

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE QUIMICA

CISTICERCOSIS MURINA POR *Taenia crassiceps*: MEDIACION DE LAS  
GONADAS Y DEL SISTEMA INMUNE EN LA DIFERENCIA DE SUSCEPTIBILIDAD  
ASOCIADA AL SEXO.

Tesis presentada por  
LEONOR HUERTA HERNANDEZ  
para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Dr. Carlos Larralde  
Director

Biól. Leonor Huerta Hernández  
Tesisista

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Inmunología del  
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Jurado:

Presidente  
1er. vocal  
Secretario  
Suplente  
Suplente

Dr. Jorge Vázquez  
Dr. Carlos Valverde  
Dra. Irma Bernal  
Dr. Raúl Mancilla  
Dr. Rafael Lamothe

00562  
4  
24°

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. ARTICULO: "Immunological mediation of gonadal influence on experimental murine cysticercosis ( <u>Taenia crassiceps</u> )". Huerta L., Terrazas I., Scitutto E., Lomeli C., Montoya R.M., Díaz M.L., Govezensky T., and Larralde C. (enviado a publicación al <u>Journal of Parasitology</u> ).	12
IV. RESULTADOS ADICIONALES	39
Material y Métodos	40
Resultados y Discusión	46
1. Efecto del suero fetal de bovino sobre los cisticercos <u>in vitro</u> .	46
2. Efecto de hormonas sexuales (estrógeno y testosterona) sobre el desarrollo de los cisticercos <u>in vitro</u> .	47
3. Efecto de la densidad de parásitos sobre su crecimiento <u>in vitro</u> .	55
4. Efecto de la irradiación del cuerpo total del ratón sobre el sistema inmune.	62
5. Efecto de las gónadas sobre el reconocimiento de antígenos del cisticerco por el suero de ratones infectados.	65
V. DISCUSION GENERAL	75
VI. CONCLUSIONES	80
VII. APENDICES	81
APENDICE 1. Cisticercosis murina causada por <u>Taenia crassiceps</u> . Aspectos biológicos e inmunológicos.	81
APENDICE 2. Susceptibilidad a infecciones parasitarias asociada al sexo del hospedero.	94
VIII. REFERENCIAS	105

## RESUMEN

En la presente investigación se ha abordado el estudio del papel del sexo del hospedero en la determinación de la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina por el metacéstodo de la Taenia crassiceps.

Los ratones hembras de la cepa Balb/c son más susceptibles a la infección experimental que los ratones machos. Aquí se demuestra que la gonadectomía tiende a igualar la susceptibilidad entre los sexos, al reducir a la mitad el promedio de la carga parasitaria de las hembras y triplicar el de los machos. In vitro, las hormonas sexuales (17  $\beta$ -estradiol, testosterona y progesterona) no afectan la reproducción ni el crecimiento de los cisticercos. El efecto de la gonadectomía solo se manifiesta en presencia del sistema inmune íntegro y no así en ratones irradiados. Por lo tanto, el efecto gonadal sobre la susceptibilidad a la cisticercosis está mediado principalmente por el sistema inmune y no por efectos directos de las hormonas sexuales sobre los parásitos. La inmunodepresión del sistema inmune por irradiación propicia la elevación de la carga parasitaria sólo en los machos intactos y en las hembras gonadectomizadas. Se propone un sistema de interacciones gónadas- sistema inmune en el cual los factores ováricos inhiben los eventos inmunológicos que participan en el ataque al cisticerco y los factores testiculares los estimulan. En dicho esquema se incluye un efecto promotor del crecimiento parasitario provocado por los parásitos mismos, aspecto estudiado en esta investigación en forma preliminar. También, como en estudios previos (Sciutto et al., 1990), nuestros resultados indican que los anticuerpos no tienen un papel relevante en la protección de los ratones contra la cisticercosis por T. crassiceps, aunque si bien en el presente estudio se reveló que las gónadas influyen en el reconocimiento de antígenos del cisticerco por el suero de ratones infectados.

## II. INTRODUCCION

El trabajo presentado en esta tesis corresponde a la investigación de las causas que originan la diferencia de susceptibilidad entre los ratones hembras y machos a la cisticercosis experimental causada por el metacéstodo de la Taenia crassiceps. Los ratones hembra exhiben hasta cuatro veces mayor susceptibilidad que los machos, midiéndose la susceptibilidad como la cantidad de cisticercos desarrollados en los ratones después de cierto tiempo de haber sido inoculados con la misma cantidad inicial de cisticercos (Sciutto et al., 1990).

Nuestro interés en el estudio de la susceptibilidad asociada al sexo en la cisticercosis murina obedece a tres razones fundamentales:

1. La influencia del sexo del hospedero sobre la susceptibilidad a enfermedades parasitarias se reconoce ampliamente en la actualidad como factor participante en la relación hospedero-parásito (Ver Apéndice 2). Sin embargo, la investigación de las causas de este fenómeno no ha recibido la atención suficiente para explicarla.

2. La cisticercosis peritoneal causada por los metacéstodos de la Taenia crassiceps en ratones, es un modelo experimental que ofrece facilidad de manejo de los organismos empleados y control de las características tanto de los parásitos como de los ratones, permitiendo la exploración sistemática de los factores involucrados en la determinación de la susceptibilidad.

3. La cisticercosis murina causada por Taenia crassiceps, a diferencia de otros modelos de cisticercosis en roedores, muestra similitudes estructurales, morfológicas e inmunológicas con la cisticercosis humana y porcina. Estas semejanzas se han estudiado recientemente con mayor profundidad (Larralde et al., 1989; Sciutto et al., 1990). Por lo tanto, las conclusiones derivadas de este trabajo pueden ser de utilidad para entender la enfermedad tal como se manifiesta en cerdos y en humanos, en los cuales muestra características muy complejas.

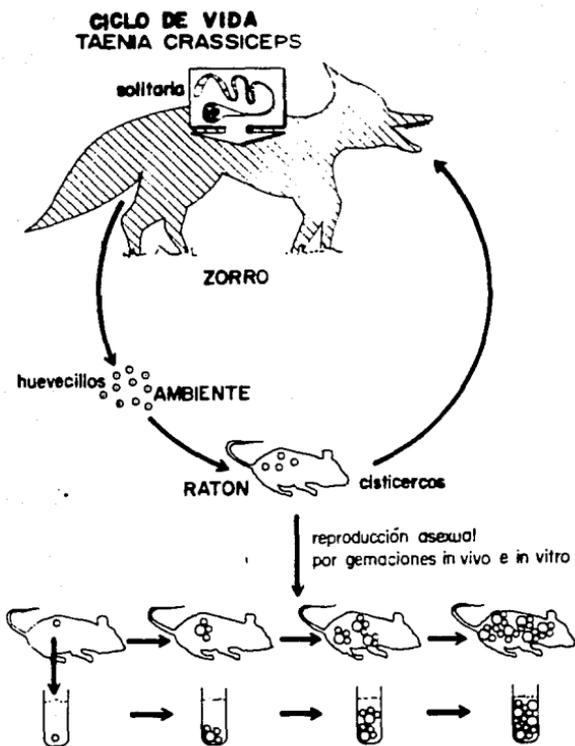


Figura 1. Ciclo de vida de Taenia crassiceps.

El cisticerco se desarrolla en la cavidad abdominal de roedores, los cuales adquieren la infección por ingestión de huevecillos dispersos en el medio ambiente provenientes de heces de cánidos infectados con la tenia adulta. Dentro del roedor (y también in vitro), los huevecillos se convierten en cisticercos que tienen la capacidad de reproducirse por gemación en forma presuntamente asexual. Cuando un roedor con cisticercosis es devorado por un predador cánido, los cisticercos se instalan en el intestino de éste y se desarrollan en la forma adulta. Al alcanzar la madurez sexual, la tenia produce huevecillos infectivos, cerrando de este modo el ciclo de vida del parásito.

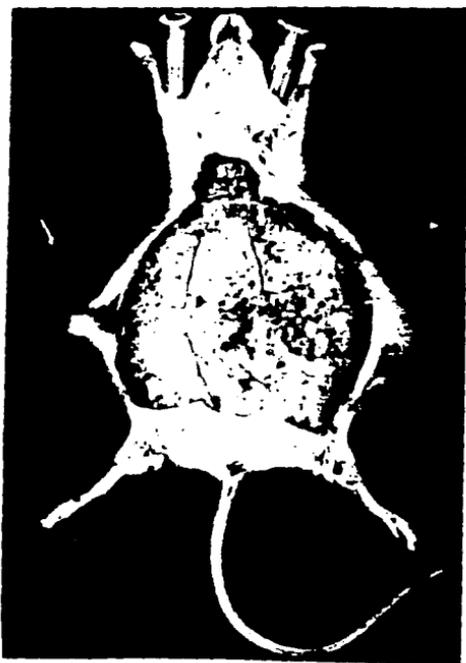


Figura 2. Ratón con infección peritoneal avanzada.

Una vez instalados en la cavidad abdominal, los cisticercos se reproducen hasta ocupar todo el espacio disponible sin comprometer la vida del hospedero. En la foto se muestra a un ratón con una infección de 12 meses.

## Cisticercosis murina por *T. crassiceps*: un modelo experimental.

El metacéstono (cisticerco) de *T. crassiceps* causa una infección de naturaleza crónica, durante la cual el parásito se multiplica constantemente sin afectar la sobrevivencia del hospedero. El ciclo de vida de este parásito se muestra en la figura 1 y los aspectos biológicos e inmunológicos del desarrollo de la larva se revisan en el Apéndice 1.

Inoculando cisticercos directamente en la cavidad peritoneal de un ratón se producen centenares de parásitos libres al cabo de algunas semanas (fig. 2). Este procedimiento de propagación de la enfermedad en animales de laboratorio se ha usado ampliamente para fines experimentales. La evaluación de la enfermedad se puede realizar recuperando los cisticercos de la cavidad peritoneal y contando directamente su número o volumen. Adicionalmente, los cisticercos pueden cultivarse in vitro con facilidad.

### Influencia del sexo.

Desde los estudios tempranos de Freeman (1962) y Culbreth y col. (1972) se supo que los ratones hembra son más susceptibles que los machos a infecciones por *T. crassiceps*, adquiridas ya sea por ingestión de huevecillos o bien por inoculación de los metacéstonos en la cavidad abdominal. Observaciones similares se realizaron posteriormente también en ratas (*Rattus norvegicus*) (Blair y Campbell, 1976). Recientemente, y como se resume en la Tabla 1, la diferencia de susceptibilidad asociada al sexo se consolidó con las observaciones de Scitutto y col. (1991a) en las cuales los ratones hembras se mostraron más susceptibles independientemente de la variedad de parásito utilizada, de la susceptibilidad genética de la cepa de ratones o de la duración de la infección (30 y 60 días). Las enfermedades parasitarias muestran, en general, mayor desarrollo en los machos que en las hembras (Apéndice 2), en este contexto, la cisticercosis murina por *T. crassiceps* es un caso de excepción.

En el caso de la cisticercosis humana, existen estudios que señalan una relación entre el sexo del hospedero y la frecuencia

TABLA 1. Cisticercosis experimental murina. Susceptibilidad asociada al sexo independientemente de la variedad del parásito y de la cepa de ratón utilizada.<sup>1</sup>

SEXO	CEPA DE RATON	HAPLOTIPO <sup>1</sup>	DIAS DE INFECCION	VARIEDAD <sup>2</sup>	
				ORF X ± D.S.	HYG X ± D.S.
	Balb/c	(H-2d)	30 días	138.3 ± 13	29.4 ± 9.5
			60 días	658.3 ± 117	221.4 ± 46
	Balb/K	(H-2k)	30 días	54.2 ± 23.3	3.0 ± 0.6
			60 días	461.8 ± 81.0	66.6 ± 26
	Balb/B	(H-2b)	30 días	52.1 ± 17.8	4.0 ± 1.2
			60 días	327.4 ± 83.8	98.5 ± 20
	C57BL/6J	(H-2b)	30 días	46.2 ± 20.7	0.0 ± 0.0
			60 días	498.1 ± 89.7	24.1 ± 10
-----					
	Balb/c	(H-2d)	30 días	18.8 ± 4.6	2.4 ± 0.9
			60 días	306.4 ± 42.2	34.1 ± 8.0
	Balb/K	(H-2k)	30 días	1.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0
			60 días	94.0 ± 41.0	0.1 ± 0.1
	Balb/B	(H-2b)	30 días	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
			60 días	6.3 ± 6.2	0.0 ± 0.0
	C57BL/6J	(H-2b)	30 días	5.5 ± 1.0	0.0 ± 0.0
			60 días	151.2 ± 31.2	0.0 ± 0.0

<sup>1</sup> Se muestra el promedio ± la desviación estándar (x ± DS) del número de parásitos recuperados de la cavidad peritoneal de grupos de 10 ratones hembras y machos de diferente cepa, inoculados con 10 metacístodos de *T. crassiceps* de las variedades ORF e HYG. (Tomado de Sciuotto *et al.*, 1990).

<sup>2</sup> Las cepas de ratones probadas únicamente difieren en la composición de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

<sup>3</sup> La variedad HYG posee un escólex (cabeza) completo, mientras que la variedad ORF solamente posee un escólex rudimentario.

de la enfermedad. En 20,206 autopsias practicadas la Unidad de Patología de la UNAM y en el Hospital General de México, se identificaron 481 casos de cisticercosis (2.38%), de los cuales el 58.42% correspondió al sexo masculino y el 41.58 al sexo femenino (Villagrán-Urjbe y Olivera-Rabiela, 1989). Otros estudios muestran cifras semejantes (57% hombres, 43% mujeres) (Rabiela, 1989). Por otra parte, la intensidad de la reacción inflamatoria contra los cisticercos que se alojan en el parénquima cerebral es más severa en las mujeres jóvenes (Del Brutto et al., 1988).

Dado que las hormonas sexuales tienen una gama amplia de efectos que modifican la constitución fisiológica y bioquímica de tejidos muy diversos, la identificación de las causas del dimorfismo sexual en la susceptibilidad puede ser compleja. La causa más invocada es la influencia gonadal sobre el aparato inmunocompetente del hospedero, el cual a su vez actúa para limitar el desarrollo de la infección.

Los estudios respecto al efecto de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune conforman un cuadro general que aún es complejo e incompleto (Apéndice 2), pero las evidencias disponibles indican que el estrógeno mejora los fenómenos de inmunidad humoral e inhibe los de inmunidad mediada por células, mientras que los andrógenos y la progesterona tienden a suprimir ambos tipos de respuesta (Grossman, 1984). Por otra parte, se ha observado que el sistema inmune de las hembras tiene mayor capacidad de reaccionar contra elementos extraños o alterados, que el de los machos (Apéndice 2).

Lo anterior se puede aplicar a muchos de los casos de enfermedades parasitarias en los cuales las hembras son las menos susceptibles, pero no en los casos contrarios. Es posible que la manera en que se manifiestan los efectos de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune, sean variables dependiendo de las condiciones de la infección. Por ejemplo, en el caso de las enfermedades parasitarias, a diferencia de lo que sucede en otros tipos de infección por bacterias y virus, la enorme masa del parásito ofrece al sistema inmune una superficie no fagocitable y, en consecuencia, este mecanismo de defensa no interviene de igual manera.

### CICLO DE VIDA TAENIA SOLIUM

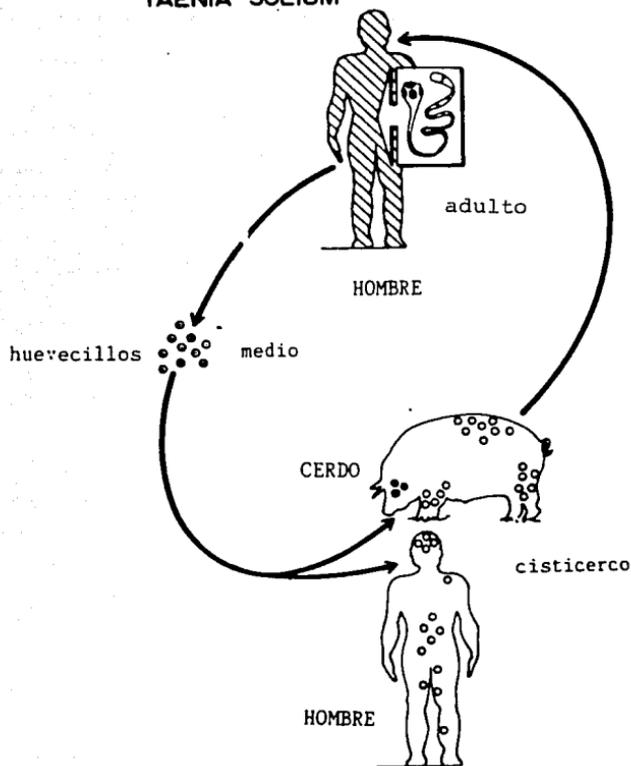
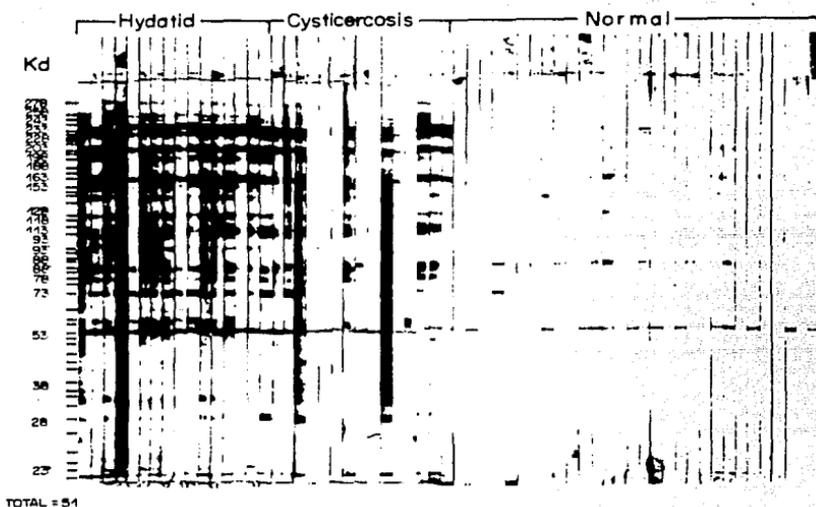


Figura 3. Ciclo de vida de Taenia solium.

Cuando el hombre come carne de cerdo infectada con cisticercos, éstos llegan al intestino delgado y se desarrollan a la forma adulta (tenia). Por reproducción sexual, la tenia produce millones de huevecillos que son expulsados al medio junto con las heces del hombre. La disposición inadecuada de las heces causa la diseminación de los huevecillos en el medio, los cuales pueden ser ingeridos por el hombre o por el cerdo. La ingestión de los huevecillos causa el desarrollo de cisticercos en diferentes tejidos orgánicos. En humanos la cisticercosis es causada por el establecimiento de la larva de la T. solium principalmente en el Sistema Nervioso Central, ojo y músculo esquelético. En cerdos, el parásito se instala preferencialmente en el músculo esquelético. El ciclo de vida del parásito se completa cuando el hombre come carne de cerdo infectada con cisticercos, los cuales se transforman en la tenia adulta en el tracto intestinal.

### *T. crassiceps*



TOTAL = 51

Figura 4. La inmunoelectrotransferencia de un extracto antigénico de *Taenia crassiceps* en reacción con un conjunto de sueros de enfermos hidatidosos (infectados con la larva del céstodo *Equinococcus granulosus*), cisticercosos (infectados con la larva de *Taenia solium*) e individuos normales, muestra una gran reactividad cruzada entre *T. crassiceps*, *T. solium* y *E. granulosus*. *T. crassiceps* es una excelente fuente alternativa de antígenos para el inmunodiagnóstico de cisticercosis e hidatidosis, en sustitución de *T. solium* y *E. granulosus*, tan variable e inaccesible, respectivamente.

## Taenia solium vs. Taenia crassiceps.

T. crassiceps presenta una gran semejanza con T. solium en varios aspectos. Los ratones mantienen a los cisticercos de T. crassiceps libres en su cavidad peritoneal como una infección crónica que causa cierta inflamación en las superficies serosas intestinales en los últimos estados de la enfermedad, al igual que la inflamación causada por T. solium en las meninges basales humanas. Por otra parte, aunque más pequeño, el parásito murino muestra semejanza anatómica con T. solium y se desarrolla sin causar daños a las estructuras vecinas del hospedero, únicamente ocupando cierto espacio y provocando escasa inflamación (Larraalde, et al., 1989). El ciclo de vida de T. solium también es parecido al de T. crassiceps (fig. 3): necesita un hospedero intermediario (ratón) y otro definitivo (zorro), en el cual realiza su reproducción sexual.

Recientemente se comprobó que, a nivel inmunológico, las similitudes entre ambos parásitos son aún más importantes. Ya se ha logrado substituir los antígenos de T. solium por antígenos de T. crassiceps en pruebas de ELISA y hemaglutinación para el inmunodiagnóstico de cisticercosis humana (fig. 4) (Larraalde et al., 1990). Además se ha demostrado que la inmunización de ratones con un extracto antigénico del metacéstodo de T. solium los protege contra el desafío con parásitos de T. crassiceps (Sciutto et al., 1990), lo cual demuestra inmunidad cruzada entre los parásitos murino y humano. Estos hallazgos permiten establecer firmes esperanzas sobre el uso de antígenos de T. crassiceps para elaborar una vacuna en contra de los cisticercos porcinos.

### Objetivos.

Dados estos antecedentes, el presente trabajo se desarrolló con los siguientes objetivos y estrategias:

- 1.- Establecer la magnitud del efecto gonadal sobre la susceptibilidad a la cisticercosis murina, determinando el efecto de la gonadectomía sobre la carga parasitaria de ratones

infectados.

2.- Examinar el papel del sistema inmune en el efecto de las gónadas sobre la susceptibilidad, deprimiendo la función inmune por irradiación en ratones con y sin gónadas.

3.- Determinar si la diferencia de susceptibilidad entre las hembras y los machos puede deberse a efectos directos de las hormonas sexuales sobre los cisticercos, examinando el desarrollo de cisticercos cultivados in vitro expuestos a cantidades variables de hormonas sexuales.

4.- Analizar, por inmunolectroforesis, el perfil de reconocimiento de antígenos por el suero de los ratones de los grupos mencionados anteriormente para buscar posibles relaciones entre la susceptibilidad y la respuesta inmune humoral.

Los resultados más relevantes a los objetivos del proyecto (efecto de la gonadectomía y de la irradiación sobre la susceptibilidad y el efecto in vitro de hormonas sexuales sobre los cisticercos) se presentan a continuación en la forma de un artículo enviado para su publicación. En la sección siguiente intitulada "Resultados Adicionales" se muestran otros resultados no incluidos en el artículo relacionados con el efecto de la irradiación sobre el sistema inmune de ratones infectados, detalles del efecto in vitro de las hormonas sexuales sobre los cisticercos, el efecto de la densidad de parásitos sobre su crecimiento in vitro y el efecto de las gónadas sobre el reconocimiento de antígenos del cisticercos por los anticuerpos séricos de los ratones.

**RUNNING HEAD:**

**HUERTA ET AL.-GONADS AND IMMUNITY IN MURINE CYSTICERCOSIS**

IMMUNOLOGICAL MEDIATION OF GONADAL EFFECTS ON EXPERIMENTAL MURINE  
CYSTICERCOSIS CAUSED BY Taenia crassiceps METACESTODE.

Huerta, L., Terrazas, L.I., Sciutto, E., Lomelí, C., Montoya,  
R.M., Díaz, M.L., Govezensky, T. and Larralde, C.

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

Mailing address:

Dr. Carlos Larralde  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
Ap 70228  
México D.F., 04510  
México  
Fax number: 550-00-48  
Telephone number: 550-39-82

ABSTRACT: Female Balb/c mice are naturally more susceptible than males to intraperitoneal experimental infection with Taenia crassiceps metacestodes. Gonadectomy tends to equalize susceptibility between sexes by reducing in half the mean parasite load of females and by tripling that of males. The effect of gonadectomy is seen only in mice with intact immune systems but not in irradiated mice. Purified sexual hormones (17- estradiol, testosterone and progesterone) do not affect cysticercus reproduction or growth in vitro. Thus, gonadal effect on mice susceptibility to cysticercosis appears to be mediated via the immune system and it is probably not the consequence of the major sexual steroids acting directly upon the parasites. Because sublethal irradiation increases the parasite load of gonadectomized females and of intact males, while that of gonadectomized males and intact females remain unchanged, irradiation results are consistent with the hypothesis that immunological events participating in controlling the growth of cysticercus are inhibited by ovaries and stimulated by testes.

INDEX DESCRIPTORS

Taenia crassiceps, gonads, immunity, cysticercosis, parasites, susceptibility.

