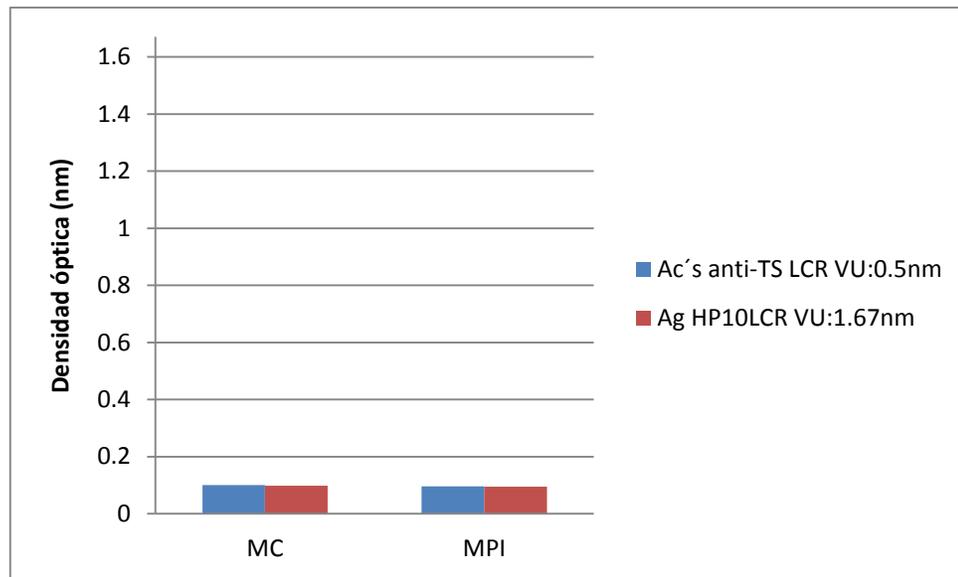


Figura 40. Títulos de Ac's y AgHP10 de las muestras de suero de LCR del cerdo 98.

Correlación de los resultados encontrados al estudio histopatológico con los resultados obtenidos en los estudio inmunológicos de Ac's anti-TS y de AgHP10.

Los resultados del estudio inmunológico reportaron que 7 de los 12 cerdos, es decir, el 58.33% de los animales presentaron títulos positivos a Ac's anti-TS en las muestras de suero; de los 7 animales positivos: dos fueron inoculados por vía IV a DB, (cerdos 89 y 100); un cerdo se inoculó por vía IV a DA, (cerdo 91); dos cerdos se inocularon por vía SA a DB, (cerdos 92 y 97) y dos cerdos se inocularon por vía SA a DA (cerdos 95 y 96). Los títulos positivos de anticuerpos comenzaron a aparecer entre el cuarto muestreo (55 DPI) y el octavo muestreo (115 DPI), siendo más frecuente encontrar los títulos positivos en el sexto muestro, entre los 83 DPI y los 108 DPI. El promedio de duración de la infección de los cerdos con

títulos positivos fue de 137.14 días. El promedio de días postinfección en el que se presentaron los títulos positivos de anticuerpos fue de 89.85 días. **Cuadro 2.**

Las muestras de suero de tres de los 12 cerdos (25%), presentaron títulos positivos a la presencia de AgHP10, en una ocasión por animal. El cerdo 100 presentó títulos positivos en el noveno muestreo, a los 140DPI; el cerdo 94 presentó valores positivos en el quinto muestreo, a los 94 DPI y el cerdo 97 los presentó al octavo muestreo a los 136DPI. **Cuadro 3.**

Las muestras de LCR de los doce cerdos fueron negativas a la presencia de Ac's anti-TS.

El estudio de la presencia de antígeno HP10 en LCR solo presentó a un animal como positivo (cerdo 94) con un índice del 8.33% con base en los 12 animales estudiados. **Cuadro 4.**

El cerdo 93 presentó un metacestodo a escasos 30 días después de la inoculación; se le tuvo que practicar la eutanasia por complicaciones posquirúrgicas; presentó títulos negativos de Ac's anti-TS y AgHP10 en suero y LCR; lo que se atribuye a la etapa temprana a la que tuvo que ser eliminado del estudio, por lo que no tuvo tiempo de generar una respuesta inmunológica de tipo humoral que se manifestara por títulos positivos de anticuerpos; considerando que los animales que fueron positivos a anticuerpos, lo hicieron en un rango de 55 a 115 días después de la infección. **Cuadro 4.**

