

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**"Echinococcus granulosus.- DETERMINACION DE LA  
RESPUESTA INMUNE CELULAR DE LOS  
ANTIGENOS PRINCIPALES LIBRES Y ATRAPADOS  
EN LIPOSOMAS EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL"**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN:  
INMUNOBIOLOGIA**

**POR LA MEDICO CIRUJANO  
MARIA DEL CARMEN MONDRAGON DE LA PEÑA**

**DICIEMBRE 1995**

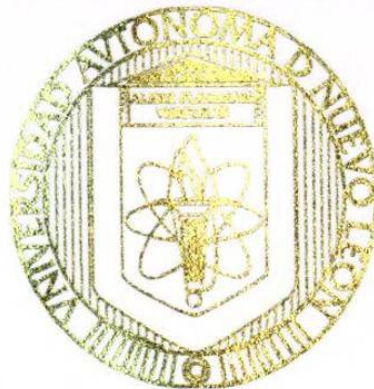
EM  
RC184  
T6  
16  
1.1



1080073235

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"*Echinococcus granulosus*.- DETERMINACION DE LA  
RESPUESTA INMUNE CELULAR DE LOS ANTIGENOS  
PRINCIPALES LIBRES Y ATRAPADOS EN LIPOSOMAS  
EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL "

TESIS

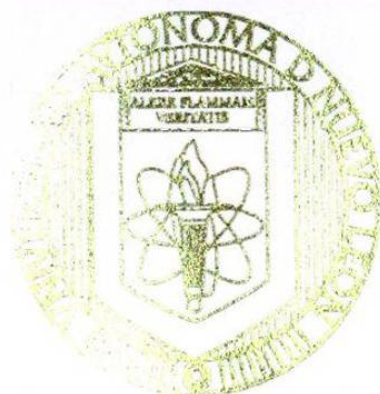
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

POR LA MEDICO CIRUJANO  
MARIA DEL CARMEN MONDRAGON DE LA PEÑA

DICIEMBRE DE 1995

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**"*Echinococcus granulosus*.- DETERMINACION DE LA  
RESPUESTA INMUNE CELULAR DE LOS ANTIGENOS  
PRINCIPALES LIBRES Y ATRAPADOS EN LIPOSOMAS  
EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL "**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

**POR LA MEDICO CIRUJANO  
MARIA DEL CARMEN MONDRAGON DE LA PEÑA**

**DICIEMBRE DE 1995**

TM  
RC 184  
T 6  
M 6

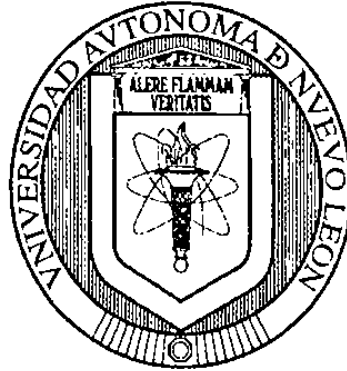
Bibliote  
C ntral Magna  
UANL  
FONDO  
TESIS  
(73235)

BURadi Rangai Fitas  
UANL  
FONDO  
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



*"Echinococcus granulosus.* - DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR DE LOS ANTÍGENOS PRINCIPALES LIBRES Y ATRAPADOS EN LIPOSOMAS EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL"

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN:  
INMUNOBIOLOGÍA

POR LA MÉDICO CIRUJANO

MARÍA DEL CARMEN MONDRAGÓN DE LA PEÑA

COMISIÓN DE TESIS:

DIRECTOR: Dra Cristina Rodríguez Padilla..

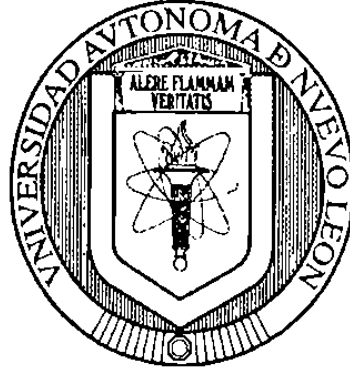
CO-DIRECTOR: Dr Reyes S. Taméz Guerra.

CO-DIRECTOR Dr. Rafael Herrera Esparza

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



*"Echinococcus granulosus.* - DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE  
CELULAR DE LOS ANTÍGENOS PRINCIPALES LIBRES Y ATRAPADOS EN  
LIPOSOMAS EN HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL"

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN:  
INMUNOBIOLOGÍA

POR LA MÉDICO CIRUJANO

MARÍA DEL CARMEN MONDRAGÓN DE LA PEÑA

COMISION DE EXAMEN:

DIRECTOR: Dra Cristina Rodriguez Padilla..

SECRETARIO: Dr Reyes S. Taméz Guerra.

VOCAL: M en C Juan Manuel Alcocer González.