Experimental murine cysticercosis caused by Taenia crassiceps metacestodes greatly facilitates the study of biological factors participating in metacestode disease because T. crassiceps cysticercus grows quickly within the mouse intraperitoneal cavity, and may be easily kept in vitro. The structural, morphological, and immunological similarities shared by T. crassiceps with other cestodes may relate experimental results to other infections including those of humans (Larralde et al. 1988, 1990). Previous studies on murine cysticercosis by T. crassiceps (Freeman, 1962, 1964; Larralde et al., 1989) showed that female mice were more susceptible than males to infections acquired by ingestion of eggs or by direct intraperitoneal metacestode inoculation. Similar observations in mice (Culbreth, 1972) and rats (Blair and Campbell, 1976) were made later. However, some authors (Del Valle, 1989) have failed to show any sex-associated susceptibility difference in voles infected orally with eggs. More recently, studies of susceptibility differences associated to H-2 in our laboratory (Sciutto et al., 1990) indicated that Balb/c strain (H-2d) was most susceptible to experimental infection with metacestodes, while Balb/b (H-2b) and Balb/k (H-2k) were less so. In these three strains female parasite loads were always larger than those of males, independent of the susceptibility of the strain or the length of the infection (30 and 60 days). A more thorough investigation of the role of gonads in this host-parasite relationship was thought pertinent to elucidate the involvement of gonads and the immune system in sex-associated susceptibility of mice to experimental cysticercosis. Direct effect of sex hormones on metacestodes had

to be critically considered since some parasites contain and capture noticeable amounts of sex steroids (Kiser et al., 1986; Chung et al., 1986). Here we inform of the results of these studies which examine the relationship between gonads and immune system in their effect upon parasite load of mice experimentally infected with T. crassiceps metacestodes after gonadectomy, irradiation, or both. Also, the in vitro effect of sex hormones (17- $\beta$  estradiol, testosterone and progesterone) on cysticercus growth are described. Results indicate that gonads do not seem to have a direct effect on parasites and predominantly act through the immune system. It would also appear that in the normal mice the testicles promote immune restriction of parasite growth while the ovary's role is immunologically inhibitory, since irradiation increased parasite load only in intact males (normally immunologically restrictive of parasite load) and in gonadectomized females (normally immunologically permissive).

## MATERIALS AND METHODS

### Cysticercus

Metacestodes of *T. crassiceps*, ORF strain, were used in all experiments and were supplied by Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg, West Germany) in 1986. Since then parasites have been maintained in female Balb/c mice by intraperitoneal sequential inoculation of metacestodes (Freeman, 1962). Larvae for experimental infection were obtained from donor mice infected 3-6 months before.

### Mice

Experiments were performed in male and female mice, 5-8 weeks of age, all of the BALB/c (H2-d) strain because of their high susceptibility to this form of experimental cysticercosis (Sciutto et al., 1990).

### Experimental infection

Mice were inoculated intraperitoneally with 10 parasites of approximately 2 mm in diameter without visible buds. Parasites in the inoculum were previously washed several times with PBS (0.01 M phosphate buffer solution, 0.15 M NaCl, pH 7.2). Sera for antibody studies were obtained by bleeding mice 30 days after infection, after which they were killed by cervical dislocation. The parasite load of each mouse was evaluated by counting the number of cysticercus recovered from the peritoneal cavity. Parasites were never found outside the abdominal cavity.

## Gonadectomy

Gonadectomies were surgically performed under anesthesia with ether on 5-week old mice which were then allowed a 3-week recovery period before inoculation with parasites. Gonadectomy recovery periods extended to 8 weeks when mice were to be used in irradiation experiments.

## Irradiation

Seven days prior to irradiation, drinking water containing antibiotic (6.6 g/l of oxytetracycline) was offered ad libitum to controls and mice to be irradiated. A Mevatron (Siemens) electron source from the National Cancer Institute was employed. Mice were irradiated with a sublethal dose which is known to produce significant immunodepression in other parasitic diseases: total body irradiation with 600 rads directed towards the medial plane with an energy of 6 MeV (Wakelin and Wilson 1977). The gonadal area of non-gonadectomized animals was externally protected with 4 mm thick lead plates: flat, 9 X 9 mm for females and curved 45 X 20 mm for males. Irradiated mice were inoculated with parasites the day following irradiation in the same manner as described for non-irradiated mice.

## "In vitro" effect of sex hormones on cysticercus

Cysticerci of 2 mm in diameter, without visible buds were collected from donor mice, selected and washed six times with sterile PBS containing with 50 U/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin (Gibco). Cysticerci were cultured in groups of 1, 4 or 25 per flask, each containing 0.5 ml of RPMI culture medium/

cysticercus (Gibco), supplemented with 100 ug penicillin/ml and 100 mg streptomycin/ml (Gibco), 20 mM HEPES and 1% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) at pH 7.2-7.4 adjusted with 0.1 HCl. Hormones were added since the first day of culture in concentrations equal or up to fifty times larger than those found in serum of healthy adult mice: namely, 3, 30 or 150 ng of testosterone or progesterone/ml (Sigma) and 0.03, 0.3 or 1.5 ng of 17- $\beta$ estradiol/ml (Sigma) (Brick et al., 1985; Howe et al., 1980). Cultures were incubated at 37.C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Culture medium and hormones were renewed weekly and larvae were observed every 3-4 days in an inverted microscope (Microstar, American Optical) in order to register the total number of parasites, their apparent viability, the number of buds/cysticercus, their size, and motility.

#### Anticysticercus antibody assay (ELISA)

Vesicular fluid from T. crassiceps larvae was employed as the source of antigen for detection of anticysticercus antibody in the sera of mice, by ELISA, as described elsewhere (Larralde et al., 1989).

#### White blood cell assays

Besides antibody levels, the irradiation effects were followed by counting the number of circulating leukocytes as assayed on different occasions, both in normal and irradiated animals. Peripheral blood used was obtained from the tail of each animal and processed according to standard hematological procedures (Instituto Mexicano del Seguro Social, 1978).

## Statistical analysis

Statistical significance of experimental variables (sex, gonadectomy and irradiation) upon "parasite load" was studied by multifactorial analysis of variance (ANOVA) (SAS Institute Inc., 1985). The normal distributions and homogeneous variances necessary for the correct application of this analysis were obtained by transforming the response variable "parasite load" to the fourth root of the number of parasites in each mouse plus one ( $\sqrt[4]{(\text{number of parasites} + 1)}$ ). Results were also studied for statistical significance using "parasite load" as was, without algebraic transformation. Resulting statistical inferences did not differ with either response variable.

## RESULTS

### Gonadectomy effect

Gonadectomy notably affected the host's susceptibility to peritoneal cysticercosis. Figure 1 presents the cumulative frequency distribution of parasite loads in 43 female and 40 male gonadectomized animals and of 24 males and 23 females of each control group. In the average, control females had 4-5 times as many parasites as their male counterparts. Ovariectomy, however, reduced in half the female's mean parasite load while orchidectomy almost tripled the one of males, practically eliminating sex-related differences. Statistical analysis revealed highly significant sexual differences in control intact mice ( $P < .0001$ ) but not in gonadectomized animals ( $P > .1957$ ). The effect of gonadectomy within gender was likewise highly significant ( $P < .0008$  in females and  $P < .0001$  in males).

### "In vitro" effect of sex hormones on cysticerci

The effect of different  $17\text{-}\beta$ estradiol, testosterone and progesterone concentrations on the motility, budding rate and size of cysticerci cultivated in vitro at different bovine fetal serum concentrations and with a different number of parasites/culture flask, was evaluated to determine the possibility of these sex hormones directly acting upon parasites. Representative results on budding rate are shown in Figure 2 and indicate that these hormones had no "in vitro" effect on the cysticercus biological activities, even though the amounts of hormones used were up to fifty times the normal blood hormone concentration. The increase

in bovine fetal serum concentration (0, 0.1, 1 and 10%) did favorably affect cysticerci reproduction (data not shown). 1% bovine fetal serum was chosen for hormone-related experiments in order to minimize possible contamination from fetal serum hormones. Metacestode motility rate and size were daily evaluated as of day 1, and both were found to be equally insensitive to the hormones (data not shown). In all experiments, parasite reproduction was significantly greater in flasks containing a larger number of metacestodes ( $1 < 4 < 25$ ) (data not shown).

#### Irradiation effect

Immediately after irradiation mice developed various degrees of leukopenia which lasted 14 days in all animals and extended to 22 days in some (data not shown) before returning to normal levels. The anti-cysticercus antibody serum levels of non-irradiated mice doubled those found in irradiated mice at the end of the experiment (data not shown). Irradiation effects on the parasite load of normal and gonadectomized male and female mice is shown in Figure 3. As expected from previous experiments gonadectomy in mice with intact immune system (non-irradiated), significantly decreased the parasite load in females (105 vs 66,  $P < .002$ ) and increased it in males (37 vs 55,  $P < .01$ ), although to extents less notable than before (Fig. 1). Irradiation significantly increased the parasite load only in gonadectomized females (66 vs 122,  $P < .001$ ) and in intact males (35 vs 54,  $P < .01$ ); while the parasite loads of gonadectomized males or of intact females were unaffected by irradiation (55 vs 58,  $P > .78$ , in gonadectomized males and 105 vs 95,  $P > .36$ , in intact females).

## DISCUSSION

The present investigations demonstrate that gonadectomy equalizes susceptibility between sexes in mice, decreasing the parasite load of female and increasing that of males. The possibility that the host's most prominent steroid hormones have direct effects on cysticerci (Mansour, 1984; Chung et al., 1986; Kiser et al., 1986), was not supported by our results, since 17- $\beta$  estradiol, progesterone and testosterone did not have significant in vitro effects upon parasite development. Of course, other gonadal factors are not discarded by these experiments, nor in fact are the pituitary or hypothalamic ones presumably triggered in response to gonadectomy. Our claim is just that these most prominent sexual steroids do not seem to directly influence parasite growth. In contrast, parasite density (number of parasites/ml) appears to be a significant positive factor for "in vitro" growth, as the parasites reproduced better in crowded than in low density conditions (Huerta, 1990).

Also, our results indicate a close relationship between endocrine and immune systems in the control of cysticercosis, as is the case in a variety of other instances (Paavonen et al., 1981; Ahmed et al., 1985; Grossman, 1984; Bateman et al., 1989; Blalock, 1989), but totally novel for cestode disease. An inkling of such association for cysticercosis first arose when vaccination produced greater protection in male than in female mice, of both resistant (BALB/b) and susceptible (BALB/c) strains (Sciutto et al., 1990). In here we show that the effect of irradiation on parasite load is sex dependent: irradiation significantly promotes

parasite growth in intact males and in gonadectomized females, although much more notably in the latter, and has no effects in intact females and in gonadectomized males. The net result of these effects is that irradiation diminishes the effect of gonadectomy. We propose that: a) irradiation is of no consequence to parasite growth in intact females since they are naturally immunologically permissive towards cysticerci, but irradiation significantly depresses the naturally restrictive immune system of intact males; and b) irradiation is inconsequential in gonadectomized males, whose immune system is thus artificially rendered permissive towards cysticerci, but depresses the artificially active immune system of gonadectomized females (Fig. 4). The influence of gonadal hormones on the immune system is considered to be responsible for sex-associated differences in susceptibility to infections (Grossman, 1984; Ahamed et al., 1985; Alexanders and Stimson, 1988). Various reports on greater male susceptibility to infection have furthered the notion that they are less immunologically responsive than females (Miller, 1965; Frayha et al., 1971; Dobson and Owen, 1978; Charniga et al., 1981; Reddington et al., 1981; Alexander and Stimson, 1988; Mock and Nacy, 1988; Wonderlich et al., 1988; Nakanishi et al., 1989). It would seem from these experiments, however, that T. crassiceps cysticercosis constitutes - together with T. multiceps cysticercosis (Esch et al., 1966) - an exception to this rather simplified rule. In fact, a more comprehensive theory would envisage host-parasite relationships as subject to a number of regulatory factors of differing individual strengths, that combine uniquely in each case. The importance of an integral approach,

including at least immune, endocrine and parasite system interactions, in the study of susceptibility to infection is thus emphasized.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Sofía Fragoso expertly processed this manuscript.

## REFERENCES

- Ahmed, S.A., Penhale W.J. and N. Talal. 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex action. American Journal of Pathology 121: 3, 531.
- Alexander, J. and W.H. Stimson. 1988. Sex hormones and the course of parasitic infection. Parasitology Today 4: 7, 1989.
- Bateman A., Singh A., Kral T. and S.Solomon. 1989. The immune hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Endocrine Reviews 10:1, 92.
- Blair, L.S. and W.C. Campbell. 1976. The rat (Rattus norvegicus) as laboratory host for the metacestodes of Taenia crassiceps. The Journal of Parasitology 62: 1, 63.
- Blalock, J.E. 1989. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. Physiological Reviews 69: 1, 1.
- Brick, J.E., Wilson P.A. and S.E. Walker. 1985. Hormonal modulation of responses to thymus-independent and thymus-dependent antigens in autoimmune NZB/W mice. Journal of Immunology 134(6): 3693.
- Charniga, L., Stewart G.L., Kramar G.W. and J.A. Stanfield. 1981. The effects of host sex on enteric response to infection with Trichinella spiralis. The Journal of Parasitology 67: 6, 917.
- Chung, W.L., Parish E.J. and L.W. Bone. 1986. Sex steroid content and metabolism in Trichostrongylus colubriformis (Nematoda). The Journal of Parasitology 72: 2, 326.

- Culbreth, K.L., Esch G.W. and R.E. Kuhn. 1972. Growth and development of larval Taenia crassiceps (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine. *Experimental Parasitology* 32: 272.
- Del Valle, B. 1989. Larvae of Taenia crassiceps (cestoda): host specificity and localization. *Parasitology Research* 76: 181.
- Dobson, C. and M. Owen. 1978. Effect of host sex on passive immunity in mice infected with Nematospiroides dubius. *International Journal for Parasitology* 8: 359.
- Esch, G.W. 1967. Some effects of cortisone and sex on the biology of coenuriasis in laboratory mice and jackrabbits. *Parasitology* 57: 175.
- Frayha, G.J., Lawlor W.K. and R.M. Dajani. 1971. Echinococcus granulosus in albino mice: effect of host sex and sex hormones on the growth of hydatid cyst. *Experimental Parasitology* 29: 255.
- Freeman, R.S. 1962. Studies on the biology of Taenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40: 969.
- Freeman, R.S. 1964. Studies on responses of intermediate hosts to infection with Taenia crassiceps (Zeder, 1800)(Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 42, 435.
- Grossman, C.J. 1984. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews* 5: 3, 435.
- Howe, E., Howe C. and I. Pollard. 1980. Plasma testosterone in the male, progesterone and estradiol-17 $\beta$  in the female, and

- $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxy steroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) activity in the testis and ovary of the snell dwarf mouse. *Biology of Reproduction* 23: 887.
- Huerta, L. 1990. Cisticercosis murina por Taenia crassiceps: mediación de las gónadas y del sistema inmune en la diferencia de susceptibilidad asociada al sexo. M.S. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 225 p.
- Kiser, C.S., Parish E.J. and L.W. Bone. 1986. Binding of steroidal sex hormones by supernatant from Trichostrongylus colubriformis (Nematoda). *Comparative Biochemical Physiology* 83B: 4, 787.
- Larralde, C., Sciutto E., Grun J., Díaz M.L., Govezensky T. and R.M. Montoya. 1988. Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by Taenia crassiceps: influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination. *In: Cell Function and Disease*, Eds. Luis Cañedo et al., Plenum Press, N.Y. pp 325- 331.
- Larralde, C., Montoya R.M., Sciutto E., Díaz M.L., Govezensky T. and E. Coltorti. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 3, 282.
- Larralde, C., Sotelo J., Montoya R.M., Palencia G., Padilla A., Govezensky T., Díaz M.L. and E. Sciutto. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal

- fluid (CSF): Antigens from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia solium. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 114: 926
- Mansour, T.E. 1984. Serotonin receptors in parasitic worms. Advances in Parasitology 23, 1.
- Proceeding handbook for clinical research. Instituto Mexicano del Seguro Social México, 1978.
- Miller, T.A. 1965. Influence of age and sex on susceptibility of dogs to primary infection with Ancylostoma caninum. The Journal of Parasitology 51: 5, 701.
- Mock, B.A. and C.A. Nancy. 1988. Hormonal modulation of sex differences in resistance to Leishmania major systemic infections. Infection and Immunity 56: 12, 3316.
- Nakanishi, H., Horii Y., Terashima K. and K. Fujita. 1989. Effect of testosterone on the susceptibility of C57BL/6 mice to infection with Brugia pahangi with reference to inflammatory cell response. The Journal of Parasitology 75: 3, 455.
- Paavonen, T., Andersson L.C. and H. Adlercreutz. 1981. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. Journal of Experimental Medicine 154: 1935.
- Reddington, J.J., Stewart G.L., Kramar G.W. and M.A. Kramar. 1981. The effects of host sex and hormones on Trichinella spiralis in the mouse. The Journal of Parasitology 67: 4, 548.

- SAS Institute Inc. 1985. Introductory Guide for Personal  
Computers. Version 6 Edition. Cary, N. C. SAS Institute  
Inc., 1985. 111 p.
- Sciutto, E., Fragoso G., Díaz M.L., Valdés F., Lomelí C.,  
Govezensky T., Montoya R.M. and C. Larralde. 1990. Murine  
Taenia crassiceps cysticercosis: H-2 and sex influence on  
susceptibility. Parasitology Research 77 (3): 243- 246.
- Sciutto, E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R.M., Díaz  
M.L., Govezensky T., Lomelí C. and C. Larralde. 1990.  
Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T.  
solium antigens against experimental murine  
cysticercosis. Parasite Immunology 12: 687-696.
- Wakelin, O. and M. Wilson. 1977. Evidence for the involvement of a  
bone marrow-derived cell population in the immune  
expulsion of Trichinella spiralis. Parasitology 74: 225.
- Wunderlich, F., Mossmann H., Helwig M. and G. Schillinger. 1988.  
Resistance to Plasmodium chabaudi in B10 mice: influence  
of the H-2 complex and testosterone. Infection and  
Immunity 56: 9, 2400.

## LEGENDS OF FIGURES

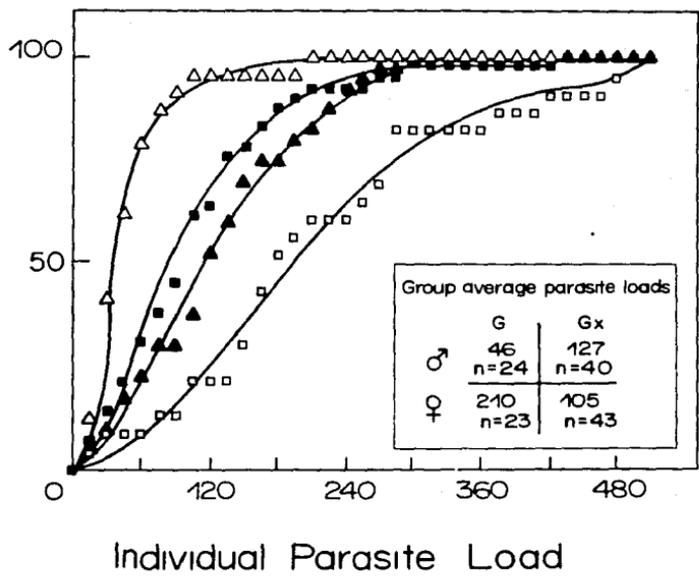
Figure 1. Gonadectomy effect. Gonadectomy significantly alters parasite load in mice experimentally infected intraperitoneally with Taenia crassiceps metacestodes. The net effect of gonadectomy in non-irradiated mice is to minimize differences of parasite loads between sexes (105 vs 127,  $P < .19$ ) by decreasing the parasite load of females - from an average of 210 to 105 ( $P < .0008$ ) - and increasing that of males - from an average of 46 to 127 ( $P < .0001$ ). G stands for control intact mice while Gx for gonadectomized mice, while n is the number of mice in each group. ( $\square$ ), control females; ( $\blacksquare$ ), gonadectomized females; ( $\triangle$ ), control males; ( $\blacktriangle$ ), gonadectomized males.

Figure 2. In vitro sex hormone effect. No in vitro effects on Taenia crassiceps reproduction were registered with (a) progesterone, (b) 17- $\beta$ estradiol or (c) testosterone at an initial parasite density of 25 larvae/flask with 0.5 ml culture medium/larvae. (d) is a control flask without added hormones. All experiments were performed at 37.C, 5% CO<sub>2</sub>, RPMI with 1% fetal bovine serum. Concentrations of progesterone: ( $\bullet$ ), 3 ng/ml; ( $\blacktriangle$ ), 30 ng/ml; ( $\blacksquare$ ) 150 ng/ml. Concentrations of 17- $\beta$ estradiol ( $\bullet$ ), 30 pg/ml; ( $\blacktriangle$ ), 300 pg/ml; ( $\blacksquare$ ), 1.5 ng/ml. Concentrations of testosterone: ( $\bullet$ ), 3ng/ ml.; ( $\blacktriangle$ ), 30 ng/ml; ( $\blacksquare$ ), 150 ng/ ml.

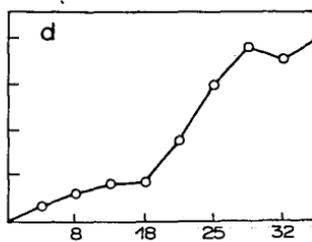
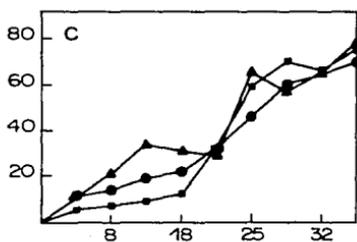
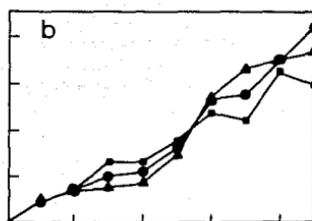
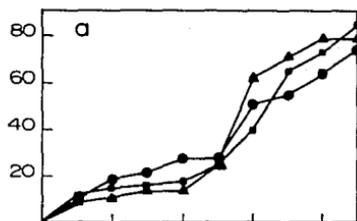
Figure 3. Irradiation effects in (a) control intact and (b) gonadectomized mice. Irradiation significantly increases average parasite loads in control males (37 vs 54,  $P < .02$ ) and has no effect in gonadectomized males (55 vs 58,  $P < .8$ ). In females irradiation increases parasite load only in those gonadectomized (66 vs 122,  $P < .001$ ) but has no significant effect in controls (105 vs 95,  $P < .3$ ), in spite of the apparent differences in the cumulative frequency curves. Overall it appears that irradiation decreases effect sex equalizing of gonadectomy by abating the differences in parasite loads of irradiated gonadectomized and in intact control males (58 vs 54,  $P < .6$ ) and females (95 vs 122,  $P < .09$ ). ( $\square$ ), non irradiated females; ( $\blacksquare$ ), irradiated females; ( $\Delta$ ), non-irradiated males; ( $\blacktriangle$ ), irradiated males.

Figure 4. Mediation of the immune system in gonadal effects upon Taenia crassiceps growth in experimental murine cysticercosis. As indicated by vaccination experiments (Sciutto, 1990) the net effect of the immune system appears to be a negative control of parasite growth. Our results indicate that this net negative control results from an immunologically inhibitory effect of ovaries and a promoting effect of testes. The parasite itself promotes its own growth but hormones do not directly affect the parasites.