El cerdo 91 presentó un metacestodo en etapa vesicular; lo que se puede correlacionar con los títulos positivos de anticuerpos a partir de los 73 DPI. Las muestras de LCR fueron negativas a Ac's anti-TS y AgHP10. **Cuadro 4.**

El cerdo 94 no presentó anticuerpos en suero y LCR; pero fue positivo para los títulos de antígeno HP10 en ambas muestras. Estos resultados se correlacionan positivamente con la localización de un metacestodo en etapa coloidal (se encontró en un estado de degeneración con una respuesta inflamatoria grado 4. **Cuadro 4.**

ID cerdo	Vía de inoculación	Dosis infectiva	Duración de la infección (Días)	muestreo (+) a Ac's anti-TS	DPI
89	IV	DB	136	6	87
100	IV	DB	140	6	108
91	IV	DA	139	5	73
92	SA	DB	141	8	115
97	SA	DB	143	6	108
95	SA	DA	129	6	83
96	SA	DA	132	4	55
		Promedio	137.14		89.85

Cuadro 2. Cerdos con títulos positivos de Ac's anti-TS en suero.

ID cerdo	Vía de inoculación	Dosis infectiva	duración de la infección (Días)	Muestreo (+) a AgHP10	DPI
94	IV	DA	139	5	94
97	SA	DB	143	8	136
100	IV	DB	140	9	140

Cuadro 3. Cerdos con títulos positivos a AgHP10 en suero.

ID cerdo	Vía inoculación/dosis oncosferas	Ac's anti-TS suero	Ac's anti-TS LCR	AgHP10 suero	AgHP10 LCR	Presencia de metacestodo
91	IV/DA (1000-1500)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
93	SA/DA (2500)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
94	IV/DA (1000-1500)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

Cuadro 4. Cerdos en los que se implantó y se desarrolló un metacestodo de *Taenia solium*.

Discusión y conclusiones.

En el desarrollo de modelos de cisticercosis se han probado diferentes alternativas de infección; entre ellas destaca la infección con huevos o proglótidos de *Taenia solium* por vía oral, la inoculación por vía intravenosa de oncosferas activadas artificialmente; así como la infección por vía intraperitoneal, las cuales arrojan diferentes resultados en la implantación y desarrollo de metacestodos; por ejemplo para la infección por vía oral realizada por Santamaría, et al²⁵; en la que se requirieron entre 10,000 y 100,000 huevos de *Taenia solium* para obtener un promedio de 392.1 metacestodos en un rango de 19 a 882 parásitos por cerdo; sin embargo, este modelo de cisticercosis presenta la dificultad de que los metacestodos se implantaran de manera aleatoria en el organismo animal, sin garantizar que lleguen al sistema nervioso central, por lo que no se puede considerar como un modelo útil de Neurocisticercosis. Verástegui, et al²⁸, experimentó con la inoculación de oncosferas de *Taenia solium* activadas de manera artificial, utilizando diferentes vías de infección: intraperitoneal, intravenosa e intraduodenal; donde la vía intraperitoneal resultó ser más efectiva en cuanto a la obtención de cisticercos viables en músculos intercostales, cuartos

traseros y lengua. En este experimento infectaron a cuatro cerdos por vía intraperitoneal; de los cuales, dos animales fueron inoculados con 6,000 oncosferas, obteniendo una cosecha de 30 y 35 metacestodos viables y un porcentaje de evaginación de 67 y 87%. Los otros dos cerdos fueron inoculados con 15,000 oncosferas, obteniendo una cosecha de 22 y 35 metacestodos viables y un porcentaje de evaginación de 76 y 85%. En la vía intravenosa utilizaron a dos cerdos con una dosis infectiva de 6,000 oncosferas; se obtuvo una cosecha de 17 y 52 parásitos, de los cuales, 17 cisticercos ya estaban degenerados; se obtuvo un porcentaje de evaginación de 20-61%. Con la vía intraduodenal no se obtuvieron resultados, ya que no se encontraron metacestodos. Verástegui, et al²⁸, observa que los cerdos que fueron infectados por vía intraperitoneal, fueron inoculados de manera accidental en los músculos abdominales, obteniendo el desarrollo de metacestodos en esta área, por lo que prueba con esta nueva vía para estandarizar un modelo de cisticercosis porcina, utilizando a dos cerdos, a los que se les inocularon por vía intramuscular diferentes dosis de oncosferas a lo largo del eje cráneo caudal. Se incrementaron las dosis de 250 oncosferas en el cuello hasta 2500 parásitos en la pierna; con este experimento se determinó que la infección es más efectiva cuando se utilizan dosis iguales o mayores a 2000 oncosferas, además las tasas de implantación estuvieron en un rango de 1.95% a 2.76%.

La intención de nuestro estudio fue estandarizar un modelo de NCC porcina para conocer los fenómenos asociados a la enfermedad y tener la posibilidad en un

futuro de establecer nuevos tratamientos, que a diferencia del modelo de cisticercosis donde la infección es oral, pueda ofrecernos la certeza de que los parásitos se implanten en el SNC, utilizando la experiencia previa de Verástegui con la inoculación intramuscular de las oncosferas activadas. El estudio que realizamos concuerda con los estudios previos, en que se requieren dosis elevadas de oncosferas para que asegure el éxito de la implantación y desarrollo de los metacestodos de *Taenia solium*, pues como se observó, los tres cerdos que presentaron el desarrollo de un metacestodo, fueron inoculados con dosis en un rango de 1000 a 2500 oncosferas; aunque la tasa de implantación se encontró en un rango de 0.04 a 0.06%; en contraste con lo descrito por Verástegui en el modelo de cisticercosis muscular, donde las tasas de implantación se encontraron entre 1.95 y 2.76%.

Los principales puntos que resaltar son:

1. Las oncosferas activadas de *Taenia solium* lograron desarrollarse hasta la etapa de metacestodo cuando se inocularon directamente en el SNC en 3 de 12 animales. La tasa baja de implantación se puede atribuir a diferentes causas; entre las principales esta la probabilidad de que la viabilidad de las oncosferas fue baja a consecuencia de las 4 semanas que permaneció la *Taenia solium* en refrigeración; se tomó en cuenta el estudio realizado por lima et al³² donde se demostró que los huevos de *Taenia solium* se pueden mantener viables en SSF, en refrigeración a 4°C hasta por 4 meses. Otro factor importante es que se desconoce la edad del cestodo, lo que puede

influir en la capacidad de los parásitos para implantarse en el SNC; por lo que es recomendable realizar el experimento de manera inmediata a la obtención de la *Taenia solium*. Otra causa probable es la utilización de dosis menores a 2,000 oncosferas en un sitio privilegiado inmunológicamente, como lo es el SNC, por lo que es necesario utilizar dosis mayores a 2,000 oncosferas y diferentes sitios de inoculación para obtener tasas más altas de implantación y desarrollo de metacestodos; tal y como se realizó en el estudio hecho por Verástegui, et al, donde se utilizaron dosis mayores a 2,000 oncosferas; además de realizar las inoculaciones en diferentes masas musculares, obteniendo tasas de implantación entre 1.95% a 2.76%, en comparación con este estudio, donde la tasa máxima de implantación fue de 0.06%; por lo que se recomienda inocular a las oncosferas en diferentes puntos del SNC; también es necesario evaluar otros métodos de activación de oncosferas que permitan obtener un mayor número de parásitos viables, para asegurar una mejor tasa de implantación.

2. En este estudio no se pudo determinar que vía de infección es la más adecuada para estandarizar el modelo de NCC; pues uno de los tres cerdos que presentó desarrollo parasitario fue inoculado por vía subaracnoidea, (cerdo 93) y dos fueron inoculados por vía intraventricular, (cerdo 91 y 94), número insuficiente para poder determinar cual vía es la más efectiva; además cabe destacar que los metacestodos no fueron encontrados en los ventrículos, como había sido la intención, sino en las áreas cercanas al sitio

de inoculación; lo que indica que probablemente llegaron ahí, al ser rechazadas por el flujo del LCR que lograba escaparse al momento de retirar la sonda de látex; pues la densidad de las oncosferas es menor a la del LCR y de la SSF; permitiéndoles flotar en ambas sustancias, lo que pudo facilitar su salida de los ventrículos.