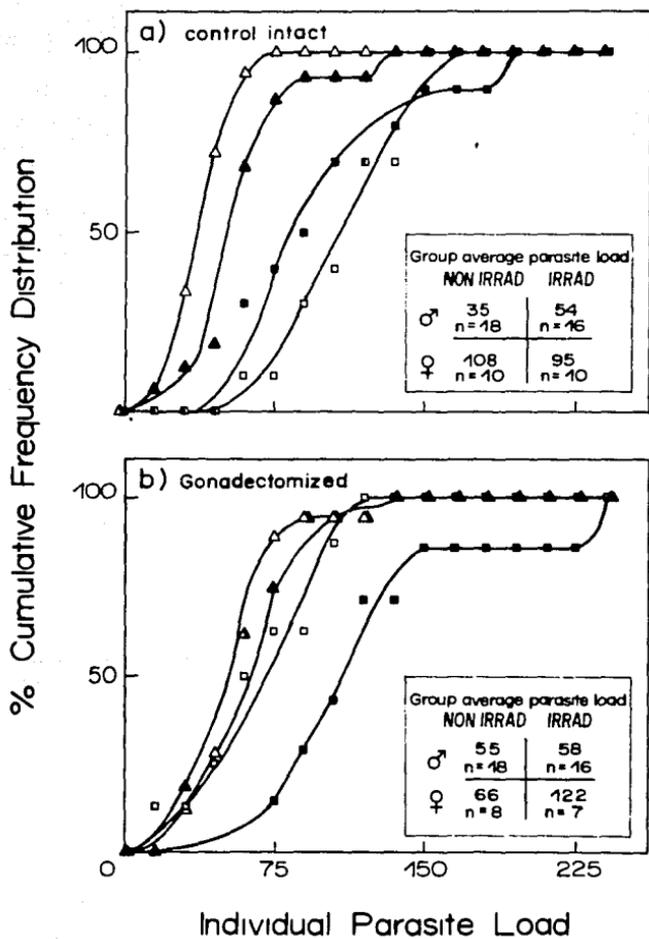
% Cumulative Frequency Distribution

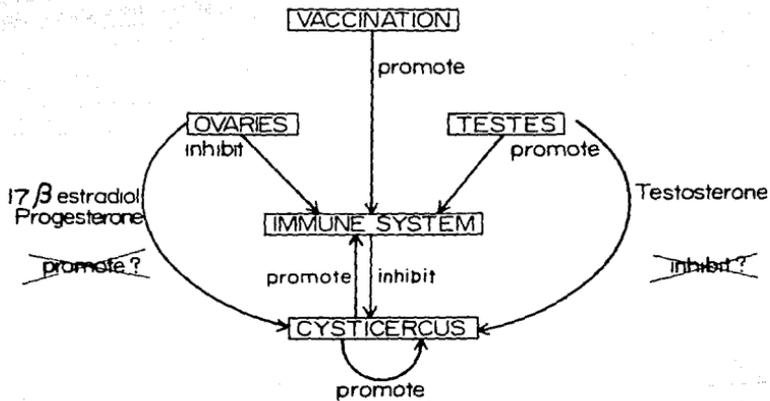


Total Number of Buds in 25 Cysticerci



Days in Culture





#### IV. RESULTADOS ADICIONALES

En esta sección se presentan 3 conjuntos de resultados que complementan la información contenida en la sección anterior y que se refieren a los 3 siguientes aspectos:

1) Efecto del suero fetal de bovino (SFB), sobre el crecimiento de cisticercos in vitro.

2) Efecto de hormonas sexuales sobre el crecimiento de cisticercos in vitro.

3) Efecto de la densidad de parásitos sobre el crecimiento de cisticercos in vitro (resultados preliminares).

4) Efecto de la irradiación sobre el sistema inmune del ratón (leucocitos y anticuerpos circulantes).

5) Comparación del perfil por inmunoelectrotransferencia de anticuerpos detectados en el suero de ratones hembras y machos con cisticercosis.

## MATERIAL Y METODOS

Las características de los cisticercos y de los ratones, así como los procedimientos para la infección experimental, gonadectomía e irradiación, se describen en el artículo que se presenta en la sección III. Aquí se mencionan solamente aquellas técnicas no descritas previamente.

### Cultivo de cisticercos "in vitro".

Se seleccionaron cisticercos de aproximadamente 2 mm. de diámetro sin gemas visibles, recién recuperados de la cavidad peritoneal de ratones infectados y se lavaron seis veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M con NaCl 0.15 M, pH 7.2 (PBS) estéril conteniendo 50 U/ml de penicilina (Gibco) y 50 µg/ml de estreptomycin (Gibco). Los parásitos se sembraron individualmente o en grupos de cuatro cisticercos cada uno en placas de cultivo multipozo (Costar), todos con 2 ml. de medio de cultivo RPMI (Gibco), adicionado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, 20 mM de HEPES y suero fetal bovino (SFB) (Gibco) a 0, 0.1, 1 o 10 %. El pH se ajustó con HCl 0.1 M a 7.2-7.4. Las hormonas se agregaron a concentraciones correspondientes a 0, 0.1, 1 y 10 veces la concentración fisiológica encontrada en el suero de ratones normales (Ogle y Kitay, 1976; Howe *et al.*, 1980; Brick *et al.*, 1985), es decir: 0, 0.3, 3 o 30 ng/ml de testosterona o progesterona (Sigma) y 0, 0.003, 0.03 o 0.3 ng/ml de estradiol (Sigma). Los cultivos se incubaron a 37 C con una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 42 días. El medio y las hormonas les fueron renovados cada semana. Los cisticercos se observaron cada 3 o 4 días en un microscopio invertido (MicroStar, American Optical) para registrar el número total de parásitos y su viabilidad aparente, el número de gemas por cisticercos, su tamaño y grado de movilidad con respecto a la inicial.

## ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

La figura 5 contiene una explicación general del principio básico del ensayo de ELISA; aquí solamente se explicará el procedimiento específico para la detección de anticuerpos anti-cisticerco de Taenia crassiceps.

El fluido vesicular del cisticerco de T. crassiceps constituyó el antígeno para esta prueba (Larralde et al., 1989). Para su obtención se lavaron parásitos frescos 4 o 5 veces con PBS y se centrifugaron a 14,000 g durante 1 hora después de haber quitado el exceso de amortiguador. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -70 C hasta el momento de su uso. Se adsorbió 1 µg de antígeno o de albúmina de suero de bovino (BSA), como control negativo, en las paredes de cada pozo de las placas de ELISA en 100 µl de Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5. Se incubaron 2 horas a 37 C y se dejaron a 4 C toda la noche para lavar posteriormente 5 veces con PBS-Tween (PBS, 0.05% de Tween 20). Las placas se incubaron 30 min con PBS-BSA 1% a 37 C y posteriormente con 100 µl de una dilución 1:200 en PBS-Tween del suero correspondiente durante durante 2 horas. La anti-Ig de ratón biotinilada (Sigma) y la streptoavidina peroxidasa (Sigma) se agregaron ambas a una dilución 1:4000 en un volumen de 100 µl. por pozo, incubando cada una 1 hora a 37 C. Después de cada paso del procedimiento anterior las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween. Finalmente, la actividad enzimática se detectó por su reacción con 100 µl de o-fenildiamina, 0.4 mg/ml en solución amortiguadora de citrato 0.1 M, pH 5 y con 50 µl de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo a los 30 minutos con 50 µl por pozo de ácido sulfúrico 4 N. Las lecturas de densidad óptica a 492 nm se hicieron en un procesador de ELISA automático (Behring).

### Cuantificación de células blancas.

La medición de las células blancas en la sangre periférica de cada uno de los ratones se efectuó obteniendo una muestra de 5 µl de sangre de la cola y colocándola inmediatamente en 50 µl de solución de Turk (ácido acético glacial al 3% con azul de metileno), para hacer una dilución 1:11. El número de leucocitos

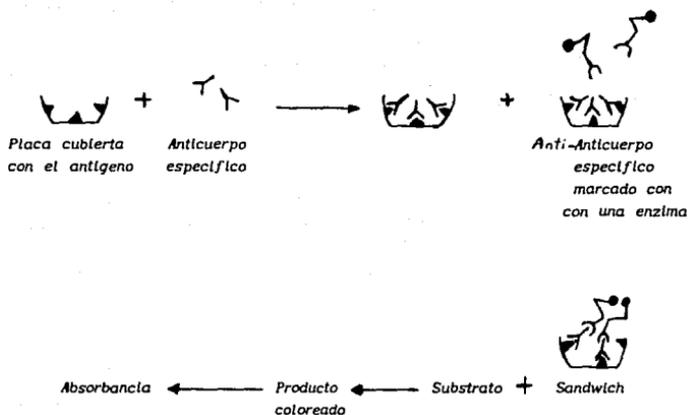


Fig. 5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Consiste en un sistema para la detección de reacciones antígeno-anticuerpo en fase sólida, que consta de los siguientes pasos: a) adsorción de una cantidad fija de antígeno en las paredes de una placa de plástico y lavado del exceso de antígeno, incubando posteriormente la placa con una solución de albúmina para bloquear los sitios de unión no específicos; b) adición del antisuero en una dilución apropiada para que los anticuerpos específicos se unan al antígeno unido a la fase sólida y lavado de los anticuerpos no unidos; c) adición de un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con una enzima conjugada (fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano) el cual se une al anticuerpo específico unido previamente y lavado de los conjugados anticuerpo-enzima no unidos y d) adición del sustrato de la enzima (disodio p-nitrofenil fosfato o peróxido de hidrógeno), produciendo un producto coloreado el cual se detecta como aumento de la absorbancia en un espectrofotómetro.

por microlitro se obtuvo contando en una cámara de Neubauer las células teñidas por el colorante (Instituto Mexicano del Seguro Social, 1978).

#### Electroforesis del fluido vesicular.

El fluido vesicular del cisticerco de Taenia crassiceps constituyó el antígeno para la inmunoelectrotransferencia (Larralde et al., 1988). Para su obtención se lavaron parásitos frescos 4 o 5 veces con PBS y se centrifugaron a 14,000 g durante 1 hora después de quitar el exceso de amortiguador. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -70 C hasta el momento de su uso.

La electroforesis del fluido vesicular se realizó en un gel de poliacrilamida al 7 % como sigue:

#### Soluciones:

1. Solución de acrilamida monomérica: acrilamida 29.2% y bisacrilamida 0.8 %, tras haberle filtrado con una membrana de nitrocelulosa con poro de 2  $\mu$ m.

2. Solución amortiguadora para el gel separador: Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.

3. Solución amortiguadora para el gel condensador: Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

4. SDS al 10 %.

5. Iniciador de la polimerización: persulfato de amonio al 10 % preparado justo antes de usar.

6. Solución de cubrimiento del gel separador: Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 0.1 %.

7. Solución amortiguadora para la muestra: Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, 2-mercaptoetanol 1 %, EDTA 0.074 %, pironina como colorante. El 2-mercaptoetanol se agrega a la solución hasta el momento de usarse.

8. Solución amortiguadora para la cámara: Tris 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1 %. Esta solución puede reutilizarse 4 o 5 veces si es de la cámara inferior, el de la cámara superior debe desecharse cada vez.

9. Solución de tinción: azul de Coomassie R-250 0.125 %,

metanol 30%, ácido acético 10 %.

10. Solución de desteñido: ácido acético 10 %.

#### Preparación del gel:

Las siguientes cantidades son las necesarias para dos geles de 13 X 13 cm y 1.5 mm de grosor:

	Gel separador	Gel condensador
Solución 1:	14 ml	1 ml
Solución 2:	15 ml	-
Solución 3:	-	2.5 ml
Solución 4:	0.6 ml	0.1 ml
Agua	30.1 ml	6.43 ml
Solución 5:	300 $\mu$ l	125 $\mu$ l
TEMED (catalizador)	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Para preparar el gel separador se mezclan las soluciones indicadas excepto el TEMED y la solución 5 y la mezcla se desgasifica al vacío con agitación durante 5 minutos; entonces se agrega el TEMED y la solución 5 y se colocan 28 ml de la mezcla en cada placa. Se empareja con agua la superficie del gel y se deja polimerizar. Si el gel se va usar al día siguiente, se cubre la superficie con la solución 6. El gel condensador se prepara de la misma manera, colocando 2.8 ml de la mezcla en cada placa.

El equivalente a 3 mg de proteína del fluido vesicular se mezcla con el mismo volumen de la solución 7 (el volumen total de la mezcla no debe exceder de 2 ml para 2 geles) y se hierve durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. En cada gel se coloca la mitad de la mezcla anterior y se llenan las cámaras superior e inferior con la solución 8. Para el paso de la muestra por el gel condensador se aplica una corriente de 20mA por gel y 40 mA por gel para el gel separador.

#### Electrotransferencia.

Terminada la electroforesis, se transfieren las proteínas a un papel de nitrocelulosa de 13 X 13 cm (Schleicher ú Schuell) con

poro de 0.45  $\mu\text{m}$  durante 1 hora a 25 V en una solución amortiguadora de transferencia (Tris-base 0.025 M, glicina 0.193 M, metanol 20%, pH 8.35). Como control de la electroforesis se corta una tira de uno de los geles antes de efectuar la transferencia, para teñirla posteriormente con la solución 9 toda la noche y luego desteñirla con la solución 10.

El papel con las proteínas ya transferidas se coloca toda la noche en albúmina de suero de bovino al 3% en PBS-Tween (PBS + 0.3 % de Tween 20) a 4 C. Como control de la transferencia se corta una tira de uno de los papeles antes de sumergirlo en la solución de albúmina, se lava con PBS-Tween y se tiñe con tinta india diluída 1:1000 en PBS-T toda la noche; se desteñe al día siguiente con agua. Los geles se tiñen con la solución 9 para observar la eficiencia de la transferencia. Al día siguiente el papel de nitrocelulosa se lava 5 veces con PBS-T y ya seco se corta en tiras de 3 mm de ancho.

#### Análisis del suero.

Cada tira se humedece con PBS-T y se incuba con 100  $\mu\text{l}$  del suero respectivo diluído 1:20 en PBS-T durante 4 horas en cámara húmeda. Posteriormente se incuban 1 hora a temperatura ambiente sucesivamente con un anticuerpo biotinilado de conejo anti-Ig de ratón diluída 1:4000 en PBS-T y con estreptoavidina-peroxidasa diluída 1:4000 en PBS-T. Antes de cada adición, las tiras se lavan 5 veces con PBS-T. Finalmente, las tiras se lavan 3 veces con PBS-T, 2 veces con PBS y se incuban 10-30 minutos a temperatura ambiente en una solución de PBS con o-cloronaftol .03 %,  $\text{H}_2\text{O}_2$  .05 % y metanol 20 % cubriéndolas de la luz. Se engujan abundantemente con agua corriente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Efecto del suero fetal bovino sobre los cisticercos "in vitro".

Se examinó el crecimiento de cisticercos en cultivo en presencia de distintas concentraciones de hormonas sexuales en combinación con diferentes proporciones de SFB, con el objeto de encontrar las condiciones para un crecimiento satisfactorio de los parásitos que a la vez permitieran la observación de cualquier efecto de las hormonas a probar, eliminando lo más posible la influencia de hormonas presentes en el suero o de otros factores promotores del crecimiento contenidos en éste, que pudieran enmascarar los efectos buscados. El contenido de SFB en el medio de cultivo fué de 0, 0.1, 1 y 10 %, mientras que las hormonas se agregaron en cantidades equivalentes a 0, 0.1, 1 y 10 veces la concentración fisiológica de estrógeno o testosterona presente en el suero de ratones normales (Ogle y Kitay, 1976; Howe et al., 1980; Brick et al., 1985).

A diferencia de los resultados mostrados en el capítulo anterior, en los cuales se cultivaron 25 cisticercos por grupo, los datos que se muestran aquí se obtuvieron cultivando 4 parásitos por grupo. Esto se hizo con el propósito de facilitar el registro frecuente del número de gemas, el tamaño y la movilidad con respecto a la movilidad inicial de cada uno de los cisticercos con el uso de un microscopio invertido.

Los resultados se muestran en las figuras 6 a 9 y en las tablas 2 y 3. El exámen general de los datos revela el efecto estimulador del suero sobre los tres parámetros medidos (gemación, tamaño y movilidad). El SFB al 10% y al 1% favorece la gemación de los cisticercos aumentando al menos 2 veces el máximo de gemas producidas en comparación con los cultivos sin suero (figuras 6a, 6c, 6d, 7a, 7c y 7d).

El tamaño de los cisticercos también se incrementa en presencia de mayor cantidad de suero, pasando de un tamaño máximo de 3-4 mm en los cultivos sin suero, a 5-6 mm con SFB al 10% (figuras 8a, 8d, 9a y 9d). Por otra parte, la movilidad mostrada

por los parásitos decae marcadamente a la mitad del tiempo de duración de los cultivos (entre los 12 y los 17 días) cuando no hay SFB en el medio o la concentración de éste es de 0.1%. Con 1 y 10% de SFB, la movilidad de los parásitos se conserva igual al nivel inicial durante 31 días. (tablas 2 y 3).

Es evidente el efecto favorable que ejerce el SFB sobre los tres parámetros registrados durante el tiempo de cultivo. Aunque los cisticercos se desarrollan en cierto grado cuando se cultivan en un medio sin suero o con suero al 0.1 %, este desarrollo es escaso en comparación con el alcanzado en un medio con 1 y 10 %, en los cuales los parásitos presentan mayor producción de gemas y mejor movilidad y tamaño, alcanzando un periodo de vida en cultivo de 30 días con 1% de SFB y de al menos 45 días con 10 de SFB (figuras 6 a 9 y tablas 2 y 3). De estas observaciones se desprende que el SFB al 1 % en el medio de cultivo es útil para obtener un desarrollo satisfactorio de los parásitos por 30 días en las condiciones de cultivo utilizadas, al mismo tiempo que se reduce en 100 veces la concentración original de los factores séricos.

## 2. Efecto de hormonas sexuales (estrogeno y testosterona) sobre el desarrollo de cisticercos cultivados "in vitro".

En los cultivos sin suero y con 0.1% de éste, no es posible observar ningún efecto promotor o inhibidor dependiente de la dosis de estrógeno o testosterona sobre la producción de gemas por los cisticercos (figuras 6a, 6b, 7a y 7b) dado que estas concentraciones de suero no son favorables para los parásitos.

La gráfica 5d muestra que el promedio de gemas producidas decae con el tiempo en los cisticercos cultivados en ausencia de testosterona. Los parásitos creciendo en presencia de la hormona en el medio de cultivo, sobrepasan a los controles después del día 15, de modo que, aparentemente, la testosterona estimula la gemación de los cisticercos. Por otra parte la producción de gemas con 1 y 10% de SFB en presencia de estrógeno, aparentemente es inhibida por esta hormona (figuras 7c y 7d).

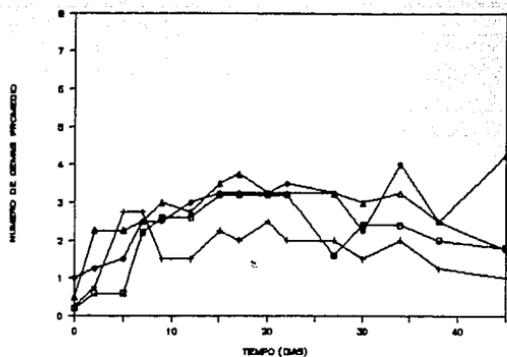
Las hormonas sexuales no afectan la movilidad de los cisticercos a ninguna de las concentraciones de suero utilizadas,

según puede observarse en las tablas 2 y 3. El tamaño de los cisticercos tampoco manifiesta efectos hormonales a lo largo del cultivo (figuras 8 y 9).

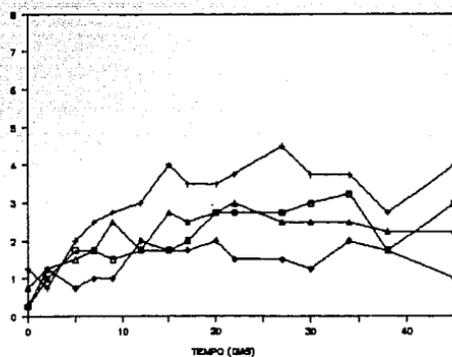
Las observaciones de los efectos hormonales mencionados anteriormente, se basan en un número reducido de parásitos por grupo (4) y en presencia de una gran heterogeneidad en la capacidad de gemación de los parásitos (ver "Resultados"). Debido a estas consideraciones, se decidió examinar el desarrollo de los cisticercos in vitro en presencia de hormonas sexuales en grupos de 25 cisticercos con SFB al 1%, con el objeto de obtener resultados más representativos. La descripción y resultados de estos experimentos están contenidos en el artículo de la sección III. Con ellos se concluye que las hormonas sexuales, incluyendo a la progesterona, no afectan la capacidad de gemación de los cisticercos durante 34 días de cultivo.

Durante el desarrollo de estos experimentos, se observó una gran heterogeneidad en la capacidad de gemación de los metacéstodos individuales, de modo que los parásitos cultivados inicialmente con las mismas características (aproximadamente 2 mm de tamaño y sin gemas visibles) y en las mismas condiciones de cultivo (igual concentración de SFB y hormonas) mostraron amplias diferencias en la producción de gemas, especialmente en las pozas con 1 y 10% de SFB. Así, por ejemplo, se encontraron frecuentemente cisticercos con una o ninguna gema al lado de cisticercos con 7, 12 o 18 gemas. En las pozas sin SFB y con 0.1% de éste, la heterogeneidad fué menor, debido probablemente a que la gemación estaba inhibida por la falta de suero en el medio de cultivo.

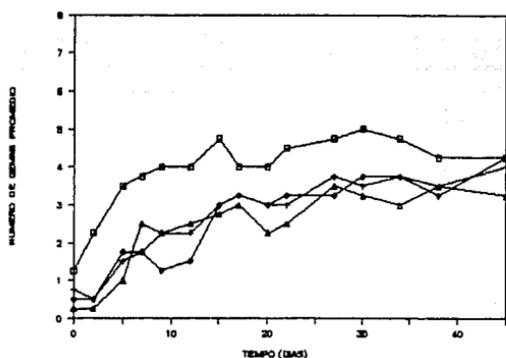
a) SIN SUERO



b) SUERO AL 0.1 %



c) SUERO AL 1.0 %



d) SUERO AL 10.0 %

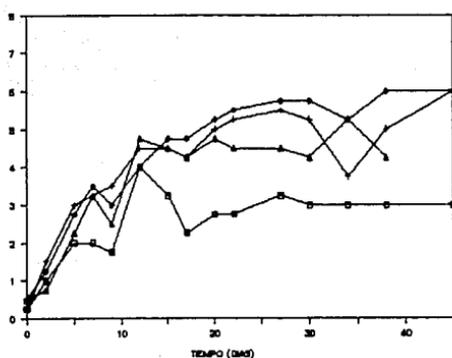
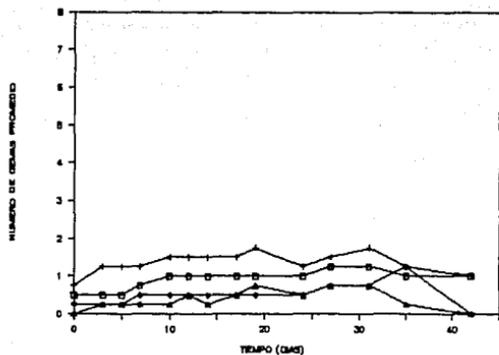
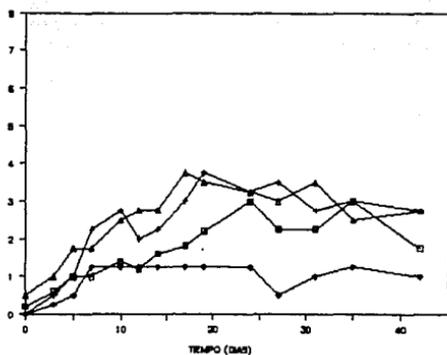


Figura 6. Efecto del suero fetal de bovino y la testosterona sobre la gemación de los cisticercos *in vitro*.  $\square$  [Te] = 0 ng/ml,  $+$  [Te] = 0.03 ng/ml,  $\diamond$  [Te] = 3.0 ng/ml,  $\triangle$  [Te] = 30.0 ng/ml.

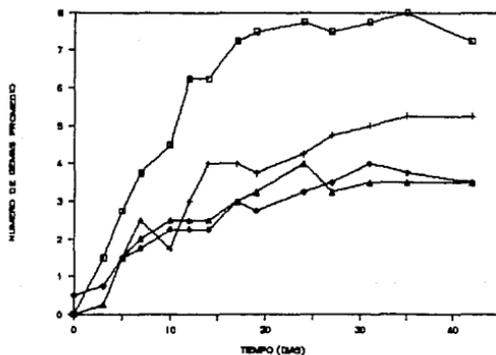
a) SIN SUERO



b) SUERO AL 0.1 %



c) SUERO AL 1.0 %



d) SUERO AL 10.0 %

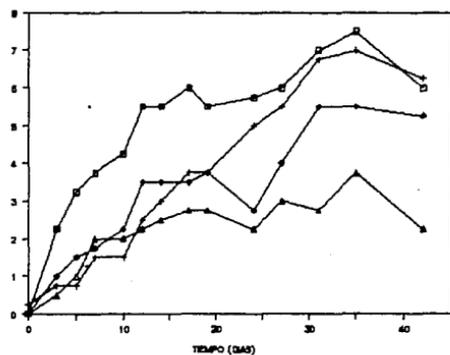
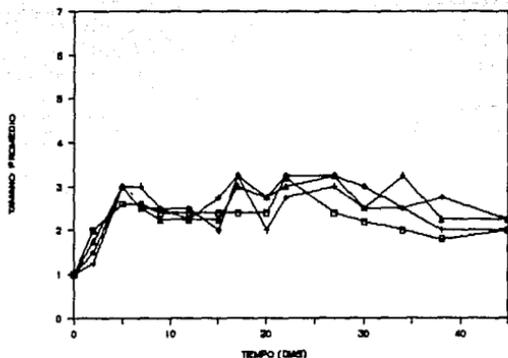
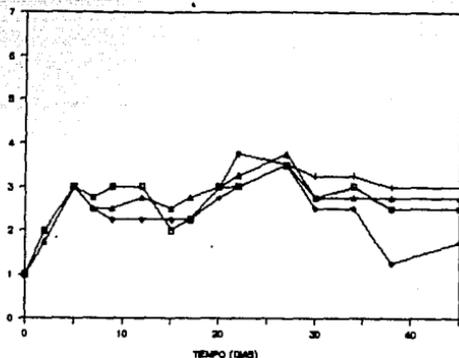


Figura 7. Efecto del suero fetal de bovino y estr6geno sobre la gemaci3n de los cisticercos *in vitro*.  $\square$   $[E_2] = 0$  ng/ml,  $+$   $[E_2] = .003$  ng/ml,  $\diamond$   $[E_2] = 0.03$  ng/ml,  $\Delta$   $[E_2] = 0.3$  ng/ml.