3. En este estudio se observó que en la aplicación de dosis menores a 1000 oncosferas no se generó el desarrollo de metacestodos; por lo que en estudios posteriores se debe considerar el uso de dosis mayores a 1000 oncosferas.
4. La detección de anticuerpos anti *Taenia solium* en suero para señalar la presencia de cisticercos en el SNC presentó una sensibilidad del 0.58%, si se toma en cuenta la formula de sensibilidad= $a/(a+c)$ donde "a" corresponde al número de verdaderos positivos (7 cerdos) y "c" a los falsos negativos (5 cerdos); a partir de la premisa que todos los animales fueron sometidos a la infección y tuvieron contacto con los parásitos. De los 7 animales positivos a anticuerpos (cerdos: 91, 92, 95, 96, 97, 99 y 100); solo uno fue positivo a Neurocisticercosis (cerdo 91); por lo que se debe considerar que la presencia de anticuerpos solo indica que el individuo estuvo en contacto con el agente etiológico, pero no comprueba su presencia en el organismo. Las causas por las cuales solo 7 animales presentaron títulos de anticuerpos pueden ser varias, entre las cuales se encuentra la posibilidad de que el sistema inmunológico de los cerdos destruyó a las oncosferas montando una respuesta inmune de tipo celular

sin llegar a la formación de una respuesta humoral, con la consecuente formación de anticuerpos; otra causa podría ser los factores intrínsecos de las pruebas de laboratorio que nunca ofrecerán un 100% de sensibilidad y especificidad para diagnosticar enfermedades.

5. En este estudio se pudo destacar que la aparición de Anticuerpos anti-*Taenia solium* se encontró en un rango de 55 a 115 días postinfección, con un promedio de 89.85 días para su detección en suero.
6. La eficiencia en la detección de antígeno HP10 en suero y LCR, por ELISA fue baja, pues detectó a 1 de 3 cerdos infectados, es decir, el 33.33% (cerdo 94); hay que mencionar que el antígeno HP10 solo es liberado por los metacestodos en estado vesicular. La liberación de antígeno HP10 no se relacionó con la liberación de anticuerpos anti *Taenia solium*, en los animales infectados de este estudio, pues el único cerdo infectado que fue positivo al antígeno resultó negativo a la presencia de anticuerpos.
7. La implantación por vía intraventricular no se logro en este estudio debido a la dificultad de depositar a las oncosferas dentro del ventrículo, a consecuencia del flujo continuo del LCR, a través del orificio hecho por la sonda; así como a la diferencia de densidades entre las oncosferas y el LCR, que permite que los parásitos floten en la superficie. Para lograr la implantación por medio de esta vía, se puede sugerir el uso de una jeringa con una aguja que logre alcanzar la cavidad ventricular, en lugar de una sonda de látex de 5mm de diámetro, con la finalidad de disminuir el tamaño del orificio dejado en el parénquima así evitar, la salida del LCR; además se

recomienda el uso de técnicas quirúrgicas estereotácticas para conseguir una localización exacta de los ventrículos y poder depositar a los parásitos en su interior.

8. En este estudio no fue posible estandarizar el modelo de Neurocisticercosis porcina; sin embargo se pudo demostrar que si es posible el desarrollo de un modelo de metacestodos por medio de la inoculación directa de oncosferas activadas de *Taenia solium* en el SNC, por lo que es necesario realizar ajustes en la metodología y desarrollo de los experimentos para lograr el desarrollo del modelo de manera satisfactoria.

Referencias.

1. Scitutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette J P, Sotelo J, Aluja A, *et al.* *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*. 2000; 2: 1875-1890.
2. Sotelo J, Del Brutto O H. Brain Cysticercosis. *Archives of Medical Research*. 2000; 31: 3-14
3. Pawlowski Z, Allan J, Sartí E. Control of *Taenia solium* Teniasis/Cysticercosis from research towards implementation. *International Journal for Parasitology*, 2005;35:1221-1232.
4. Herrera G, Aluja A, Méndez A. El uso de la ultrasonografía para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. *Vet. Méx.* 2007; 38 (1):125-133.
5. Larralde C, Aluja A. (compiladores). *Cisticercosis. Guía para los profesionales de la salud.* Fondo de Cultura Económica, México 2006.
6. Cisneros MH. Estudio de las alteraciones del comportamiento y presentación de signos neurológicos en cerdos con neurocisticercosis, relacionados con la localización anatómica del metacestodo de *Taenia solium* en el sistema nervioso central: (tesis de licenciatura) México: Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ, 2010.
7. Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Carrillo-Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Scitutto E, Fragoso G. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 2003; 22:139-145.
8. Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yanez O, Pina J, Carrillo-Mezo R, Martinez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Scitutto E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:551-558.
9. Jimenez-Marcial ME, Velasquez-Perez L. Morbidity at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez, 1995-2001 *Gac Med Mex* 2004; 140:155-162.
10. Pérez V L, Jiménez M M. Mortalidad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurología "Manuel Velasco Suárez" (1995-2001).
11. Fleury A, García JM, Valdez AP, Sayve DM, Becerril RP, Larralde C, Scitutto E. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico.