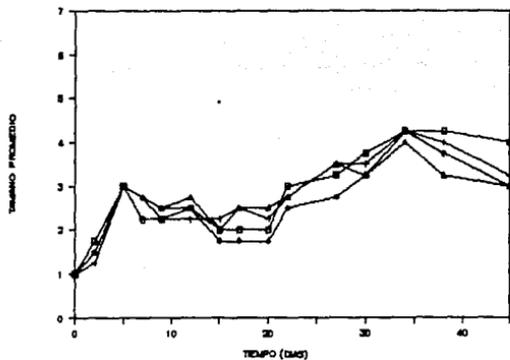
a) SIN SUERO



b) SUERO AL 0.1 %



c) SUERO AL 1.0 %



d) SUERO AL 10.0 %

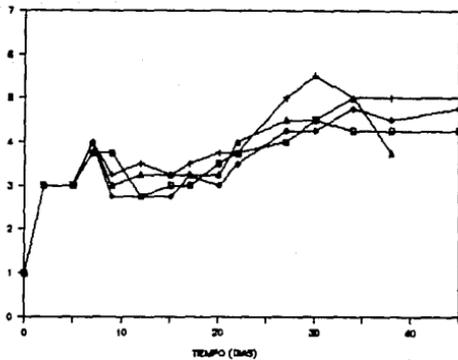
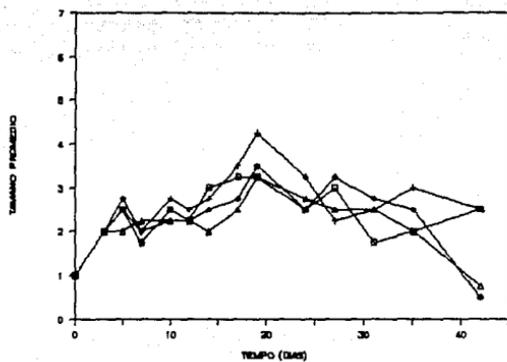
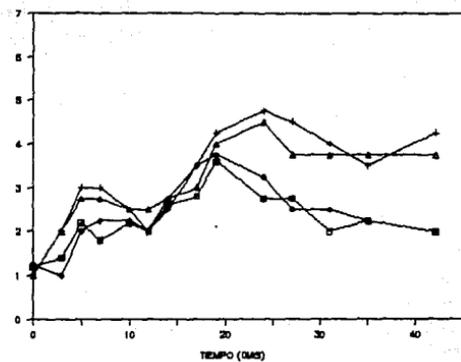


Figura 8. Efecto del suero fetal de bovino y testosterona sobre la el tamaño de los cisticercos *in vitro*.  $\square$  [Te] = 0 ng/ml, + [Te] = 0.03 ng/ml,  $\diamond$  [Te] = 3.0 ng/ml,  $\Delta$  [Te] = 30.0 ng/ml.

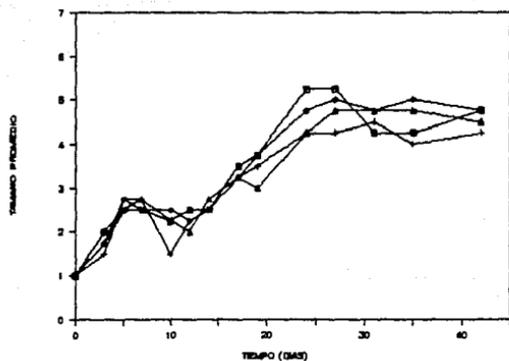
a) SIN SUERO



b) SUERO AL 0.1 %



c) SUERO AL 1.0 %



d) SUERO AL 10.0 %

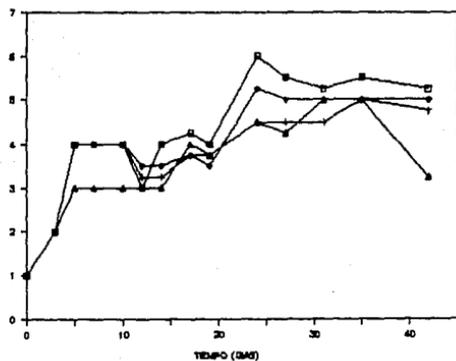


Figura 9. Efecto del suero fetal de bovino y estrógeno sobre el tamaño de los cisticercos *in vitro*. □ [E<sub>2</sub>] = 0 ng/ml, + [E<sub>2</sub>] = 0.003 ng/ml, ◇ [E<sub>2</sub>] = 0.03 ng/ml, ▲ [E<sub>2</sub>] = 0.3 ng/ml.

Tabla 2. Efecto del suero fetal de bovino y testosterona sobre la movilidad de los cisticercos *in vitro*.

Suero [Te]	0.0%				0.1%			
	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X
Días	Movilidad							
0	++	++	++	++	++	++	++	++
2	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	++	++	++	++
9	++	++	++	++	++	++	++	++
12	++	++	++	++	++	++	++	++
15	++	++	++	++	++	++	++	++
17	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+
30	-	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	-	-	-	-	-
45	+	+	-	-	-	-	-	-

Suero [Te]	1.0%				10.0%			
	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X
Días	Movilidad							
0	++	++	++	++	++	++	++	++
2	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	++	++	++	++
9	++	++	++	++	++	++	++	++
12	++	++	++	++	++	++	++	++
15	++	++	++	++	++	++	++	++
17	++	++	++	++	++	++	++	++
20	++	++	++	++	++	++	++	++
22	++	++	++	++	++	++	++	++
27	++	++	++	++	++	++	++	++
30	++	++	++	++	++	++	++	++
34	+	+	+	+	++	++	++	++
38	+	+	-	+	++	++	++	++
45	-	-	-	+	++	++	++	++

<sup>1</sup> Concentración de testosterona: 0.0X [Te] = 0 ng/ml, 0.1X [Te] = 0.03 ng/ml, 1.0X [Te] = 3.0 ng/ml, 10.0X [Te] = 30.0 ng/ml.

<sup>2</sup> (++) Movilidad igual a la inicial, (-)movilidad nula, (+)movilidad intermedia.

Tabla 3. Efecto del suero fetal de bovino y estrógeno sobre la movilidad de los cisticercos in vitro.

Suero [E]	0.0%				0.1%			
	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X
Días	Movilidad							
0	++	++	++	++	++	++	++	++
3	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	++	++	++	++
10	++	++	++	++	++	++	++	++
12	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	++	++	++	++
17	+	+	+	+	+	++	+	++
19	+	+	+	+	+	+	+	++
24	+	+	+	+	+	+	-	+
27	+	+	+	+	+	+	-	+
31	+	+	+	+	+	+	++	++
35	+	+	+	-	+	+	+	+
42	+	+	-	-	+	+	-	-

Suero [E]	1.0%				10.0%			
	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X	0.0X	0.1X	1.0X	10.0X
Días	Movilidad							
0	++	++	++	++	++	++	++	++
3	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	++	++	++	++
10	++	++	++	++	++	++	++	++
12	+	+	+	+	++	++	++	++
14	++	++	++	++	++	++	++	++
17	++	++	++	++	++	++	++	++
19	++	++	++	++	++	++	++	++
24	+	++	++	++	++	++	++	++
27	++	++	++	++	++	++	++	++
31	++	++	++	++	++	++	++	++
35	+	+	+	+	++	++	++	+
42	+	+	+	+	++	++	++	-

<sup>1</sup> Concentración de 17  $\beta$ -estradiol: 0.0X [E<sub>2</sub>] = 0, 0.1X [E<sub>2</sub>] = 0.003 ng/ml, 1.0X [E<sub>2</sub>] = 0.03 ng/ml, 10.0X [E<sub>2</sub>] = 0.3 ng/ml.

<sup>2</sup> (++) Movilidad igual a la inicial, (-) movilidad nula, (+) movilidad intermedia.

### 3. Efecto de la densidad de parásitos sobre el crecimiento de cisticercos "in vitro".

Los resultados que se muestran aquí se refieren a la evolución de cisticercos cultivados en forma aislada (cisticercos únicos) y en grupos de 4 (cisticercos agrupados).

Las figuras 10 y 11 muestran la producción de gemas por cisticercos cultivados en forma individual y en grupos de cuatro parásitos por poza. Dado que no se registró el número de gemas producidas por los cisticercos individuales de éste último grupo, no fué posible comparar la gemación de un cisticerco cultivado individualmente, con la gemación de un cisticerco cultivado agrupadamente, sino con la gemación promedio de estos. Aún con esta salvedad, es posible notar que la capacidad de gemación de los cisticercos es mayor cuando coexisten 4 cisticercos en la misma poza y que frecuentemente la cantidad de gemas de los cisticercos únicos se vuelve cero al final del cultivo o antes (figuras 10a, 10b, 10c, 10d, 11a y 11d), mientras que los cisticercos agrupados mantienen o aumentan su número de gemas. Como se mostrará mas adelante, la desaparición de las gemas se acompaña de la pérdida de movilidad y del colapso de la estructura macroscópica de los parásitos.

En las figuras 12 y 13 se muestra el tamaño desarrollado por los cisticercos de los experimentos anteriores. Es notable que en ausencia de suero y con 0.1% de este, los cisticercos únicos alcanzan un tamaño máximo semejante al de los cisticercos agrupados (aproximadamente 3 mm), pero generalmente se colapsan entre los días 18 y 38 del cultivo, mientras que los parásitos agrupados no muestran todavía señales de daño el día de la interrupción del cultivo (día 45) (figuras 12a, 12b, 13a, y 13b).

Cuando la concentración del SFB es de 1 y 10 %, los parásitos únicos alcanzan tamaños mayores que los parásitos agrupados durante la segunda mitad del periodo de cultivo, decayendo abruptamente entre los días 25 y 40 (figuras 12c, 12d, 13c y 13d). Los cisticercos únicos de esta etapa presentaban su tegumento totalmente distendido, dando al parásito un aspecto esférico inerte. Al parecer, el aumento en el volumen es una señal de atrofia estructural y de muerte próxima ya que siempre fué seguido

por el colapso abrupto del parásito. Estos cambios no se observaron en los parásitos cultivados en grupos de 4.

Finalmente, en la tabla 4 se compara la movilidad relativa de los cisticercos cultivados en forma individual con la movilidad de los cisticercos agrupados. En ausencia de suero los parásitos cultivados individualmente pierden su movilidad completamente entre los días 5 y 12 de cultivo, mientras que los cultivados en forma agrupada mantienen su movilidad igual a la original hasta por 15 días, manteniéndola, aunque a un nivel menor, hasta el final del cultivo (45 días). El efecto del suero mimetiza el efecto de la densidad. La adición de diferentes concentraciones de SFB favorece el mantenimiento de la movilidad propia de los parásitos, de modo que con 10 % de SFB, los cisticercos agrupados tienen movilidades óptimas hasta el final del cultivo, no así los parásitos únicos, los cuales muestran movilidad óptima sólo hasta el día 22, perdiéndola después casi completamente.

Los datos indican que el estado general de los parásitos (gemación, tamaño, movilidad y sobrevivencia), depende en parte de la densidad de individuos. Así, los cisticercos creciendo en forma agrupada producen más gemas, muestran mayor movilidad, mantienen su estructura física por más tiempo y sobreviven más en cultivo, que los cisticercos creciendo aisladamente en las mismas condiciones. Puesto que todos los experimentos se realizaron en forma simultánea con cisticercos con las mismas características iniciales (2mm de tamaño, sin gemas visibles) y de la misma fuente, los resultados no se deben a variables de origen de los parásitos o de la infección, ni por diferentes condiciones de cultivo.

No se ha mencionado hasta la fecha ningún caso de intercambio de factores promotores del crecimiento entre metacéstodos (Hasseb y Fried, 1988) y la reproducción de éstas se considera como asexual. Sin embargo, los resultados que se muestran aquí permiten especular acerca de la existencia un algún factor dependiente de la densidad de parásitos que actúa para favorecer la reproducción y la sobrevivencia de los cisticercos in vitro.

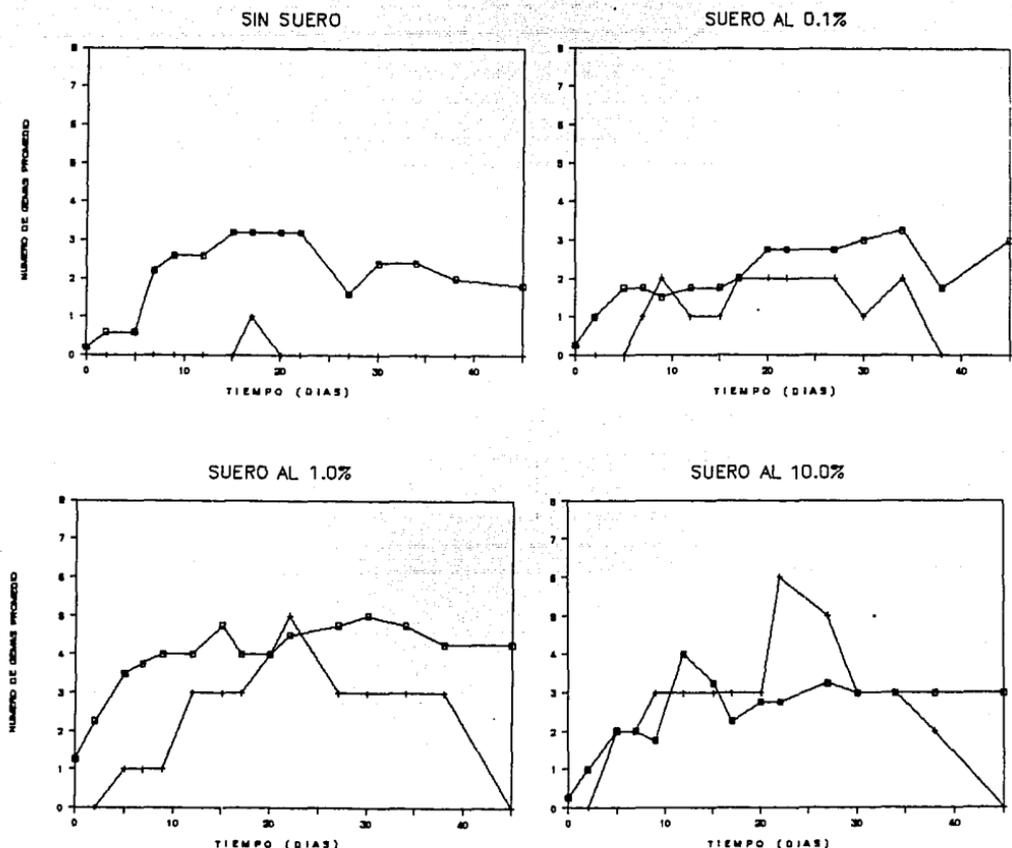
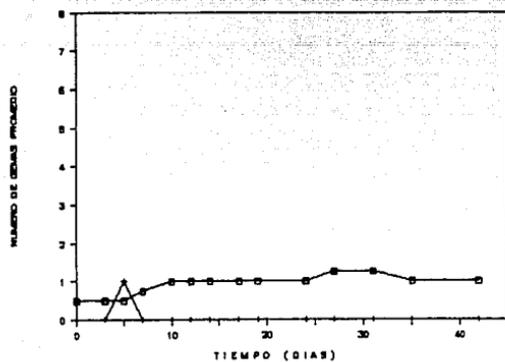
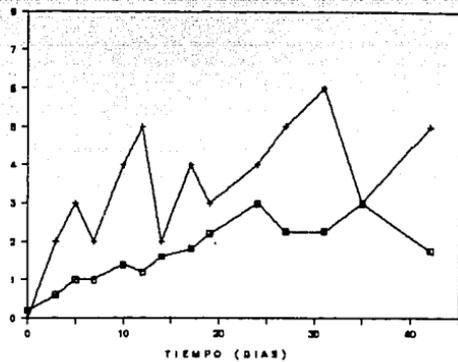


Figura 10. Efecto de la densidad de parásitos sobre la gemación in vitro (Experimento 1). □ 4 cisticercos, + 1 cisticercos.

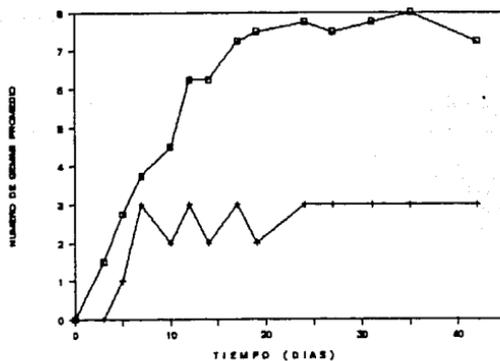
SIN SUERO



SUERO AL 0.1%



SUERO AL 1.0%



SUERO AL 10.0%

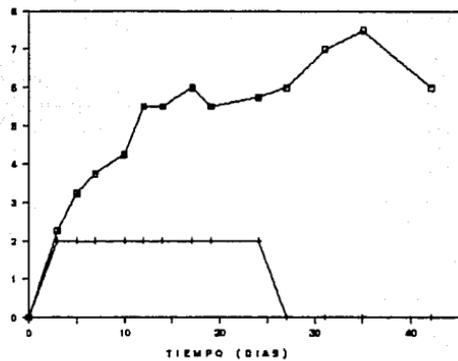


Figura 11. Efecto de la densidad de parásitos sobre la gemación in vitro (Experimento 2). □ 4 cisticercos, + 1 cisticerco.

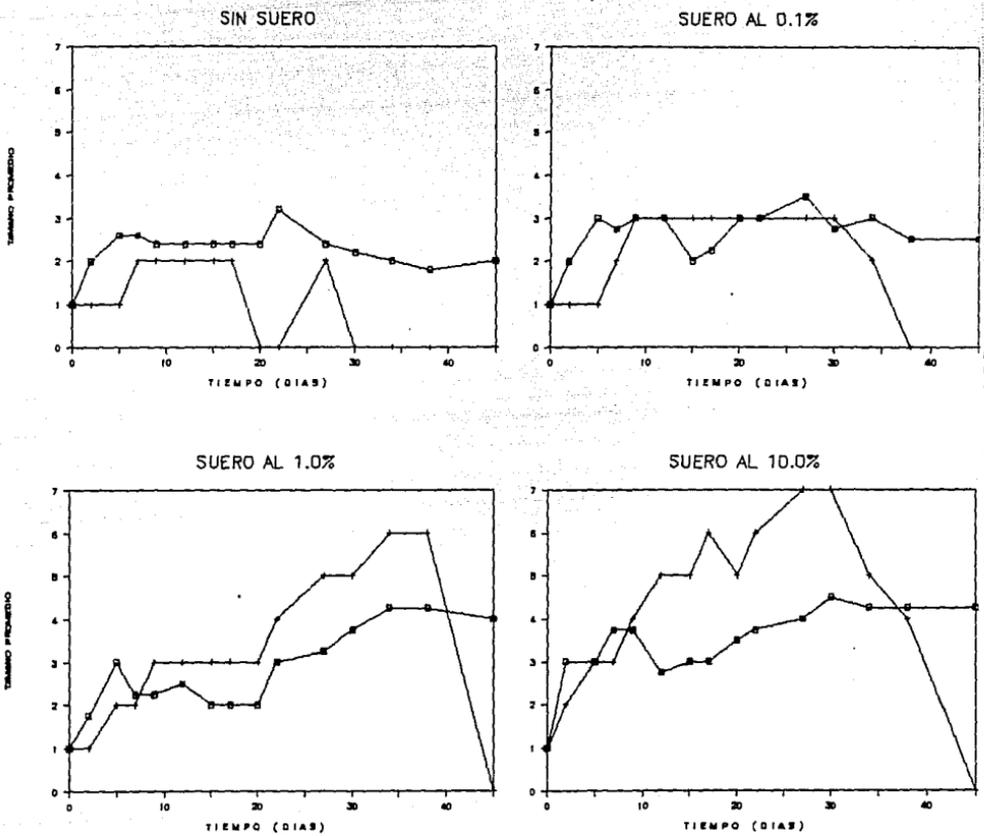
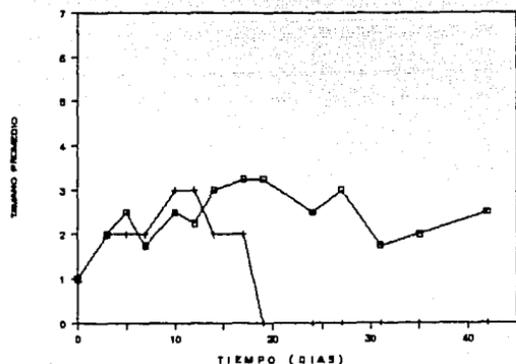
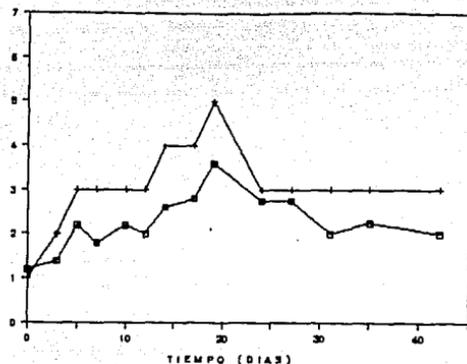


Figura 12. Efecto de la densidad de parásitos sobre su tamaño in vitro (Experimento 1). □ 4 cisticercos, + 1 cisticercos.

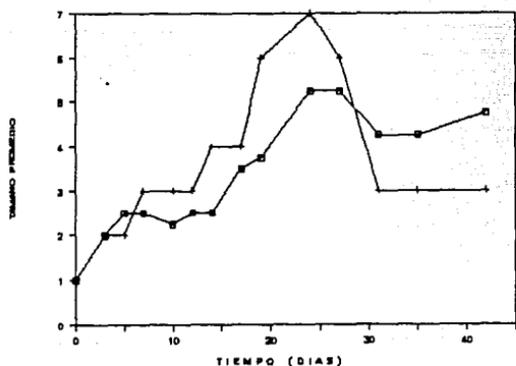
SIN SUERO



SUERO AL 0.1%



SUERO AL 1.0%



SUERO AL 10.0%

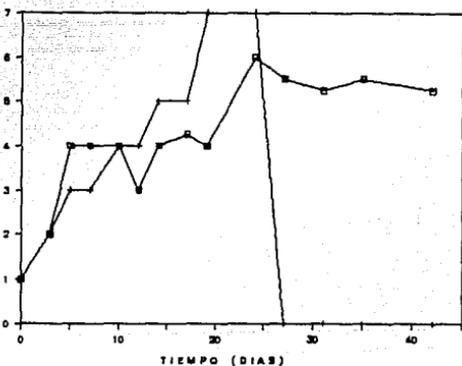


Figura 13. Efecto de la densidad de parásitos sobre su tamaño in vitro (Experimento 2). □ 4 cisticercos, + 1 cisticercos.

Tabla 4. Efecto del suero y de la densidad de parásitos sobre la movilidad<sup>1</sup> de los cisticercos in vitro.

EXPERIMENTO 1

Días	SIN SUERO		SUERO 0.1%		SUERO 1.0%		SUERO 10.0%	
	1 CIST	4 CIST	1 CIST	4 CIST	1 CIST	4 CIST	1 CIST	4 CIST
0	++	++	++	++	++	++	++	++
3	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++
7	-	++	++	++	++	++	++	++
10	-	++	++	++	++	++	++	++
12	-	+	+	+	++	+	+	++
14	-	+	++	++	++	++	++	++
17	-	+	+	+	++	++	++	++
19	-	+	+	+	++	++	+	++
24	-	+	-	+	+	+	-	++
27	-	+	-	+	-	++	+	++
31	-	+	+	+	+	++	-	++
35	-	+	-	+	-	+	-	++
42	-	+	-	+	+	+	-	++

EXPERIMENTO 2

Días	SIN SUERO		SUERO 0.1%		SUERO 1.0%		SUERO 10.0%	
	1 CIST	4 CIST	1 CIST	4 CIST	1 CIST	4 CIST	1 CIST	4 CIST
0	++	++	++	++	++	++	++	++
2	+	++	++	++	++	++	++	++
5	+	++	+	++	++	++	++	++
7	+	++	++	++	++	++	++	++
9	++	++	++	++	++	++	++	++
12	+	++	++	++	++	++	++	++
15	-	++	++	++	++	++	++	++
17	-	+	+	+	++	++	++	++
20	-	+	-	+	++	++	+	++
22	+	+	-	+	++	++	++	++
27	-	+	-	+	++	++	-	++
30	-	-	-	+	+	++	-	++
34	-	+	-	+	+	+	+	++
38	-	+	-	-	-	+	-	++
45	-	+	-	-	-	-	-	++

<sup>1</sup> (++) Movilidad igual a la inicial, (-) movilidad nula, (+) movilidad intermedia.