12. J. Enseñat; R. Martínez-Mañas; J.P. Horcajada*; C. De Juan** y E. Ferrer. Dificultades diagnósticas y terapéuticas en la neurocisticercosis: presentación de 6 casos y revisión de la literatura.
13. Sáenz B, Ruíz-García M, Jiménez E, Hernández-Aguilar J, Suastegui R, Larralde C, Sciutto E, Fleury A. Neurocysticercosis: clinical, radiologic and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:801-803.
14. Colli BO, Carlotti CG Jr, Assirati JA Jr, Machado HR, Valenca M, Amato MC. Surgical treatment of cerebral cysticercosis: long-term results and prognostic factors. *Neurosurg Focus*. 2002;12:e3.
15. DeGiorgio CM, Houston I, Oviedo S, Sorvillo F. Deaths associated with cysticercosis. Report of three cases and review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2002 Jun 15;12(6):e2.
16. Rajkotia Y, Lescano AG, Gilman RH, Cornejo C, Garcia HH. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 14.
17. Gongora-Rivera F, Soto-Hernandez JL, Gonzalez Esquivel D, Cook HJ, Marquez-Caraveo C, Hernandez Davila R, Santos-Zambrano J. Albendazole trial at 15 or 30 mg/kg/day for subarachnoid and intraventricular cysticercosis. *Neurology* 2006, 66, 436-438.
18. Stanbury RM, Graham EM. Systemic corticosteroid therapy--side effects and their management. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 704-708.
19. Mitre E, Talaat KR, Sperling MR, Nash TE. Methotrexate as a corticosteroid-sparing agent in complicated neurocysticercosis. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 549-553.
20. Plumb CD. Manual de farmacología veterinaria. 5ª edición. Intermédica. Argentina. 2006.
21. Diazgranados-Sánchez JA, Barrios-Arrázola G, Costa JL, Burbano-Pabon J, Pinzón-Bedoya J. Ivermectin as a therapeutic alternative in neurocysticercosis that is resistant to conventional pharmacological treatment. *Rev Neurol*. 2008;46(11):671-4
22. Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin. Immunol*. 2005, 116, 271-278.

23. Alvarez JI, Londoño DP, Alvarez AL, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis. J Comp Pathol. 2002 Aug-Oct;127(2-3):186-93.
24. Londoño DP, Alvarez JI, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. Vet Parasitol. 2002;109:249-59.
25. Santamaría E, Plancarte A, de Aluja AS. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of establishment. J Parasitol. 2002;88:69-73.
26. Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, Teale JM. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. J Immunol. 1999;162(2):995-1002.
27. Yang X, Xu H, Cao Z, Wang W. Establishment of mouse model for Cysticercosis cellulosae. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 1994;12(4):297-9.
28. Verástegui M, González A, Gilman RH, Gavidia C, Falcón N, Bernal T, Garcia HH. Experimental infection model for *Taenia solium* cysticercosis in swine. Cysticercosis Working Group in Peru. Vet Parasitol. 2000 Dec 20;94(1-2):33-44.
29. Wang CI, Ma XY, Kuo KC, Fan CP. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs. Int J Parasitol 1997(27):1311-1314.
30. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response A.S. de Aluja a,* A.N.M. Villalobos a, A. Plancarte b, L.F. Rodarte a, M. Hernfindez c, E. Sciutto c
31. Aluja S, Vargas G. the histopathology of porcine cysticercosis. Veterinary parasitology. 1988 (28):65-77.

32. Lima M, Tapia P, Aluja S, Callejas R. Viabilidad morfométrica de los huevos de *Taenia solium* in vitro. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=MX1998000419>