#### 4. Efecto de la irradiación sobre el sistema inmune de los ratones.

Los ratones se irradiaron de cuerpo entero con una dosis total de 600 rads con una fuente de electrones, dosis considerada como suficiente para inducir una inmunodepresión significativa para el estudio de la función inmune en otras parasitosis (Wakelin y Wilson, 1977).

La figura 14 muestra los cambios en la cantidad de leucocitos sanguíneos en los días posteriores a la irradiación e inoculación de los ratones con 10 cisticercos en la cavidad peritoneal y hasta el final del periodo experimental. Los ratones incluidos en este estudio son hembras y machos, gonadectomizados y no gonadectomizados. Los ratones mostraron leucopenia inmediatamente después del tratamiento, la que continuó por espacio de 14 días en todos los animales y en algunos hasta los 22 días, mientras otros ya habían recuperado cifras normales para entonces. Asimismo, los niveles de anticuerpos anticisticercos en el suero de los ratones no irradiados, fueron aproximadamente el doble de los niveles encontrados en los ratones irradiados al término del experimento (tabla 5).

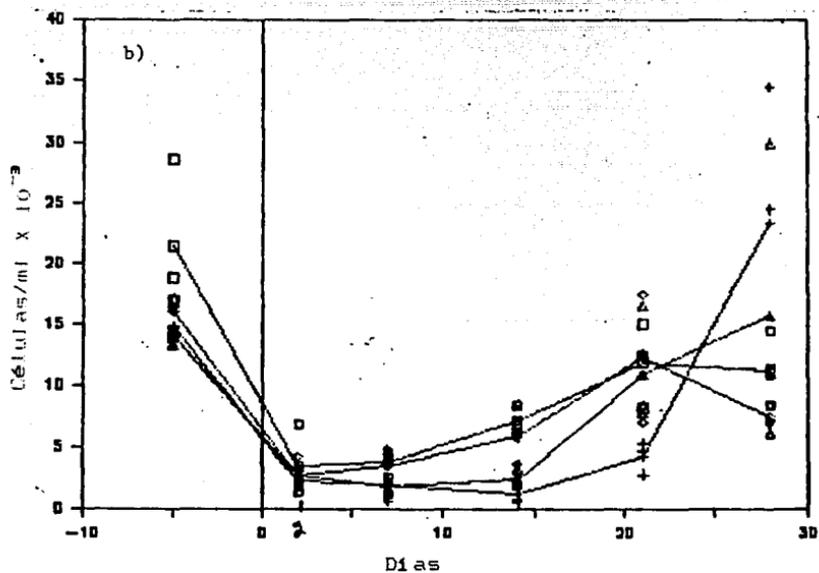
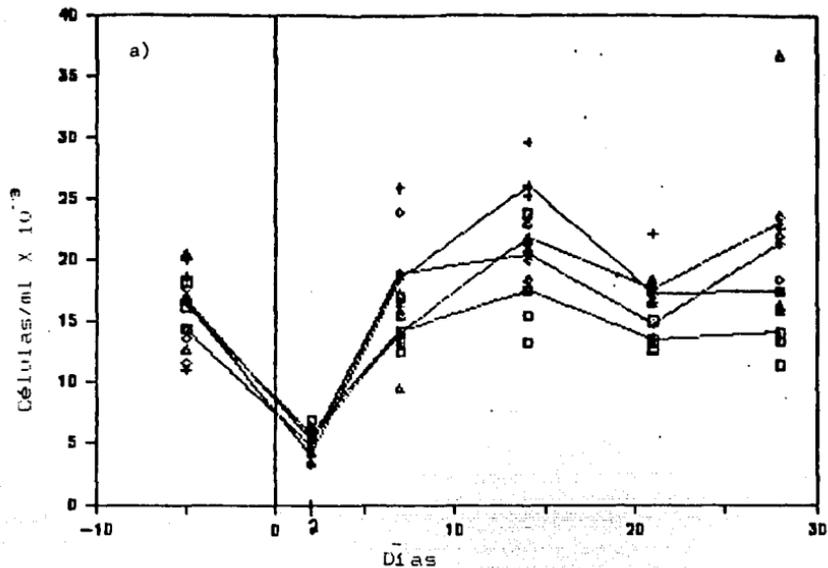


Figura 14. Efecto de la irradiación sobre la cantidad de células blancas en la sangre periférica. La irradiación se efectuó el día 0 y la inoculación con los metacístodos el día 1. a) ratones no irradiados, b) ratones irradiados. Hembras, hembras gonadectomizadas, machos, machos gonadectomizados.

Tabla 5. Nivel de anticuerpos promedio en el suero de ratones irradiados y controles, infectados con metacístodos de T. crassiceps. Las determinaciones se efectuaron por ELISA a los 31 días de la irradiación y 30 de la inoculación.

	Anticuerpos (D.O. a 492nm)	
	Controles	Irradiados
Hembras intactas	829 (10) <sup>1</sup>	547 (10)
Hembras gonadectomizadas	535 (8)	279 (7)
Machos intactos	560 (18)	346 (16)
Machos gonadectomizados	786 (18)	327 (16)

<sup>1</sup> Los números entre paréntesis indican la cantidad de ratones de cada grupo.

##### 5. Efecto de las gónadas sobre el reconocimiento de antígenos del cisticerco por el suero de ratones infectados.

La figura 15 muestra la imagen de los antígenos reconocidos por los anticuerpos del suero de ratones gonadectomizados y no gonadectomizados con infecciones de 30 días de duración.

Un exámen general de la figura 15 muestra inicialmente que el fluido vesicular del cisticerco de *Taenia crassiceps* es una mezcla compleja de antígenos (al menos 33 bandas conspicuas, consideradas en este análisis) y que el reconocimiento de los mismos por el suero de los distintos grupos de ratones es semejante.

Para analizar detalladamente la figura 15, se utilizó un procedimiento gráfico sencillo desarrollado por Larralde y col. (1989) denominado "inmunoplot", el cual se describe en la figura 16. Este procedimiento permite comparar el reconocimiento antigénico de distintos grupos de individuos infectados.

Las figuras 17 a 20, muestran los "inmunoplots" elaborados para comparar la respuesta humoral de ratones hembras y machos, gonadectomizados y no gonadectomizados. Se denominará a cada antígeno según su peso molecular.

La respuesta inmune humoral muestra algunas diferencias cualitativas entre los sexos. Las hembras reconocen algunos antígenos con mayor frecuencia que los machos (antígenos 273, 43, 266, 32, 107 y 18) (figura 17) lo cual puede contribuir a la mayor cantidad de anticuerpos presentes en ellas. En particular, los antígenos 107 y 18 se reconocen exclusivamente por las hembras. Solamente el antígeno 151 se reconoce preferencialmente por los machos, aunque su frecuencia de reconocimiento en éstos no rebasa el 60%.

La ovariectomía no modifica substancialmente el reconocimiento antigénico en las hembras (figura 18). Por lo tanto, los ovarios no parecen influir en el reconocimiento antigénico, sino solo en la cantidad de anticuerpos producidos (tabla 5). En cambio, la gonadectomía induce un aumento en el reconocimiento antigénico por los machos (figura 19), lo cual causa una uniformidad relativa en las frecuencias de reconocimiento antigénico en los machos gonadectomizados y en las hembras gonadectomizadas para la mayoría de los antígenos (figura 20). El antígeno 18, cuyo reconocimiento

es propio de las hembras (intactas o gonadectomizadas), se reconoce en los machos solamente en ausencia de los testículos. Por lo tanto, los testículos influyen no sólo en el nivel cuantitativo de los anticuerpos, sino que además inducen cambios en el reconocimiento antigénico.

Entre los animales gonadectomizados existen diferencias claras entre los sexos con respecto al reconocimiento de ciertos antígenos (107 y 266 en las hembras y 151 y 184 en los machos) (figura 20). Estas diferencias no influyen en la susceptibilidad, puesto que la carga parasitaria de los ratones gonadectomizados, es igual en las hembras y en los machos, pero señalan la existencia de efectos del sexo en la especificidad de los anticuerpos producidos que es independiente de las gónadas, o bien que son producto de modificaciones irreversibles provocadas por éstas, que se manifiestan aún después de la gonadectomía.

Existe un grupo de antígenos altamente inmunogénico cuyo reconocimiento es independiente del sexo y de la gonadectomía. Estos antígenos presentan valores de frecuencia iguales o cercanos a 1 en todos los "inmunoplots" (antígenos 248, 211, 199, 171, 160 y 138).

Las observaciones anteriores están resumidas en la tabla 6.

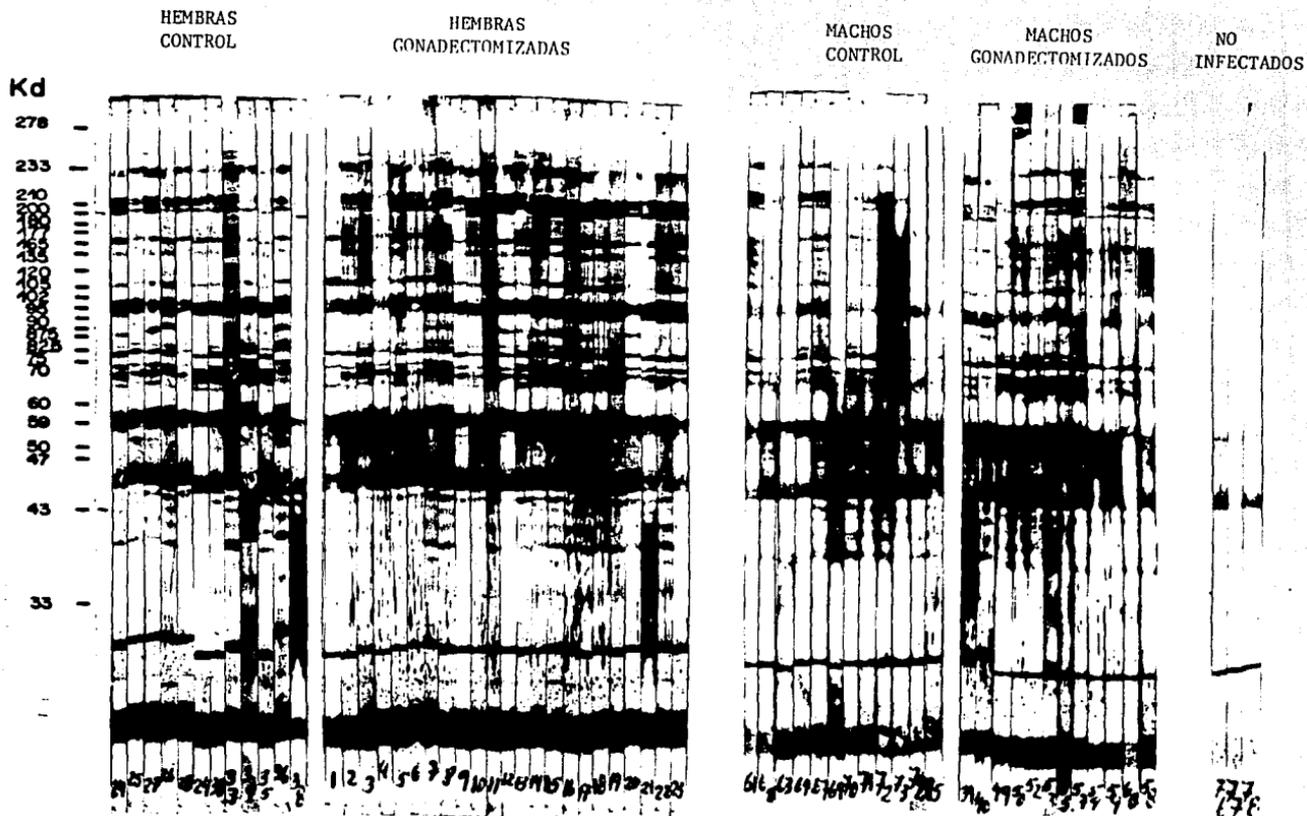


Figura 15. "Western blot" de la reacción del suero de ratones hembras y machos gonadectomizados y no gonadectomizados con antígenos del fluido vesicular de *T. crassiceps*.

## INMUNOLOT DE DIFERENCIAS DE FRECUENCIA

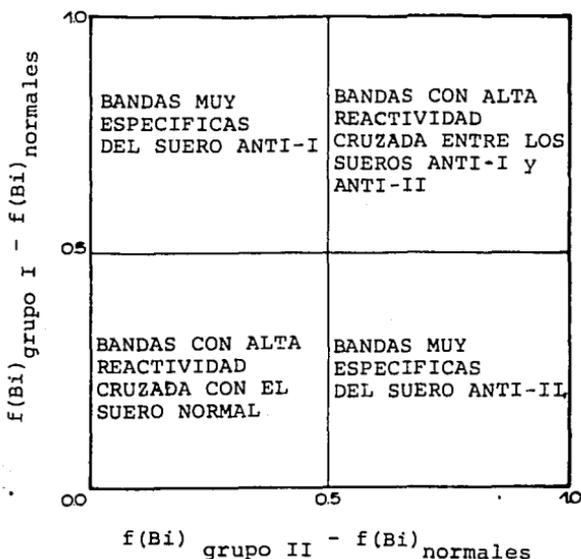


Figura 16: Inmunoplot. Inicialmente se obtiene la frecuencia con la que cada banda reacciona con los sueros de los diferentes grupos de individuos infectados y se resta a éstas la frecuencia de reacción de cada banda con el suero de individuos normales, con el fin de descartar del análisis a los anticuerpos que no son inducidos específicamente por los parásitos. Los resultados se grafican confrontando a los grupos que se desee comparar. La posición de los puntos correspondientes a cada banda en el plano de la gráfica, otorga a cada antígeno un significado inmunológico inmediato. Las bandas con baja frecuencia en un eje pero alta frecuencia en el otro, son antígenos específicamente reconocidos por uno de los dos grupos comparados, de acuerdo con valores de umbral seleccionados arbitrariamente. Las bandas con alta frecuencia en ambos ejes representan antígenos propios de la enfermedad pero igualmente reconocidos por ambos grupos de individuos. Las bandas con frecuencia cero o negativa son de escaso interés para la inmunología de la enfermedad. Si los puntos se distribuyen por todo el plano de la gráfica, es claro que la inmunogenicidad de la mezcla antigénica es heterogénea. La pendiente lineal de la gráfica debe reflejar la existencia de alguna tendencia de los antígenos a reaccionar con un grupo dado de sueros (Tomado de Larralde *et al.* 1989).

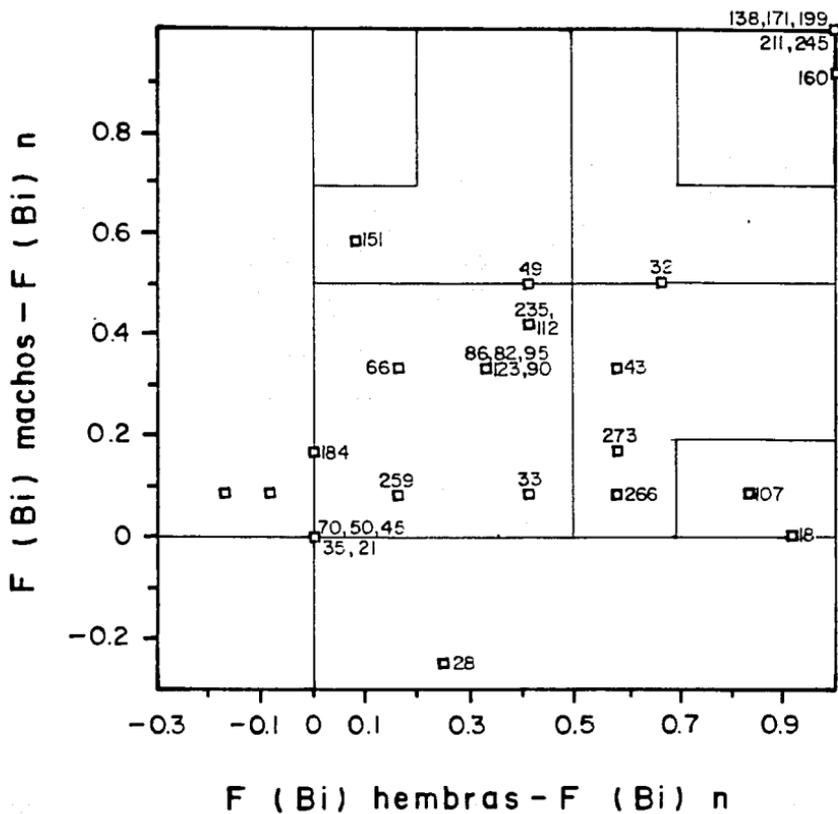


Figura 17. "Inmunoplot" de los sueros de ratones infectados hembras y machos controles (no gonadectomizados) después de reaccionar con los antígenos del fluido vesicular de T. crassiceps.

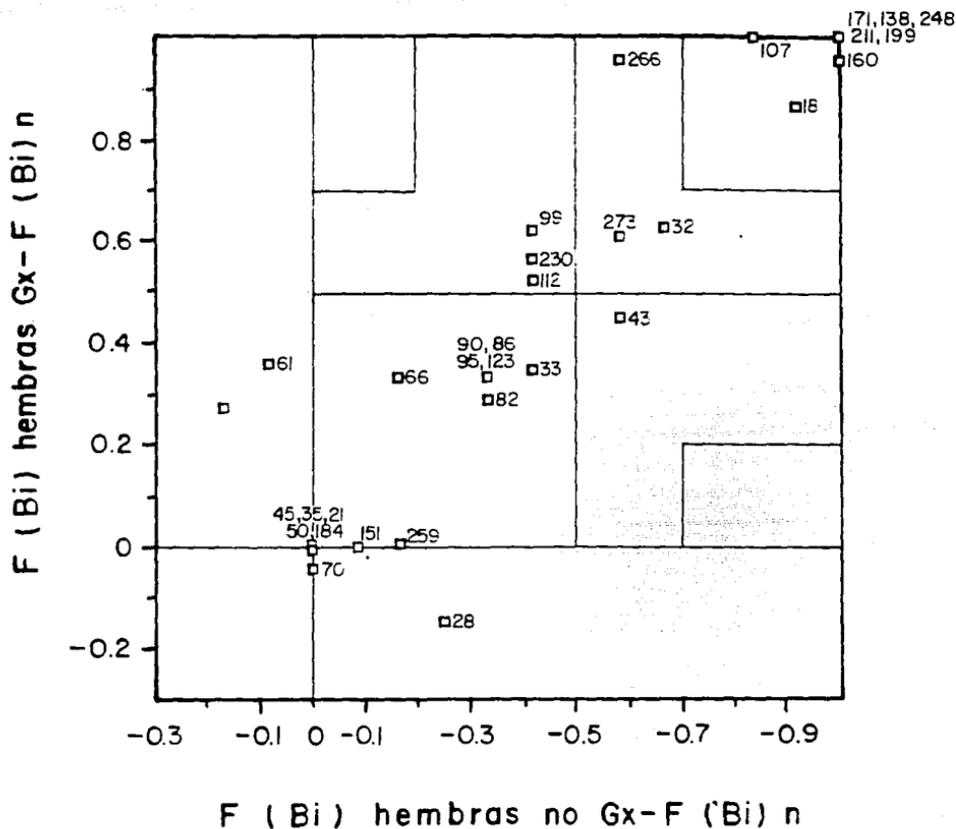


Figura 18. "Inmunoplot" de los sueros de hembras infectadas controles y gonadectomizadas después de reaccionar con los antígenos del fluido vesicular de T. crassiceps.

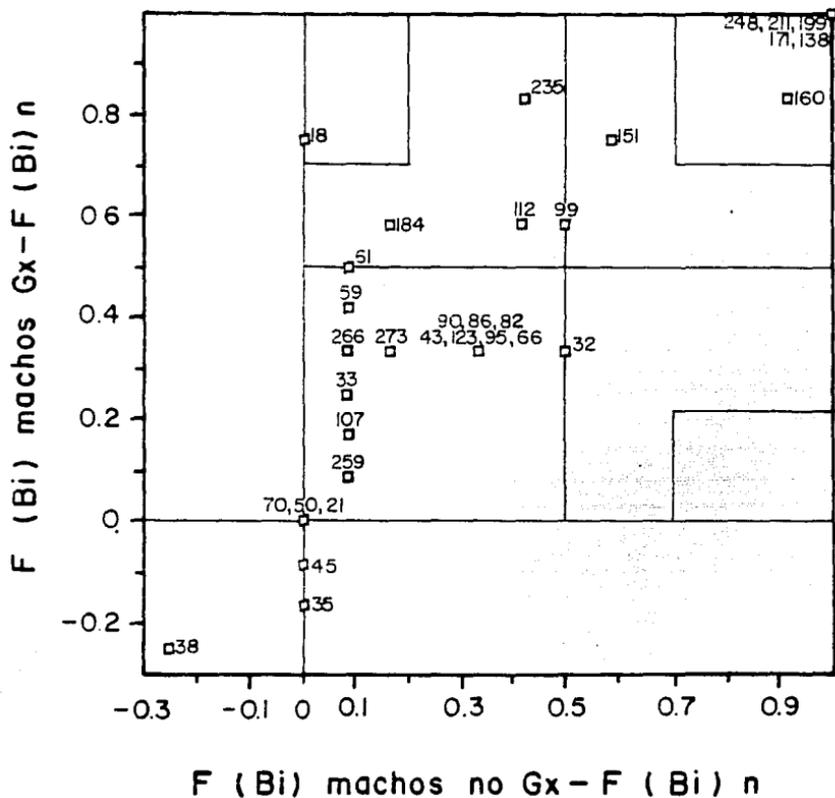


Figura 19. "Inmunoplot" de los sueros de machos infectados controles y gonadectomizados después de reaccionar con los antígenos del fluido vesicular de T. crassiceps.

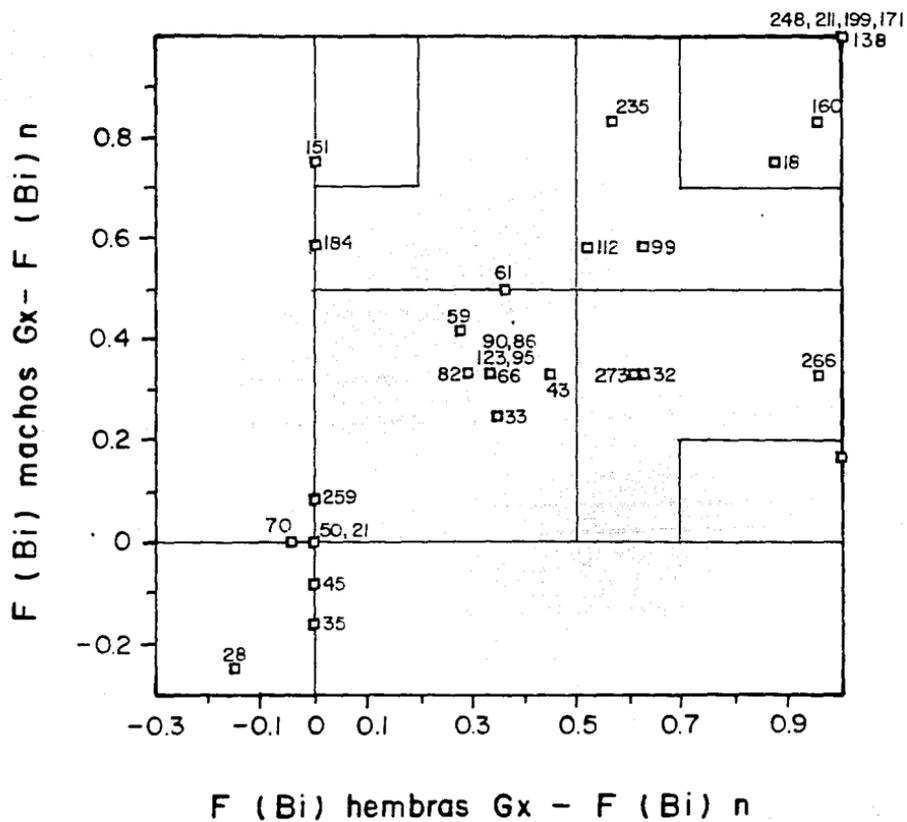


Figura 20. "Inmunoplot" de los sueros de hembras y machos infectados y gonadectomizados después de reaccionar con los antígenos del fluido vesicular de *T. crassiceps*.

Tabla 6. Análisis, por inmunoelectrotransferencia, del reconocimiento de antígenos del cisticerco por el suero de ratones gonadectomizados y no gonadectomizados con infecciones de 30 días de duración con cisticercos de Taenia crassiceps.

	Antígenos*	Frecuencia	
		en hembras	en machos
Propios de machos	151	.08	.58
Propios de hembras	107	.83	.08
	18	.92	0
	273	.58	.17
	266	.58	.08
	43	.58	.33

Efecto de la gonadectomía

	Antígenos	Frecuencia	
		en hembras Gx	en machos Gx
Propios de machos Gx	151	0	.75
	184	0	.58
Propios de hembras Gx	266	.96	.33
	107	1	.17
	273	.61	.33
	40	.62	.33
Propios de hembras Gx y machos Gx.	18	.87	.75

Antígenos con alta frecuencia de reconocimiento independiente de las gónadas.

Antígenos	Frecuencia	
	en hembras	en machos
248	1	1
211	1	1
199	1	1
171	1	1
160	1	.92
138	1	1

\* Peso molecular de cada antígeno.

## V. DISCUSION GENERAL

La asociación entre la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y el sexo del hospedero se observa para una variedad de organismos incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoarios y metazoarios (Ahmed, Penhale y Talal, 1985). En general, las diferencias en el grado de infección entre hembras y machos son muy notables, lo cual subraya la importancia de los factores relacionados con el sexo como determinantes de la susceptibilidad (Apéndice 2). En la mayor parte de los casos estudiados, los parásitos se desarrollan preferencialmente en los hospederos machos (Apéndice 2).

En el caso de la cisticercosis murina causada por el metacéstodo de Taenia crassiceps existe una diferencia de susceptibilidad muy marcada entre los ratones de distinto sexo, siendo las hembras más susceptibles que los machos (Freeman, 1962; Culbreth, 1972; Sciotto, 1989).

En este trabajo se confirman dichas observaciones y se demuestra que la gonadectomía afecta significativamente la susceptibilidad de ratones púberes (5 semanas) en la cepa susceptible Balb/c, disminuyendo a la mitad la susceptibilidad de las hembras y aumentando hasta tres veces la de los machos, en infecciones experimentales de 30 días de duración. Como resultado, la gonadectomía iguala la susceptibilidad de los ratones de ambos sexos (Sección III).

La diferencia de susceptibilidad asociada al sexo y el efecto de la gonadectomía en la cisticercosis murina por T. crassiceps puede estudiarse a la luz de los conocimientos sobre la estrecha relación existente entre los sistemas inmune y endócrino (Paavonen, Anderson y Adlercreutz, 1981; Ahmed, Penhale y Talal, 1985; Grossman, 1984; Bateman et al., 1989; Blalock, 1989) (Apéndice 2). No obstante, es importante explorar la posibilidad de que las hormonas del hospedero ejerzan efectos directos sobre los cisticercos, en vista de que algunos parásitos pueden captar y manifestar efectos de hormonas o neurotransmisores (Mansour, 1984; Chung, Parish y Bone, 1986; Kiser, Prish y Bone, 1986) (Apéndice 2). Nuestros resultados indican que el estrógeno, la progesterona

y la testosterona no influyen de manera significativa en el desarrollo del parásito in vitro.

La posible participación del sistema inmune en la susceptibilidad asociada al sexo en la cisticercosis por T. crassiceps fué observado por Sciuotto y col. (1989), quienes mostraron que la vacunación con un extracto del cisticerco, indujo mayor protección en machos que en hembras tanto en cepas resistentes como susceptibles.

Para examinar con detalle el papel del sistema inmune en la susceptibilidad asociada al sexo a la cisticercosis por T. crassiceps, se evaluó el efecto de la irradiación sobre la carga parasitaria de ratones hembras y machos gonadectomizados e intactos. Los resultados muestran que el efecto de la gonadectomía sobre la carga parasitaria, esto es, la diferencia entre el número de cisticercos en animales gonadectomizados y no gonadectomizados, solamente se manifiesta en presencia del sistema inmune íntegro. Por lo tanto, el aparato inmunocompetente aparece como el sistema mediador que determina la diferencia de susceptibilidad a la cisticercosis asociada al sexo.

Las conclusiones principales de este estudio se muestran en la figura 20. En ésta, la eliminación de las flechas laterales indica que las hormonas sexuales del hospedero no afectan significativamente a los parásitos en forma directa. En cambio, el esquema señala que el sistema inmune es el medio de influencia de las gónadas sobre los parásitos. El papel inmunoestimulador del ovario ilustrado en el esquema 20 se basa en las observación de que las hembras son mas susceptibles a la cisticercosis y que la inmunodepresión no modifica la susceptibilidad de las hembras intactas. Si el aparato inmunocompetente de las hembras se encuentra inhibido *per se*, se puede asumir que la irradiación ya no aumenta su grado de depresión; en cambio, las hembras gonadectomizadas presentan un sistema inmune activo que limitaría el crecimiento de los cisticercos y, en este caso, la irradiación efectivamente aumenta la carga parasitaria en ausencia del ovario. Por otra parte, es factible que factores testiculares estimulan los eventos de inmunidad contra los cisticercos, dado que los machos son el sexo menos susceptible y que la inmunodepresión de

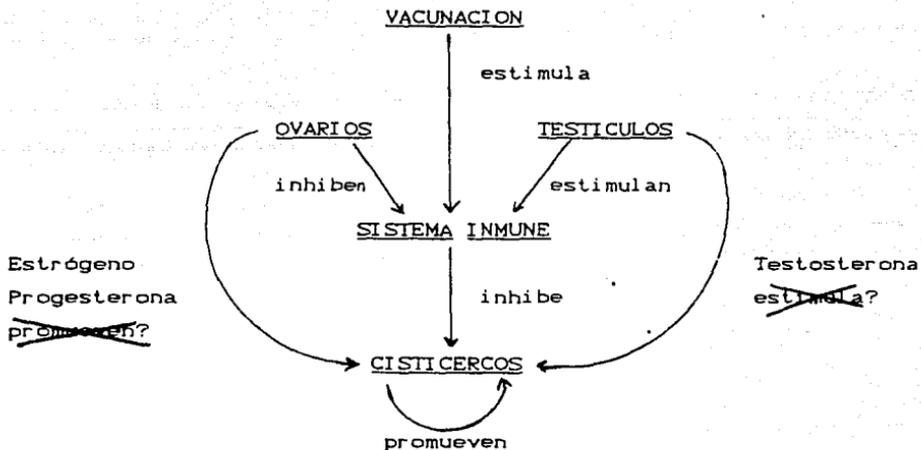


Figura 21: Esquema de interacciones gónadas-sistema inmune en la cisticercosis murina por Taenia crassiceps.

los animales intactos efectivamente induce aumento de la carga parasitaria. En los machos gonadectomizados, en los que el aparato inmunocompetente no está estimulado, la irradiación no añade ningún efecto sobre la velocidad de infección. El efecto neto de la interacción gónadas-sistema inmune es inhibitorio, dado que la vacunación disminuye la carga parasitaria en ambos sexos, pero protege más a los machos que a las hembras (Sciutto, 1989). Se indica también la señal promotora de crecimiento que los mismos cisticercos parecen emitir. Aunque preliminares, nuestras observaciones en este sentido muestran que los cisticercos cultivados en forma agrupada producen mayor número de gemas, tienen mejor movilidad, conservan su estructura física por más tiempo y sobreviven por periodos mayores en cultivo que las larvas cultivadas aisladamente en las mismas condiciones. No existen reportes acerca del intercambio de factores de crecimiento entre larvas de céstodos (Hasseb y Fried, 1988). Sin embargo, los resultados descritos aquí permiten especular acerca de factores dependientes de la densidad de parásitos que favorecen la reproducción y la sobrevivencia de los cisticercos in vitro.

Las evidencias disponibles indican que los anticuerpos no tienen un papel determinante en la protección de los ratones contra la cisticercosis por T. crassiceps (Chernin, 1977; Sciutto et al., 1990). Nuestras observaciones de los niveles de anticuerpos en ratones gonadectomizados e infectados apoyan esta hipótesis. A niveles mayores de anticuerpos no corresponden cantidades menores de parásitos; más bien, el nivel de anticuerpos se mantiene en proporción directa con el número de parásitos recuperados de la cavidad abdominal (tabla 5), indicando que la presencia continua de los cisticercos en la cavidad peritoneal estimula la producción de anticuerpos, pero que éstos son irrelevantes para el control de la infección. Si, como nuestros datos lo indican, el sistema inmune media el efecto de las gónadas sobre los cisticercos, los fenómenos de inmunidad que operan en la determinación de la susceptibilidad a la cisticercosis por T. crassiceps, deben ser fundamentalmente de carácter celular.

No obstante que los anticuerpos no parecen participar en la determinación de la susceptibilidad dependiente del sexo, la

respuesta inmune humoral muestra algunas diferencias cualitativas entre los sexos. Los sueros de las hembras reconocen algunos antígenos con mayor frecuencia que el suero de los machos, lo cual puede contribuir a la mayor cantidad de anticuerpos observados en las primeras. La ovariectomía no modifica substancialmente el reconocimiento antigénico de las hembras. En cambio, en los machos la gonadectomía induce un aumento en el reconocimiento de diversos antígenos. En particular un antígeno (p.m.  $\approx$  18 kd), cuyo reconocimiento es propio de las hembras (intactas o gonadectomizadas), es reconocido por los machos solamente después de la orquidectomía.

La influencia de factores hormonales de origen gonadal sobre el sistema inmune se ha señalado como la causa fundamental de las diferencias de susceptibilidad asociadas al sexo (Grossman, 1984; Ahmed, Penhale y Talal, 1985; Alexander y Stimson, 1988). En general se considera que la capacidad de respuesta inmune de los machos es menor que la de las hembras y numerosas observaciones acerca de la mayor susceptibilidad de los machos a infecciones de diversos tipos parecen confirmar esta aseveración (Miller, 1965; Frayha et al., 1971; Dobson y Owen, 1978; Charniga et al., 1981; Reddington et al., 1981; Alexander y Stimson, 1988; Mock y Nacy, 1988; Wonderlich, et al., 1988; Nakanishi et al., 1989). En éste contexto, la cisticercosis por T. crassiceps constituye un caso de excepción, al igual que la infección causada por el metacéstodo de Taenia multiceps (Esch, 1966), en la cual el tratamiento con corticoesterona aumenta la velocidad de infección de ratones machos y no altera la velocidad de infección de los ratones hembras. En ambos tipos de cisticercosis, es probable que factores propios del parásito influyan en forma significativa en el curso de la infección. Este aspecto no se descarta en el estudio presente y señala la importancia de estudiar la susceptibilidad desde un enfoque integrativo de las interacciones sistema inmune - sistema endócrino - parásito.

## VI. CONCLUSIONES

1. La gonadectomía afecta significativamente la susceptibilidad de los ratones hembras y machos en infecciones experimentales de la cepa susceptible Balb/c con metacístodos de Taenia crassiceps, disminuyendo la susceptibilidad de las hembras y aumentando la de los machos. Como resultado, la gonadectomía iguala la susceptibilidad entre los sexos en el ratón.

2. El estrógeno, la progesterona y la testosterona no afectan significativamente el desarrollo de los parásitos in vitro.

3. El efecto de las gónadas sobre la susceptibilidad solamente se manifiesta en presencia de un sistema inmune íntegro y no en ratones inmunodeprimidos por irradiación. Por lo tanto, el sistema inmune media la influencia de las gónadas sobre el crecimiento parasitario.

4. Se propone que los ovarios tienen un papel inhibitorio de la inmunidad contra los cisticercosis de Taenia crassiceps, mientras que los testículos ejercen un efecto estimulador de la misma .

5. Los cisticercos cultivados en forma agrupada se desarrollan y multiplican más y mejor que los cisticercos cultivados individualmente, por lo que la densidad de parásitos parece ser un factor significativo para su mejor crecimiento in vitro.

6. Se fortalece la hipótesis (Sciutto, 1990) de que los anticuerpos no tienen un papel determinante en la protección de los ratones contra la cisticercosis por Taenia crassiceps.

7. El reconocimiento de antígenos del cisticerco por el suero de los ratones hembras y machos es diferente (analizado por inmunoelectrotransferencia). La gonadectomía modifica el reconocimiento antigénico solamente en los machos.

## VII. APENDICES

### APENDICE 1

#### Cisticercosis murina causada por Taenia crassiceps. Aspectos biológicos e inmunológicos.

La cisticercosis experimental murina inducida por inoculación intraperitoneal de los metacéstodos (cisticercos) de la Taenia crassiceps, constituye un modelo excelente para el estudio de los diferentes aspectos de la relación hospedero-parásito. Esta parasitosis en muchos aspectos es semejante a la cisticercosis causada por los metacéstodos de Taenia solium, el cisticercos que invade al hombre y al cerdo y que se presenta como un severo problema económico y de salud pública en países subdesarrollados de Asia, Africa y América (Flisser y Larralde, 1986).

Como en otras parasitosis, el metacéstodo de T. crassiceps causa una infección de naturaleza crónica, durante la cual el parásito se multiplica constantemente sin afectar la sobrevivencia del hospedero. Por lo tanto, la relación del parásito con el hospedero debe implicar interacción con diversos sistemas orgánicos que dé como resultado una relación equilibrada entre ambos organismos.

Antes de abordar la revisión de las investigaciones referentes a la inmunobiología de la cisticercosis por T. crassiceps, en la presente revisión se señalarán primero los aspectos fundamentales de la biología del parásito, por ser estos de primera importancia para la comprensión del fenómeno global de la cisticercosis.

#### Biología del parásito.

Taenia crassiceps (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un gusano platelminto de la Clase Cestoda que vive en el intestino de las zorras rojas de Europa y de Norteamérica. Aunque las zorras son sus hospederos principales, Taenia crassiceps suele encontrarse ocasionalmente en otros cánidos como lobos, coyotes y perros. Las



Fig. 1. Cisticerco de T. crassiceps con el escólex invaginado; se observan tres de las cuatro ventosas. No se aprecian los ganchos debido al nivel del corte (Cortesía de la Dra. M.T. Rabiela).

características biológicas de éste céstodo han sido extensamente estudiadas por Freeman (1962, 1964, 1973). El gusano mide de 70 a 140 mm. de largo y 2.4 mm. en su parte más ancha.

El escólex (región anterior adaptada para adherirse al tejido intestinal del hospedero) presenta 4 ventosas y un rostelo o corona constituida por dos anillos formados por 32 a 36 ganchos rostelares de base ancha, lo cual es una característica típica de la especie (Figs 1 y 2).

Cysticercus longicollis (Rudolphi, 1819), es el estado larval de Taenia crassiceps. Sus hospederos los constituyen pequeños roedores de Europa y Norteamérica, los cuales adquieren la infección a través de la ingestión de huevecillos dispersos en el medio ambiente provenientes de heces fecales de cánidos infectados. Dentro del roedor, los huevecillos se transforman en cisticercos y comienzan un proceso de reproducción presuntamente asexual, que consiste en la producción continua de gemas por los cisticercos maduros. Las gemas se convierten en nuevos cisticercos que a su vez inician otro ciclo de gemación. Cuando un roedor con cisticercosis es devorado por un predador cánido, los cisticercos se instalan en el intestino de éste y se desarrollan en la forma adulta.

Las tenias alcanzan la madurez sexual 5 a 6 semanas después

de haber ingresado al intestino de zorras y perros, periodo después del cual comienzan a producir huevecillos infectivos (Freeman, 1962), cerrando de este modo el ciclo de vida de Taenia crassiceps.

La capacidad de gemación del cisticerco como forma de reproducción en roedores, ha hecho posible su mantenimiento por inoculación intraperitoneal seriada en animales de laboratorio, inicialmente en ratones (Freeman, 1962) y posteriormente en ratas (Blair y Campbell, 1976; Sally, Chou y Freeman, 1976).

El proceso general de desarrollo del metacéstodo en un ratón después de la ingestión natural de huevecillos es como sigue: los jugos digestivos del animal remueven la cápsula estriada del huevecillo y permiten la liberación del embrión u oncosfera, la cual mide aproximadamente 0.02 mm. de diámetro y posee 3 pares de ganchos. El embrión emigra a través de los tejidos del hospedero hasta el sitio donde va a instalarse para alcanzar un desarrollo ulterior, generalmente en las cavidades pleural o subcutánea y ocasionalmente en la cavidad abdominal. Una vez instalado, el embrión se transforma en un cisticerco con un escólex incipiente en un extremo. En este momento, el metacéstodo comienza a producir gemas exógenas por el lado opuesto al escólex (abscólex). Cuando se coloca en solución salina, la larva eventualmente sufre evaginación de la zona del escólex; en condiciones de cultivo in vitro se ha logrado el desarrollo del cisticerco hasta un estado estrobilar, con formación de poros genitales (Esch y Smith, 1975). La morfología de las diferentes etapas del desarrollo del metacéstodo se ilustran en las Figs. 2 y 3.

La velocidad de multiplicación del parásito no es la misma en todos los sitios en que se desarrolla la infección. El crecimiento es varias veces mayor en la cavidad intraperitoneal que en las cavidades subcutánea y pleural en infecciones mantenidas hasta por 550 días (Freeman, 1962); por esta razón, la inoculación intraperitoneal en ratones ha sido seleccionada por muchos investigadores para fines experimentales. Adicionalmente, la infección en la cavidad peritoneal permite la producción de una gran cantidad de cisticercos libres, los cuales provocan el ensanchamiento del abdomen de los ratones en infecciones de larga

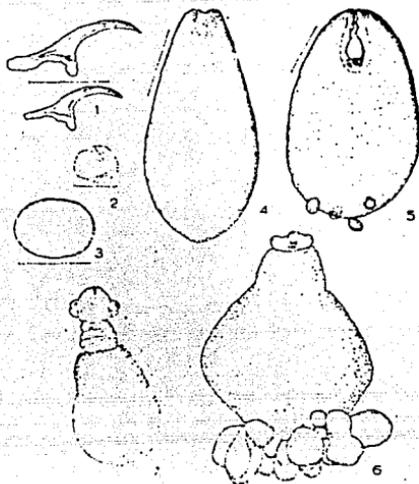


Fig. 2: Etapas del desarrollo del metacéstodo de *T. crassiceps*. (Valor de la escala entre paréntesis): 1) Ganchos rostelares (0.1 mm.); 2) Embrión (0.02 mm.); 3) Vesícula joven (0.5 mm.); 4) Cisticerco joven (0.5 mm.); 5) Cisticerco con gemas (0.5 mm.); 6) Cisticerco totalmente gemante (Unidad gemante) (Tamaño de las barras 1.0 mm.); 7) Cisticerco evaginado (Tomado de Freeman, 1962).

duración. Los parásitos pueden obtenerse y cuantificarse directamente en cuanto a su número y volumen total para evaluar el progreso de la enfermedad (Larralde, et al., 1988) (Fig. 4).

Actualmente, varios laboratorios mantienen en existencia algunas "cepas" o variedades del cisticerco de *T. crassiceps*. ORF, la cepa más antigua, aislada en 1952 (Freeman, 1962), es una variedad anormal debido a que raramente produce escoleces y los escoleces producidos son anormales. Esta característica se ha acentuado en el tiempo mientras la cepa se ha transferido de ratón en ratón (Dorais y Esch, 1969), y es la causa probable de que no sea infectiva en perros. En 1972, Smith, Esch y Kuhn, registraron que la cepa ORF presenta aberraciones cromosómicas y la caracterizaron como una mutante aneuploide. Para fines experimentales, la cepa ORF es la más usada debido a que es la que presenta la mayor velocidad de reproducción en ratones.



Fig. 3. Imagen de un cisticerco gemante en microscopía electrónica de barrido. (Cortesía de la Dra. M.T. Rabiela).

Otras cepas de T. crassiceps son: KBS, aislada en 1965 por Dorais y Esch (1969), presenta anomalías frecuentes en el escólex y es posible que no sea infectiva para cánidos (Schiller, 1973); Toi, obtenida por Freeman (1962) a partir de parásitos de marmota; ERS, obtenida por una infección en ratas a partir de parásitos de ratón; HYG, aislada en 1974 por infección de un ratón con huevecillos obtenidos de una zorra y DEB, aislada de un ojo humano en 1972 (Freeman, et al., 1973).

La ultraestructura básica del cisticerco de T. crassiceps ha sido estudiada en detalle por Baron (1968), quien describió una estructura tegumental sincitial con la superficie externa modificada para formar prolongaciones o microtricos, los cuales contienen cilindros de microfilamentos típicos (Belton, 1977). También se ha descrito la presencia de vesículas pinocíticas y heterofagolisosomas como evidencia de actividad endocítica en el tegumento (Threadgold y Dunn, 1983).



Fig. 4 Medición del volumen ocupado por los cisticercos. La determinación del volumen se facilita por la estructura macroscópica del parásito.

El tegumento posee un glucocálix rico en carbohidratos ácidos que se sintetizan en el citoplasma y se traslocan a la superficie tegumentaria. Este material se recambia rápidamente (Trimble y Lumsden, 1975).

#### Inmunobiología

La participación de eventos de inmunidad en la cisticercosis murina por T. crassiceps constituye un factor muy importante en la determinación del curso de la enfermedad. Esto se ilustra con los estudios de Simmons, Sierbert y Good (1980), quienes demostraron que la inyección subcutánea de tres larvas, tres semanas antes de un desafío intraperitoneal, provoca una resistencia substancial a la reinfección en ratones. Asimismo, Larralde y col. (1988) mostraron que la vacunación con un extracto antigénico un mes antes del desafío intraperitoneal, disminuye la susceptibilidad a la enfermedad en una forma dependiente de la dosis. Por lo tanto,

la entrada del parásito o de elementos del mismo en el hospedero provoca el desarrollo de una inmunidad concomitante que se manifiesta por una resistencia relativa (y frecuentemente absoluta) al reestablecimiento de la infección.

Estudios tempranos también mostraron que la resistencia a la infección de los hospederos hembras es menor que la de los hospederos machos, tanto en ratones (Freeman, 1964; Culbreth, 1972; Chernin, 1975), como en ratas (Blair y Campbell, 1976). Otras parasitosis de naturaleza diversa también muestran diferencias de susceptibilidad relacionada al sexo del hospedero (ver Apéndice 2); en la mayoría de ellas la resistencia de las hembras es superior, por lo que la cisticercosis por T. crassiceps constituye una excepción a esta observación general.

Los mecanismos efectores precisos de la inmunidad protectora a T. crassiceps no han sido del todo aclarados, si bien se ha mencionado la participación de eventos de inmunidad tanto celular como humoral.

La respuesta inmune a nivel intestinal después de la ingestión de huevecillos no ha sido abordada aún para esta especie. En el caso de T. taeniaeformis, Musoke, et al. (1975), comprobaron que es posible la protección pasiva de animales neonatales por medio de anticuerpos calostrales y Lloyd y Soulsby (1978) descubrieron que la IgA de las secreciones intestinales de ratones infectados protege pasivamente contra la infección con huevecillos. Por lo tanto, la inmunidad secretoria limita la penetración de las oncosferas de T. taeniformis en los tejidos del hospedero ya al nivel intestinal.

Cuando la infección se vuelve crónica, las larvas ya han desarrollado totalmente sus mecanismos de protección y los eventos de inmunidad que las afectan son probablemente diferentes a los que operan en estados mas tempranos. Es importante entender estos procesos porque las reacciones celulares alrededor de cisticercos degenerados a menudo son responsables tanto de los efectos patogénicos de las infecciones, como de las lesiones asintomáticas que causan pérdidas económicas en animales domésticos.

Gran parte de las investigaciones se efectúan por transferencia de metacístodos de un hospedero a otro y a menudo estos parásitos se mantienen sin acudir a la infección inducida

por huevecillos. Aunque este procedimiento induce probablemente un patrón diferente de respuesta inmune, estos estudios son importantes porque la patogénesis de muchas infecciones por larvas de céstodos se deben en gran medida a la proliferación, aparentemente no restringida, de las larvas (Rickard y Williams, 1982).

Se ha considerado como relevante el papel que la respuesta inmune humoral juega en la protección del huésped contra infecciones parasitarias en ratón. Tal es el caso de T. taeniaeformis (Mitchell, *et al.*, 1980; Gibbens, *et al.*, 1986), T. saginata (Harrison y Parkhouse, 1985), Schistosoma mansoni (James y Cheever, 1985) y Trichuris muris (Else y Walkelin, 1989). Sin embargo, la importancia de los anticuerpos en la protección contra las larvas de T. crassiceps aún no ha sido definida.

Recientemente, Zakroff y col. (1989) estudiaron la producción de diferentes subclases de inmunoglobulinas en el suero de ratones inoculados con T. crassiceps, Nippostrongylus brasiliensis, Mesocestoides corti y Trichinella spiralis. Los cuatro parásitos indujeron preferencialmente el aumento rápido y considerable de IgE e IgG1 en el suero conforme avanzó el tiempo de infección. En particular, T. crassiceps indujo aumentos menores, pero importantes de IgM e IgG3, en cambio, no afectó los niveles de IgG2a, IgG2b e IgA. Los anticuerpos específicos antiparásito se encontraron en las fracciones de IgG1 e IgG2. Por otra parte, la inoculación subcutánea de los metacéstodos indujo un aumento de IgE 10 veces menor del observado en la inoculación intraperitoneal al cabo de 60 días de infección.

Leid y Williams (1974, 1975), propusieron un papel para la IgE cuando describieron una fuerte respuesta de anticuerpos reagénicos en el suero durante la infección con T. taeniaeformis y T. pisiformis en conejos. Ellos encontraron que aunque la IgE no fué esencial para la transferencia pasiva de protección con suero en ratas, la presencia de este anticuerpo mejoró el grado de protección alcanzado. Los autores propusieron que la IgE puede aumentar la permeabilidad vascular en la vecindad de la larva por inducción de la degranulación de células cebadas y la liberación de aminas vasoactivas. Este proceso permitiría mayor disponibilidad de anticuerpos y acumulación de células inflamatorias en este sitio.

Siebert y Good (1978) mostraron que la respuesta del hospedero a la infección primaria con larvas de T. crassiceps, causa la destrucción de cierto número de metacístodos aparentemente por un mecanismo humoral, ya que los parásitos dañados no presentaron células del sistema inmune en contacto con la superficie de la larva. Los indicios morfológicos del daño larval fueron: vacuolización del tegumento, pérdida del glucocálix, reducción en el número de mitocondrias y microtricos, acumulación de vacuolas secretorias y alteración marcada de la morfología nuclear. El daño al tegumento fue atribuido a la lisis mediada por complemento y el resto de las alteraciones se consideraron resultado de ésta. La muerte de los parásitos es mayor cuando se trata de una infección secundaria e involucra una fase temprana en la que ocurre daño larval en ausencia de células adherentes; posteriormente las larvas que resistieron el daño temprano son encapsuladas con participación de macrófagos, eosinófilos y células cebadas (Siebert, Good y Simmons, 1979). La incubación de cisticercos en presencia de suero inmune de ratón ocasiona daños al tegumento semejantes a los observados en aquellas larvas en la fase temprana del daño in vivo. La lesión a los parásitos fué independiente de complemento y el mecanismo preciso del daño no ha sido aclarado (Siebert y Good, 1979,1980).

Mediante la detección de anticuerpos anti-T. crassiceps por doble inmunodifusión en gel, Chernin (1977) mostró que el número de bandas de precipitina de complejos antígeno-anticuerpo aumenta con el tiempo de infección, indicando que el contacto continuo entre los parásitos y el hospedero estimula la respuesta humoral, pero ésta no es efectiva contra los parásitos. Por otra parte, Sciuotto y col. (1989) mostraron que niveles más altos de anticuerpos se encuentran en animales con mayor cantidad de parásitos. Al comparar los niveles de anticuerpos y la carga parasitaria de animales de una cepa susceptible (H-2d) y una cepa resistente (H-2b) y de hembras y machos, se observa que la mayor cantidad de inmunoglobulinas se producen en los animales más susceptibles, es decir, en la cepa con H-2d y en las hembras. La transferencia de suero inmune de animales vacunados de las cepas resistente y susceptible no transfiere protección contra el parásito. Por consiguiente, la respuesta humoral, al parecer, no

es parte del mecanismo de inmunidad protectora o bien no lo es en forma exclusiva, sino en asociación con eventos de naturaleza celular. También existe la posibilidad de que los anticuerpos jueguen un papel favorable para el crecimiento del parásito (Sciutto, et al., 1989). El concepto de que la larva en desarrollo se vuelve resistente al ataque temprano de los anticuerpos es consistente con las conclusiones de Ali-Khan (1974) con Echinococcus multilocularis y de Musoke y colaboradores (1975) con Taenia taeniaeformis, de que los anticuerpos por sí solos no afectan a la larva totalmente desarrollada. Por otra parte, se sabe que los céstodos contienen sustancias anti-complemento (Hammerberg, et al., 1976). Husted y Williams (1977), usando larvas de T. taeniaeformis de 42 a 63 días de edad y larvas de T. crassiceps de 3 a 4 meses de edad, encontraron que la permeabilidad de las larvas incubadas en suero inmune in vitro estaba alterada y que la alteración fué causada por complemento. Los autores sugirieron que la larva libera a su vecindad factores anti-complemento in vivo.

La inmunidad dependiente de células T en enfermedades parasitarias es un evento bien conocido y se ha observado principalmente con el uso de ratones desnudos hipotímicos (nu/nu). Estos animales son más susceptibles a infecciones por céstodos (T. taeniaeformis, Mesocestoides corti, Hymenolepis nana e Hymenolepis diminuta), memátodos (Nippostrongylus brasiliensis, Nematosporoides dubius, Aspicularis tetraptera, etc.) y protozoarios. Adicionalmente, los ratones hipotímicos son incapaces de desarrollar resistencia eficiente a la reinfección (Mitchell, 1980).

La participación de eventos de inmunidad celular en la cisticercosis por el metacéstodo de T. crassiceps en ratas, ha sido documentada por Anderson y Griffin (1979), mediante la transferencia de inmunidad con células de nódulo linfoide. Aunque no se excluye la transferencia de células B contaminantes, éste estudio sugiere firmemente que las células T están involucradas en la protección de los animales receptores, ya que el suero de los donadores no transfirió inmunidad pasivamente.

Estudios de Freeman (1964) mostraron el desarrollo de un alto grado de eosinofilia y leucocitosis general, junto con una

disminución en el número de células cebadas en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inoculados con un cisticerco. Este fenómeno se observó también en la sangre periférica, aunque en menor grado. Al parecer los machos desarrollan la eosinofilia antes que las hembras y, en general, los animales que desarrollan más rápido la eosinofilia, consiguen abatir a los parásitos con más éxito. El aumento local de eosinófilos durante una infección subcutánea alcanza niveles mucho más altos (50-81%) que en una infección peritoneal (9-21%). Esta observación podría estar relacionada con el crecimiento limitado de los parásitos cuando se instalan subcutáneamente. La inoculación oral con 5000 huevecillos de T. crassiceps provoca niveles semejantes de eosinofilia a aquellos desarrollados en infecciones intraperitoneales (Freeman, 1964).

Existe una asociación bien conocida entre eosinófilos e infecciones helmínticas y en algunas de éstas los eosinófilos actúan como células efectoras. Tal es el caso de las infecciones por Trichinella spiralis, Strongyloides ratti y Schistosoma mansoni. Con frecuencia el daño producido por los eosinófilos es dependiente de IgE e IgG. Cuando las infecciones se vuelven crónicas, los eosinófilos se vuelven menos prominentes alrededor de los parásitos vivos (Kay, 1985). Al parecer, los eosinófilos juegan un papel relevante en el ataque al parásito en las etapas infecciosas iniciales y en la encapsulación de parásitos muertos (como en el caso de S. mansoni). Su importancia como célula efectora parece decrecer conforme avanza el tiempo de infección. En el caso de la cisticercosis por T. crassiceps, los parásitos sobreviven en muchos ratones, especialmente hembras, que habían presentado eosinofilia pronunciada (Freeman, 1964). El autor señala que si los eosinófilos están involucrados en la muerte de los metacéstodos, no actúan sobre ellos directamente o no actúan solos en el proceso de destrucción, ya que se observan pocos eosinófilos en la cápsula de células que rodea a los parásitos muertos tempranamente. Por otra parte, la cisticercosis se desarrolla aún en aquellos animales que desarrollaron alta eosinofilia peritoneal.

La habilidad de las larvas para evadir la respuesta inmune es una condición inevitable para su transmisión exitosa. De hecho,

una vez que el parásito ha superado las etapas iniciales de la respuesta inmune que limitan su instalación, es capaz de proliferar y eventualmente invade la cavidad intraperitoneal del ratón. El examen histológico de la cavidad intraperitoneal de un ratón con infección avanzada, no demuestra evidencias de inflamación ni necrosis tisular. En esta etapa, la presencia de células del sistema inmune está limitada principalmente a unas pocas células mononucleares localizadas en el área límite entre la masa de parásitos y la membrana peritoneal del ratón u órganos internos. No hubo células entre uno y otro parásito. Estas observaciones indican una muy limitada respuesta inmune en relación a la masa de parásitos en infecciones avanzadas (Haselgrove, et al., 1987).

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que se han documentado para céstodos incluyen: modificación antigénica, enmascaramiento de antígenos de superficie, mimetismo molecular (solo en el caso de S. mansoni), supresión de la respuesta inmune, instalación en sitios inmunológicamente aislados, interferencia directa con el sistema de defensa del hospedero (por inhibición de las enzimas del hospedero, efectos sobre la movilidad y viabilidad celular, efectos sobre la diferenciación de células, disminución de la eficiencia fagocítica y consumo no específico de complemento), (documentado en Rickard y Williams, 1982).

En el caso de T. crassiceps se ha mencionado ya la capacidad de producción de factores anti-complemento por parte de la larva. Existen registros de otros procesos de posible importancia en la protección de la larva. Por técnicas de inmunofluorescencia se han detectado varias clases de inmunoglobulinas unidas a la superficie de parásitos de infecciones de larga duración, (IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3). La fluorescencia, al principio uniforme sobre la superficie del parásito, se pierde sucesivamente por incubación a temperatura ambiente, pero no a 4<sup>o</sup>C, indicando un proceso de cambio o "muda" del tegumento larval (Siebert, et al., 1981). Este fenómeno, que se observa también en otros parásitos helmínticos (Kemp, et al., 1977; Vetter y Klaver-Wesserling, 1978), sugiere que las inmunoglobulinas específicas y no específicas adheridas al tegumento se remueven en el proceso de recambio del glucocálix. El posible papel funcional de este

fenómeno en la protección del parásito al ataque por anticuerpos del hospedero es un aspecto aún no aclarado.

Por otra parte, se ha encontrado producción disminuída de anticuerpos anti-eritrocitos de borrego por animales infectados con metacéstodos de T. crassiceps, sugiriendo una depresión de la intensidad de la respuesta inmune como resultado de la presencia de los cisticercos. El efecto es más notable cuando los ratones presentan mayor cantidad de parásitos (Good, et al., 1982). La inyección subcutánea de una suspensión concentrada de material vesicular de membrana arrojado al medio por cisticercos mantenidos "in vitro", es capaz de inducir eosinofilia peritoneal y resistencia a un desafío intraperitoneal con parásitos. Adicionalmente, la inoculación de este material de antígenos excretorios-secretorios (ESA), induce disminución del nivel de anticuerpos anti-eritrocitos de borrego en el suero de ratones inoculados con el antígeno. La depresión de la producción de anticuerpos anti-eritrocitos ocurre solamente cuando los metacéstodos se encuentran instalados en la cavidad peritoneal y no ocurre cuando se encuentran subcutáneamente; probablemente esto es debido al confinamiento de los parásitos en una cápsula de tejido del hospedero cuando se ubican en esta localización (Good, et al., 1982).

SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIONES PARASITICAS ASOCIADA  
AL SEXO DEL HOSPEDERO

De entre los diversos aspectos involucrados en la relación hospedero-parásito, la asociación entre la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y el sexo del hospedero, es un tópico documentado ampliamente en la actualidad y abarca infecciones por virus, bacterias, hongos, protozoarios y metazoarios. Generalmente la diferencia de susceptibilidad entre los hospederos machos y hembras son muy notables, lo cual señala la gran importancia de factores relacionados con el sexo del hospedero en la determinación de la susceptibilidad. Las investigaciones realizadas en este campo tienen como punto de partida tres observaciones fundamentales:

- 1.- el dimorfismo sexual en la susceptibilidad,
- 2.- la alteración del patrón de infección por gonadectomía y preñez y
- 3.- la modificación de la susceptibilidad por tratamiento del hospedero con hormonas sexuales.

El cuadro 1 presenta una lista de enfermedades parasitarias debidas a protozoarios y metazoarios en las que se ha registrado susceptibilidad diferencial relacionada con el sexo del hospedero, incluyendo las observaciones referentes respecto al efecto de la gonadectomía y el tratamiento con hormonas. En ella se observa lo siguiente:

1.- En el 75% de los casos, las hembras son el sexo mas resistente y los machos el mas susceptible; en el resto de los casos enlistados, los machos son mas susceptibles o bien ninguno de los sexos lo es.

2.- La susceptibilidad a las infecciones se modifica con la gonadectomía. En general, los machos orquidectomizados se vuelven mas resistentes y las hembras ovalectomizadas mas susceptibles, o bien la ovalectomía no afecta la susceptibilidad.

3. El tratamiento del hospedero con hormonas sexuales tiene los mismos efectos en todos los casos enlistados: la testosterona

disminuye la resistencia mientras que el estrógeno la aumenta.

Al parecer, el ambiente hormonal de las hembras favorece el desarrollo de los parásitos y\o el ambiente hormonal de los machos lo inhibe.

#### Efectos de las hormonas sexuales mediados por el sistema inmune.

Dado que las hormonas sexuales tienen una gama amplia de efectos que modifican la constitución fisiológica y bioquímica de tejidos muy diversos, la explicación de las causas del dimorfismo sexual en la susceptibilidad a infecciones parasitarias puede ser compleja. Actualmente, este fenómeno se ha encontrado relacionado con diferencias en la respuesta inmune determinadas por la influencia de hormonas sexuales sobre el aparato inmunocompetente del hospedero.

Existe una correlación entre la modificación de la respuesta inmune debida a hormonas y la susceptibilidad al establecimiento de parásitos. La respuesta inmune muestra dimorfismo sexual y es afectada tanto por la gonadectomía como por la aplicación de esteroides sexuales. También se modifica durante la preñez, cuando la cantidad de hormonas sexuales aumenta. (Alexander y Stimson, 1988).

Los estudios respecto al efecto de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune, conforman un cuadro general que aún es complejo e incompleto, pero las evidencias disponibles indican que el estrógeno mejora la inmunidad humoral e inhibe la inmunidad mediada por células, mientras que los andrógenos, al igual que la progesterona, tienden a suprimir ambos tipos de respuesta (Grossman, 1985).

El timo es un blanco primario de las hormonas sexuales. Este órgano es mas pesado en hembras que en machos y se atrofia progresivamente durante el proceso de envejecimiento después de la pubertad. Durante la preñez el timo se reduce y después de la lactancia vuelve a ganar peso (Ito y Hoshino, 1962). Kendal y Twigg (1981) encontraron fluctuaciones estacionales en el peso del timo en un tipo de roedor silvestre; el órgano pierde peso durante

la estación de apareamiento cuando las concentraciones de testosterona en el plasma son altas recuperándose al final de dicha estación. Greenstein y col (1985) demostraron que la orquidectomía puede restaurar en gran medida el timo de ratones "viejos"; esta regeneración se inhibe por tratamiento de los ratones con testosterona. Por otra parte, animales timectomizados muestran reducciones en los niveles séricos de progesterona, estrógeno, hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona de crecimiento (GH) (Rebar y Morandini, 1982). La timectomía neonatal produce disgénesis ovárica, probablemente a través de la regulación de la liberación de LH por la hipófisis. Estos y muchos otros estudios han llevado a la proposición de un modelo de interacción hormonal que contempla la existencia de un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas-timo, de modo que el sistema reproductor puede regular al sistema inmune y viceversa (Grossman, 1985).

El efecto de las hormonas sexuales se observa también en otros sitios del sistema inmune además del timo. El estrógeno dietilstilbestrol administrado a ratones timectomizados neonatalmente, reduce el número de células T en el bazo y la reacción de hipersensibilidad retardada (Kalland, 1980). Los estrógenos actúan también sobre el sistema macrófago/monocito, aunque existe discrepancia respecto a la naturaleza de este efecto (Ahmed, 1985). La actividad de las células NK también es sensible a estrógeno, tanto in vivo como in vitro (Ferguson y McDonald, 1985). Por otra parte, después de la castración la masa de los nódulos linfáticos periféricos y del bazo aumenta (Castro, 1974).

Con respecto a la respuesta inmune humoral, muchos estudios demuestran que la producción de inmunoglobulinas es mayor en hembras que en machos. Paavonen y col. (1981), demostraron que dosis fisiológicas de estrógeno, pero no de testosterona, estimulan la acumulación de inmunoglobulina y de células secretoras de anticuerpos inducida por mitógenos en cultivos de linfocitos sanguíneos tanto de hombres como de mujeres. Cuando se fraccionaron las células se demostró que el estradiol no afecta directamente a las células B, sino que inhibe el efecto de una población de linfocitos T supresores. Más tarde se demostró la existencia de receptores a estrógenos en células T periféricas

OKT8 positivas (supresoras/citotóxicas). Receptores a andrógenos estuvieron ausentes (Cohen *et al.*, 1983).

Puesto que, en general, las hembras son el sexo menos susceptible a enfermedades parasíticas, las hormonas femeninas estimularían los eventos de inmunidad que participan en el ataque a los parásitos, mientras que las hormonas masculinas deprimirían estos eventos. En forma general, esto parece suceder efectivamente. No obstante, es indudable que la manera en que se manifiesten los efectos de las hormonas sexuales (y de otras hormonas) sobre el sistema inmune serán variables dependiendo de las condiciones de una infección por un organismo particular. En el caso de las enfermedades parasíticas, a diferencia de lo que sucede en otros tipos de infección, la masa del organismo del parásito ofrece al sistema inmune una superficie no fagocitable y la infección es de naturaleza crónica. A pesar de estas condiciones, las bases funcionales de los distintos casos de susceptibilidad a parásitos mediada por las gónadas no se han estudiado en forma detallada.

Por otra parte, los esteroides sexuales no son la única clase de hormonas que afectan al sistema inmune. La relación de los sistemas neuroendócrino, endócrino e inmune conforman una red compleja de interacciones cuya organización funcional aún no ha sido aclarada. La conclusión del estudio de estas interacciones es que el sistema nervioso central está involucrado en la respuesta inmune. Diversas hormonas como la ACTH (hormona adrenocorticotrópica), endorfinas, encefalinas, TSH (hormona estimulante de la tiroides), GH (hormona de crecimiento), somatostatina, vasopresina, oxitocina, insulina y glucocorticoides poseen efectos depresores o estimuladores de la función de linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos y células NK. Las funciones afectadas incluyen la síntesis de linfocinas, monocinas, anticuerpos e IFN; la diferenciación y proliferación de células T y B; la fagocitosis y la liberación de factores quimiotácticos e inflamatorios (Blalock, 1989).

Actualmente se reconoce que el sistema inmune puede regular a su vez las funciones neuroendócrinas (Blalock, 1989). Esta afirmación se basa en los descubrimientos acerca del efecto de interleucinas y monocinas en el sistema neuroendócrino, como la

acción del  $IFN\alpha$  y/o  $\beta$ , el cual estimula la esteroidogénesis adrenal, induce la síntesis de melanina, excita neuronas y produce analgesia y catalepsia; la timosina  $\alpha 1$ , que eleva los niveles de ACTH y glucocorticoides; la timosina  $\beta 4$ , que es capaz de mediar la liberación de ACTH y endorfinas por la hipófisis, así como de producir aumento de los niveles de glucocorticoides. Por otra parte, se sabe actualmente que células del sistema inmune pueden sintetizar hormonas peptídicas como ACTH, GH, prolactina, tirotrópina,  $\beta$ -endorfina, somatostatina, oxitocina, TSH, VIP (péptido intestinal vasoactivo) y gonadotropina coriónica (Blalock, 1989).

En este contexto, el problema de la influencia de factores gonadales sobre el desarrollo de diversas parasitosis, a través del sistema inmune, es un aspecto que se ubica en un esquema mas amplio que abarca un sistema de relaciones entre los aparatos neuroendócrino, endócrino e inmune del hospedero, con el parásito. Estas relaciones pueden involucrar efectos bidireccionales entre los elementos participantes, como se ilustra en la figura 1.

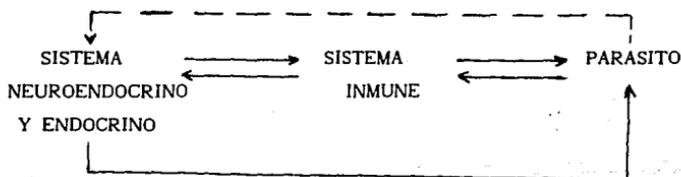


Fig. 1

Dado que el parásito estimula los mecanismos de inmunidad del hospedero y las células del sistema inmune a su vez producen sustancias con capacidad de afectar directamente al sistema endócrino, no sería sorprendente que el balance hormonal del individuo infectado fuera alterado por el parásito a través del sistema inmune. Este tipo de efectos están bien estudiados en el caso de infecciones microbianas y otros fenómenos de daño agudo, como daño a tejidos y procesos inflamatorios (Dinarello, 1984). El

conjunto de efectos se conoce como "respuesta de fase aguda" y estan mediados en gran medida por la actividades múltiples de la interleucina 1 (IL-1) liberada por macrófagos activados antigénicamente. Estas modificaciones se caracterizan por cambios en funciones metabólicas, endocrinológicas, neurológicas e inmunológicas. Las alteraciones hormonales incluyen aumento en el nivel de hormonas de gran importancia metabólica como la insulina, glucagon, hormona de crecimiento, hormona estimulante de la tiroides, vasopresina y glucocorticoides (Keush y Farthing, 1986; Dinarello, 1984). La IL-1 tambien estimula la liberación de ACTH y endorfinas. A nivel metabólico la "respuesta de fase aguda" involucra aumento en el catabolismo de proteínas, carbohidratos, lípidos y movilización de minerales. Estos cambios parecen responder, por una parte, al aumento de los requerimientos del sistema inmune, y por otra, a la necesidad de restringir la disponibilidad de algunos nutrientes para los microorganismos invasores. Estas modificaciones son generalmente acompañadas por fiebre, (la cual incrementa la velocidad metabólica casi 13% por °C) causada por las propiedades pirogénicas de la IL-1 a nivel hipotalámico.

Es obvio que las reacciones del organismo del hospedero durante la "respuesta de fase aguda" son completamente drásticas. En el caso de enfermedades parasitarias, la naturaleza crónica propia de las infecciones implica necesariamente que las condiciones fisiológicas del hospedero sean tales, que permitan una relación equilibrada entre el parásito y el hospedero. Un ejemplo es el caso de la triquinosis murina causada por larvas de Trichinella pseudospiralis. Stewart y col. (1988) han propuesto que esta infección podría ser un caso de modulación de la respuesta inmune por parte del parásito a través del sistema endócrino. Las larvas de T.pseudospiralis son parásitos no enquistados que causan una infección muscular cuya característica es una fuerte inhibición de la respuesta inflamatoria causada por el aumento de los niveles de corticoesterona plasmática; este fenómeno no se observa en infecciones por las larvas si encapsuladas de T. spiralis. La adrenalectomía provocó enteritis, miositis y miocarditis en ratones con T. pseudospiralis, causando la muerte del 100% de los ratones infectados, pero no causó

mortalidad entre los ratones infectados con T. spiralis. Una hipótesis es que, en ausencia de una cápsula protectora alrededor de la larva muscular, T. pseudospiralis asegura sus sobrevivencia y la de su hospedero suprimiendo la respuesta inflamatoria por inducción de la liberación de glucocorticoides por la glándula adrenal. Los autores proponen que T. pseudospiralis modula la respuesta inmune del hospedero directa o indirectamente alterando la función neuroendócrina (flecha punteada superior de la figura 1) o influyendo en algún aspecto de la comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendócrino e inmune, probablemente a través de la capacidad de alguna linfocina para liberar ACTH del tejido hipofisiario.

#### Otros factores involucrados en la susceptibilidad dependiente del sexo.

Como se señaló anteriormente, si bien la influencia de las hormonas sexuales sobre los parásitos a través del sistema inmune es una hipótesis fundamentada en la gran cantidad de información referente a la interacción entre los sistemas inmune y endócrino, las bases funcionales *per se* de los numerosos casos de patrones de infección determinados por el sexo han sido muy poco analizadas.

El curso de un proceso parasítico particular está potencialmente sujeto a la influencia de otros factores, de los cuales algunos de los más importantes se mencionan a continuación:

1.- La naturaleza y fisiología de los tejidos u órganos ocupados por el parásito en el hospedero (Kiyota et al., 1984; Sciotto et al., 1989).

2. El estado fisiológico del hospedero, (como el estado nutricional o de estrés) (Keusch y Farthing, 1986; Williams, et al., 1981).

3. El tipo de respuesta inmune desarrollada (Mitchell, 1979).

4.- El tamaño del inóculo (Mitchell, et al., 1980).

5.- La susceptibilidad genética del hospedero (Wakelin, 1985; Alexander y Stimson, 1988).

6.- La edad del hospedero (Burse, 1977; Greenfield, 1942).

7.- Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el

parásito (Rickard y Williams, 1982).

Estos factores deben tomarse en cuenta al estudiar la susceptibilidad asociada al sexo, especialmente en aquellos casos en los que las hembras son el sexo más susceptible o bien en los que ninguno de los sexos muestra mayor susceptibilidad, como en el caso de Hymenolepis diminuta, Taenia multiceps y Taenia crassiceps.

Un ejemplo de la importancia de los factores antes mencionados es el de la infección cutánea con Leishmania major (Giannini, 1986). Los ratones machos de la cepa B10.129 (10M) son relativamente resistentes al desarrollo de úlceras cutáneas mientras que las hembras de la misma cepa sufren de ulceraciones muy severas que algunas veces les causan la muerte. Las hembras infectadas desarrollan títulos de anticuerpos anti-leishmania mas altos y menor respuesta de hipersensibilidad retardada que los machos. En la leishmaniasis cutánea la inmunidad protectora está mediada por células mas que por anticuerpos, por lo que los altos títulos de anticuerpos en las hembras no evitan el progreso de la enfermedad. En este caso, el efecto del sexo del hospedero sobre una clase particular de respuesta inmune protectora vuelve a las hembras mas susceptibles a la leishmaniasis que los machos. Por otra parte, las diferencias en la respuesta a la infección no son tan marcadas en los ratones de la cepa altamente susceptible Balb/cJ, en la cual son fuertemente atacados por la enfermedad tanto los machos como las hembras (Giannini, 1986), recalcando la importancia de los factores genéticos en la influencia del sexo en la susceptibilidad.

Las hormonas sexuales pueden tener un papel en la inmunidad natural. Un ejemplo es el de la infección experimental de ratones con Strongyloides rattii, en la cual los machos son el sexo mas susceptible (Kiyota, et al., 1984). La ruta de migración de las larvas de S. rattii es: tejido conectivo subcutáneo → cavidad craneal → porción naso-frontal → intestino delgado. La infección experimental se realizó inyectando las larvas subcutáneamente y la enfermedad se evaluó por el número de gusanos adultos recuperados del intestino o el número de huevecillos expulsados con las heces. La orquidectomía reduce marcadamente la susceptibilidad, mientras que la ovariectomía no tiene ningún

efecto (Tabla 1, Apéndice 1). El tratamiento de hembras o machos orquidectomizados con testosterona, aumenta la susceptibilidad a la infección. Sin embargo, cuando se implantaron gusanos adultos directamente en el intestino de los ratones, la cantidad de huevecillos expulsados en los días subsiguientes, así como la cantidad de gusanos que permanecieron en el intestino, fué igual en ambos sexos. Las diferencias relacionadas al sexo observadas con la infección subcutánea se presentaban dentro de las primeras 24 horas después de la inoculación, por lo cual es poco probable la participación de una respuesta inmune específica dado que en el curso de la infección por S. rattii, los anticuerpos o linfocitos sensibilizados se generan a estados mas tardíos de la infección; tampoco se observó infiltración masiva de células inflamatorias en las fases migratorias tempranas. Los autores proponen que el mayor contenido de colágena dermal en los machos puede hacer al tejido cutáneo masculino más susceptible a la penetración del tercer estado larval (Kiyota et al., 1984).

Los efectos inhibitorios de la castración sobre la susceptibilidad de ratas machos infectadas con Hymenolepis diminuta están ligadas a modificaciones bioquímicas en el organismo del parásito tendientes a la reducción general de su nivel metabólico (Daugherty, 1956). Estos cambios incluyen disminución de la síntesis de glucógeno, reducción de la transaminación (con el subsecuente bloqueo de la síntesis de proteínas) y aumento de la deposición de grasa en el parásito (la acumulación de lípidos se realiza también en varios tejidos del hospedero como resultado de la orquidectomía). Estos efectos podrían estar relacionados con la disminución en la capacidad del parásito para establecerse en el intestino después de la castración de la rata. No se conoce si las modificaciones bioquímicas son debidas a efectos del sistema inmune sobre Hymenolepis o a otros efectos hormonales, pero su observación enfatiza la necesidad de examinar todos los aspectos involucrados en la modificación de la susceptibilidad determinada por las gónadas.

En ciertos casos se ha encontrado que los tejidos de algunos parásitos son capaces de unir hormonas sexuales marcadas radioactivamente. Kiser et al. (1986), demostraron que el

sobrenadante de una preparación de tejidos del nemátodo de cabras Trichostrongylus colubriformis contiene proteínas que pueden unir progesterona, estrógeno y estradiol, las cuales fueron detectadas por isoelectroenfoque del sobrenadante que previamente se incubó con las hormonas marcadas. El análisis de los tejidos del nemátodo mostró que la testosterona forma el 0.02% del peso seco de gusanos obtenidos de cabras machos, pero es solamente el 0.005 % en los obtenidos de cabras hembras. La progesterona fué el 0.005% del peso seco de los helmintos de hembras y no se detectó en gusanos de machos. El recobramiento diferencial de testosterona y progesterona de gusanos obtenidos de hospederos de distinto sexo, indica que T. colubriformis podría obtener los esteroides del hospedero. No se detectaron esteroides en el quimo de las cabras, sugiriendo que los helmintos podrían tener un sistema de captación de los mismos. Al incubar una preparación de los tejidos del parásito con esteroides tritizados, la progesterona fué convertida a  $17\alpha$ -hidroxiprogestero, demostrando que T. colubriformis tiene cierta capacidad para metabolizar esteroides. Schistosoma mansoni es otro helminto con capacidad de utilizar esteroides. S. mansoni metaboliza androstenediona, cortisona, estrona, 17-hidroxiprogestero, 17-hidroxipregnenolona y colesterol (Sandor, 1980). En conjunto, las evidencias señalan que es posible que los esteroides sexuales del hospedero influyan en el estado fisiológico del parásito y posiblemente en su viabilidad (ésto se señala por la flecha punteada inferior de la figura 1).

De los diferente niveles a través de los cuales los esteroides sexuales pueden influir en la susceptibilidad, indudablemente los tejidos u órganos del hospedero con los que un parásito entra en contacto durante una infección, tienen un papel importante los efectos de las hormonas sobre el parásito, ya sea a través del sistema inmune o por medio de otros mecanismos. Ya se mencionó antes el papel del tejido conectivo subcutáneo como sitio de penetración de la larva de Strongyloides ratti para la expresión de la influencia del sexo sobre la susceptibilidad. Otro ejemplo lo constituye la cisticercosis murina causada por el metacésto de Taenia crassiceps. La inoculación experimental de las larvas directamente en la cavidad peritoneal, causa un desarrollo mas acelerado de la infección en las hembras que en los

machos; en cambio, la inoculación por vía subcutánea ocasiona la agrupación de los metacéstodos dentro de una cápsula de tejido conectivo presumiblemente formada por células del hospedero. Esta cápsula limita la multiplicación de las larvas y probablemente evita el contacto estrecho con el organismo del ratón. En estas circunstancias, el número de cisticercos en hembras y machos es la mismo (Sciutto, 1989).

## REFERENCIAS

Addis, C.J. Jr. (1946). Experiments on the relation between sex hormones and the growth of tapeworms (Hymenolepis diminuta) in rats. *Journal of Parasitology* 52: 574.

Ahmed, S.A, Penhale, W.J. and Talal, N. (1985). Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *American Journal of Pathology* 121 (3): 531.

Alexander, J. and Stimson, W.H. (1988). Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology Today* 4 (7): 189.

Ali-Khan Z. (1974). Host-parasite relationship in echinococcosis: I. Parasite biomass and antibody response in three strains of inbred mice against graded doses of Echinococcus multilocularis cysts. *The Journal of Parasitology* 60: 231.

Anderson, M.J.D. and Griffin, J.F.T. (1979) Taenia crassiceps in the rat: transfer of immunity and immunocompetence with lymph node cells. *International Journal for Parasitology* 9: 235.

Baron, P.J. (1968) On the histology and ultrastructure of Cysticercus longicollis, the cisticercus of Taenia crassiceps Zeder, 1800, (Cestoda, Cyclophyllidea). *Parasitology* 58: 497.

Bateman A., Singh A., Kral T. and Solomon S. (1989). The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine Reviews* 10: 1, 92.

Belton, C.M. (1977) Freeze-fracture study of the tegument of larval Taenia crassiceps. *The Journal of Parasitology* 63 (2): 306.

Blair, L.S. and Campbell, W.C. (1976) The rat (Rattus norvegicus) as a laboratory host for the metacestodes of Taenia crassiceps. *The Journal of Parasitology* 62 (1): 163.

Blalock, J.E. (1989). A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews* 69 (1): 1.

Brick J.E., Wilson P.A. and Walker S.E. (1985). Hormonal modulation of responses to thymus-independent and thymus-dependent antigens in autoimmune NZB/W mice. *Journal of Immunology* 134(6): 3693.

Burse, C.C. (1977). The biology and experimental systematics of cestodes in the genus Taenia L., 1758. Str. Ph. D. Thesis, University of New Brunswick.

Castro, J.E. (1974). Orchidectomy and the immune response I. Effecto of orchidectomy on lymphoid tissue of mice. *Proceedings of the Royal Society (London)* 185: 425.

Charniga, L., Stewart, G.L., Kramer, G.W. and Stanfield, J.A.

(1981). The effects of host sex on enteric response to infection with Trichinella spiralis. Journal of Parasitology 67 (6): 917.

Chernin, J. (1975). The growth of the metacestodes of Taenia crassiceps in white mice. Journal of Helminthology 49: 297.

Chernin, J. (1977). Aspects of the humoral response of laboratory white mice infected with the metacestodes of Taenia crassiceps. Journal of Helminthology 51: 137.

Chung W.L., Parish E.J. and Bone L.W. (1986). Sex steroid content and metabolism in Trichostrongylus colubriformis (Nematoda). The Journal of Parasitology 72: 2, 326.

Cohen, J.H.M., Danel, L., Cordier, G., Saenz, S. and Revillard, J.P. (1983). Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. The Journal of Immunology 131 (6): 2767.

Culbreth, K.L., Esch, G.W. and Kuhn, R.E. (1972) Growth and development of larval Taenia crassiceps (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of C-leucine. Experimental Parasitology 32: 272.

Daugherty, J.W. (1956). The effects of host castration and fasting on the rate of glycogenesis in Hymenolepis diminuta. The Journal of Parasitology 42 (1): 16.

Del Valle B. (1989). Larvae of Taenia crassiceps (cestoda): host specificity and localization. Parasitology Research 76: 181.

Dinarelli, C.A. (1984). Mechanisms of disease. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. The New England Journal of Medicine 311 (22): 1413.

Dobson, C. and Owen, M.E. (1978). Effect of host sex on passive immunity in mice infected with Nematosprioides dubius. International Journal for Parasitology 8: 359.

Dorais, F.J. and Esch, G.W. (1969) Growth rate of two Taenia crassiceps strains. Experimental Parasitology 25: 395.

Else, K. and Wakelin, D. (1989) Genetic variation in the humoral immune responses of mice to the nematode Trichuris muris. Parasite Immunology 11: 77.

Esch, G.W. (1967). Some effects of cortisone and sex on the biology of coenuriasis in laboratory mice and jackrabbits. Parasitology 57: 175.

Ferguson M.M. and McDonald, F.G. (1985). Oestrogen as an inhibitor of human NK cell cytotoxicity. Federation of European Biochemical Societies 191 (1): 145.

Flißer, A. and Larralde, C. (1986) Cysticercosis immunodiagnosis of parasite diseases. En: Helminthic Diseases.

Eds. Walls, K.F. and Schwarts, P.M. Vol. I, p. 109. Academic Press. New York.

Frahya, G.J., Lawlor, W.K. and Dajani, R.M. (1971) Echinococcus granulosus in albino mice: Effect of host sex and sex hormones on the growth of hydatid cysts. *Experimental Parasitology* 29: 255.

Freeman, R.S. (1962) Studies on the biology of Taenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969.

Freeman, R.S. (1964) Studies on responses of intermediate host to infection with Taenia crassiceps (Zeder, 1800) (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 42: 367.

Freeman, R.S., Fallis, A.M., Shea, M., Maberley, A.L. and Walters, J. (1973) Intraocular Taenia crassiceps (Cestoda). Part II. The Parasite. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 22 (4): 493.

Giannini, M.S.H. (1986). Sex-influenced response in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis in mice. *Parasite Immunology* 8: 31.

Gibbens, J.C., Harrison, L.J.S. and Parkhouse, R.M.E. (1986) Immunoglobulins class responses to Taenia taeniformis in susceptible and resistance mice. *Parasite Immunology* 8: 491.

Ginsberg, A., Cammeron, J., Goddard, W.B. and Grieve, J.M. (1956). Bovine cysticercosis with particular reference to East Africa. *East Africa Medical Journal* 33: 495.

Goble, F.C. and Konopka, E.A. (1973). *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* 73:427.

Goble, F.C. and Konopka, E.A. (1973). *Transactions of the New York of Academic of Science* 35: 325.

Good, A.H., Robbins, P., Siebert, A.E. and Zaun, S. (1982) Modulation of the host immune response by larvae of Taenia crassiceps. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Eds. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. P.593. Academic Press. New York.

Greenblatt, C.L. *New Developments with Human and Veterinary Vaccines* (Ed. Mizrahi, A., Klingberg, M.A. and Kohn, A.) pp 259-285, Alan R. Elis.

Greenblatt, H.C. and Rosenstreich, D.L. (1984). Trypanosoma rhodesiense infection in mice: sex dependence of resistance. *Infection and Immunity* 43 (1): 337.

Greenfield, S.H. (1942). Age resistance of the albino rat to Cysticercus fasciolaris. *Journal of Parasitology* 28: 207.

Greenstein, B.D. Fitzpatrick, F.T.A. Adcock, I.M., Kendall, M.D. and Wheeler, M.J. (1986). Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy inhibition of regeneration by testosterone. *The Journal of Endocrinology* 110: 417.

Grossman, C.J. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227: 257.

Hammerberg, B., Musoke, A.J., Hunstead, S.T. and Williams, J.F. (1976). Anticomplementary substances associated with taeniid metacestodes. En "Pathophysiology of Parasitic Infection" (Ed. E.J.L. Soulsby) pags. 233-240. Academic Press, Nueva York and Londres.

Harrison, L.J.S. and Parkhouse, R.M.E. (1985) Passive protection against Taenia saginata infection in cattle by a mouse monoclonal antibody reactive with the surface of the invasive oncosphere. *Parasite Immunology* 319:

Haselgrove, J., Grun, J., Owen, S. and Larralde, C. (1987) Magnetic resonance imaging of parasitic tapeworm larvae Taenia crassiceps cysticerci in the peritoneal cavity of mice. *Magnetic Resonance in Medicine* 4: 517.

Heywort, M.F. (1988). Time-course of Giardia muris infection in male and females immunocompetent mice. *The Journal of Parasitology* 74 (3): 491.

Howe E., Howe C. and Pollard I. (1980). Plasma testosterone in the male, progesterone and estradiol-17 $\beta$  in the female, and  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) activity in the testis and ovary of the snell dwarf mouse. *Biology of Reproduction* 23: 887.

Huerta, H.L. (1990). Immunological mediation in gonadal influence upon experimental murine cysticercosis (Taenia crassiceps). (Manuscrito en preparaci3n).

Instituto Mexicano del Seguro Social M3xico, 1978. Manual de procedimientos para laboratorio cl3nico.

Ito , T, and Hoshino, T. (1962). Studies of the influences of pregnancy and lactation on the thymus of the mouse. *Zeitschrift f3r Mikroskopisch-Anatomische Forschung (Leipzig)* 66: 276.

James, S.L. and Cheever, A.W. (1985) Comparasion of immune responses between high and low responder strains of mice in the concomitant immunity and vaccine models of resistance to Schistosoma mansoni. *Parasitology* 91: 301.

Kalland, T.J. (1980). Alterations of antibody response in female mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol. *The Journal of Immunology* 24: 194.

Kay, A.B. (1985) Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. *Clinical and Experimental Immunology* 62: 1.

Kemp, W.M., Merrit, S.C., Bogucki, M.S., Rosier, J.G. and Seed, J.R. (1977) Evidence for adsorption of heteroespecific host immunoglobulin on the tegument of Schistosoma mansoni. Journal of Immunology 119: 1849.

Kendall, M.D. and Twigg, G.I. (1981). The weight of the thymus gland in a population of wild bank voles, Clethrionomys glareolus, from Wicken Fen, Cambridgeshire. Journal of Zoology 194: 323.

Keusch, G.T. and Farthing, M.J.G. (1986). Nutrition and infection. Annual Review of Nutrition 6: 131.

Kiser, C.S., Parish, E.J. and Bone, L.W. (1986). Binding of steroidal sex hormones by supernatant from Trichostrongylus colubriformis (Nematoda). Comparative Biochemistry and Physiology 83B (4): 787.

Kiyota, M., Korenaga, M., Nawa, Y and Kotani, M. (1984). Effect of androgen on the expression of the sex difference in susceptibility to infection with Strongyloides ratti in C57BL/6 mice. American Journal of Experimental Biology and Medicine Sciences 62 (Pt 5): 607.

Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Diaz M.L., Govezensky T. and Coltorti E. (1989). Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 40: 3, 282.

Larralde, C., Sciuto, E., Grun, J., Díaz, M.L., Govezensky, T. and Montoya, R.M. (1988) Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by Taenia crassiceps: influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination. International Symposium on Cell Function and Disease. Monterrey, México. Plenum Press.

Larralde C., Sotelo J., Montoya R.M., Palencia G., Padilla A., Govezensky T., Diaz M.L. and Sciutto E. (1990). Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid (CSF): Antigens from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia solium. Arch. Pathol. Lab. Med. 114: 926.

Leid, R.W. and Williams, J.F. (1974). The immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. II. Characterization of reaginic antibody and an allergen associated with larval stage. Immunology 27: 209.

Leid, R.W. and Williams, J.F. (1975). Reaginic antibody response in rabbits infected with Taenia pisiformis. International Journal for Parasitology 5: 203.

Lloyd, S. and Soulsby, E.J.L. (1978). The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to Taenia

taeniaeformis in the mouse. *Immunology* 34: 939.

Mansour T.E. (1984). Serotonin receptors in parasitic worms. *Advances in Parasitology* 23, 1.

Mathies, A.W., Jr. (1959). Certain aspects of the host-parasite relationship of Aspicularis tetraptera, a mouse pinworm. I. Host specificity and age resistance. *Experimental Parasitology* 8: 31.

Miller, T.A. (1965). Influence of age and sex on susceptibility of dogs to primary infection with Ancylostoma caninum. *The Journal of Parasitology* 51 (5): 701.

Mitchell, G.F. (1979). Effector cells, molecules and mechanisms in host-protective immunity to parasites. *Immunology* 38: 209.

Mitchell, G.F. (1980) T cell dependent effects in parasitic infection and disease. En: *Progress Immunology IV*. Fourth International Congress of Immunology. Eds. Fougereau, M. and Dausset, J. Academic Press, London.

Mitchell, G.F., Rajasekharra, G.R. and Rickard, M.D. (1980). A mechanism to account for mouse strain variation in resistance to the larval cestode, Taenia taeniaeformis. *Immunology* 39: 481.

Mock, B.A. and Nacy, C.A. (1988). Hormonal modulation of sex differences in resistance to Leishmania major systemic infections. *Infection and Immunity* 56 (12): 3316.

Musoke, A.J., Williams, J.F., Leid, R.W. and Williams, C.S.F. (1975). The immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. IV Immunoglobulins involved in passive transfer of resistance from mother to offspring. *Immunology*, 29: 845.

Nakanishi, H., Horii, Y., Terashima, K. and Fujita, K. (1989). Effect of testosterone on the susceptibility of C57BL/6 mice to infection with Brugia pahangi with reference to inflammatory cell response. *Journal of Parasitology* 75 (3): 455.

Ogle, T.F. and Kitay, J.I. (1977). Ovarian and adrenal steroids during pregnancy and the oestrous in the rat. *Journal of Endocrinology* 74: 89.

Paavonen, T., Andersson, L.F. and Adlercreutz, H. (1981). Sex hormone regulation of *in vitro* immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *Journal of Experimental Medicine* 154: 1935.

Rabiela, M.T. (1989). Influencia de la edad y el sexo en la neurocisticercosis humana. *Memorias del VII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Inmunología*. U.A.S.L.P. San Luis Potosí, S.L.P.

Rebar, W.R., Morandini, I.C., Petze, J.E. and Erickson, G.F. (1982). Biology of Reproduction 27: 1267.

Reddington, J.J., Stewart, G.L., Kramar, G.W. and Kramar, M.A. (1981). The effects of host sex and hormones on Trichinella spiralis in the mouse. Journal of Parasitology 67 (4): 548.

Rickard, M.D. Williams, J.F. (1982). Hydatidosis/Cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. Advances in Parasitology 21: 229.

Sally, J. C-Y and Freeman, R.S. (1976). Intraperitoneal passage of Taenia crassiceps in rats. The Journal of Parasitology 62 (5): 837.

Sandor, T. (1980). Steroids in invertebrates. En Advances in Invertebrate Reproduction, W.H. Clark, Jr., and T.S. Adams (eds.). Elsevier North-Holand, Amsterdam, pp, 81-96.

Schiller, E.L. (1973) Morphologic anomalies in scoleces of larval Taenia crassiceps. The Journal of Parasitology 59 (1): 122.

Sciutto, E., Díaz, M.L., Fragoso, G., Govezensky, T., Montoya, R.M. and Larralde, C. (1991) Role of antibodies in experimental murine cysticercosis caused for Taenia crassiceps. (Manuscrito en preparación).

Sciutto, E., Díaz, M.L., Lomell, C., Govesensky, T., Montoya, R.M., Tapia, G. and Larralde, C. (1991). Murine cysticercosis by Taenia crassiceps es under control of H-2 genes, sex and tissular location. (Enviado para su publicación).

Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R.M., Díaz M.L., Govezensky T., Lomell C. and Larralde C. (1990). Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T. solium antigens against experimental murine T. crassiceps cysticercosis. Parasite Immunology 12: 687.

Siebert, A.E., Blitz, R.R., Morita, C.T. and Good, A.H. (1981) Taenia crassiceps: serum and surface immunoglobulins in metacestode infections of mice. Experimental Parasitology 51: 418.

Siebert, J.A.E. and Good, A.H. (1979) Taenia crassiceps: Effect of normal and immune serum on metacestodes *in vitro*. Experimental Parasitology 48:164.

Siebert, J.A.E. and Good, A.H. (1980). Taenia crassiceps: Immunity to metacestodes in Balb/c and BDF1 mice. Experimental Parasitology 50: 437.

Siebert, J.A.E., Good, A.H. and Simmons, J.E. (1978) Kinetics of primary and secondary infections with Taenia crassiceps metacestodes (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: Cyclophyllidae). International Journal for Parasitology 8: 39.

Siebert, J.A.E., Good, A.H. and Simmons, J.E. (1978)

Ultrastructural aspects of early immune damage to Taenia crassiceps metacestodes. International Journal for Parasitology 8: 45.

Smith, K.J., Esch, G.W. and Kuhn, R.E. (1972) Growth and development of larval Taenia crassiceps (Cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. International Journal for Parasitology 2: 261.

Solomon, G.B. and Haley, A.J. (1968). Development of rat and hamster strains of Nippostrongylus brasiliensis in gonadectomized male rats and hamsters. Experimental Parasitology 23: 319.

Stewart, G.L., Mann, M.A., Ubelaker, J.E., McCarthy, J.L. and Beverly, G.W. (1988). A role for elevated plasma corticoesterone in modulation of host response during infection with Trichinella pseudospiralis. Parasite Immunology 10: 139.

Threadgold, L.T. and Dunn, J. (1983) Taenia crassiceps: Regional variations in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus tegument. Experimental Parasitology 55: 121.

Trimble, J.J. III and Lumsden, R.D. (1975). Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in Taenia crassiceps larvae. The Journal of Parasitology 61: 665.

Vetter, J.C.M. and Klaver-Wesserling, J.C.M. (1978) IgG antibody binding to the outer surface of infective larvae of Ancylostoma caninum. Zeitschrift für Parasitenkunde 58: 91.

Villagrán-Uribe, J. and Olvera-Rabiela, J.E. (1989). La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México. En: Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. Eds. Flisser, A. y Malagón, F. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Ed. Limusa. México.

Wakelin, D. (1985). Genetic control of immunity to helminth infections. Parasitology Today 1 (1): 17.

Wunderlich, F., Mossmann, H., Helwig, M. and Schillinger, G. (1988). Resistance to Plasmodium chabaudi in B10 mice: influence of the H-2 complex and testosterone. Infection and Immunity 56 (9): 2400.

Zakroff, S.G.H., Beck, L., Platzer, E.G. and Spiegelberg (1989) The IgE and IgG subclass responses of mice to four helminth parasites. Cellular Immunology 119: 193.