El presente trabajo se realizó en:

El Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Laboratorio de Ecología del Centro de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

El presente trabajo se realizó en:

El Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Laboratorio de Ecología del Centro de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

# **DEDICATORIAS**

## **A mi esposo Jesús Patricio Tavizón García:**

Eres mi maestro, mi inspiración, mi apoyo, por ti todo.

Gracias por existir.

## **A mis hijas:**

Violeta Elisa

Marina Alhelí

Anasol Jazmín

Por compartir y ser las causantes de mi superación.

Gracias por existir.

# RECONOCIMIENTOS

- Agradezco a mis padres Carmen y Antonio mi existencia para vivir lo que he vivido.
- A la memoria de mi hermano José Luis que, teniendo todo en sus manos, el destino hizo que se desvaneciera.
- A mis sobrinos Israel y Ana Daniela Tavizón Mondragón, por el coraje y el esfuerzo con que se abren camino en la vida, lo que les deparará el éxito.
- A mi sobrino José Luis, que salga adelante contra la adversidad.
- A mis hermanos: Lupita, Alfonso, Luis y Luz , por la unión que nos ha llevado adelante contra todo.
- A mis hermanos Teresa y Antonio, que la vida les de, lo que siempre han buscado.
- A mi tío Dr. Alfonso Peña Torres, por su ejemplo y apoyo en toda mi vida.
- A mis tíos Sra. Magdalena Díaz de de la Peña, Ing. Luis de la Peña Torres y Sra. Rosa María Mondragón de Peña, que han estado siempre en mi superación personal y académica.

# AGRADECIMIENTOS

- ◆ **A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla:**  
Porque creyó en mí, por su amistad y por incentivar mi vida profesional.
  
- ◆ Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra, por su apoyo y enseñanzas.
  
- ◆ Al Dr. Rafael Herrera Esparza, no obstante sus múltiples ocupaciones, me dedicó desinteresadamente su tiempo, consejos e ideas para el desarrollo de este y otros trabajos.
  
- ◆ A la Dra. Irene de Haro Arteaga, por su amistad de siempre, por ser mi maestra y por el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo.
  
- ◆ Edgar Mendoza Gamboa, por su amistad para siempre y su apoyo a la realización de este trabajo.
  
- ◆ A Esther Treviño Holten, por su amistad y apoyo en la maestría.
  
- ◆ A Juan Manuel Alcocer Gonzalez, por su amistad, sus consejos académicos y ayuda en la realización de este trabajo.
  
- ◆ A Rosa María Herrera Disdado, por su ayuda técnica siempre que la he necesitado.
  
- ◆ A Carlos Osegueda Berrios, por su amistad, su paciencia y por la ayuda en el material fotográfico de este trabajo.
  
- ◆ A Sergio Saldivar, por su ayuda y consejos en el manejo de los animales del bioterio.
  
- ◆ A Sandra y Mariza, por su amistad y su colaboración incondicional.
  
- ◆ A toda la gente que de una o de otra manera intervinieron en mi formación y el desarrollo de este trabajo.

# CONTENIDO

IMPORTANCIA .....	1
OBJETIVOS .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	5
HIPÓTESIS .....	14
MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
Animales .....	15
Quistes Hidatídicos .....	15
<i>Echinococcus granulosus</i> (protoescolices) .....	16
Modelo animal .....	16
Anticuerpos monoclonales .....	17
Atrapamiento de AgLH en liposomas .....	17
Antígeno .....	20
AgLH .....	20
Antisueros .....	21
Inmuno doble difusión (IDD).....	21
Doble difusión 5 (DD5).....	22
Inmunolectroforésis .....	23
Electroforésis .....	24
Electrotransferencia (western blot) .....	25
Inmunoperoxidasa (IPX) .....	26
Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	27
Análisis estadístico .....	28
RESULTADOS .....	29
DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIONES .....	43
COMENTARIOS .....	45
RECOMENDACIONES .....	46
BIBLIOGRAFÍA .....	73

## RESUMEN

Se utilizó un modelo murino para investigar la relación huésped-parásito y la inmunidad protectora ejercida por los antígenos del metacéstodo de *Echinococcus granulosus* libres y/o encapsulados en liposomas.

Por medio de anticuerpos monoclonales CD4, CD8, MAC-1 y CRIA-4, se determinó la respuesta inmune celular local hepática y en sangre periférica en ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad de ambos sexos, infectados intraperitonealmente (IP) con 2000 protoescolices (PSC) vivos y tratados previamente con antígeno hidatídico libre y/o encapsulado en liposomas, todos los grupos se sacrificaron a las 16 semanas de inoculación. En el grupo de ratones solamente infectados y no tratados con AgLH se encontró un aumento significativo en todas las poblaciones celulares de sangre periférica, así como del tejido hepático cuando se compararon con el grupo control sano. Los grupos tratados con antígeno libre y/o encapsulado en liposomas, tuvieron un comportamiento celular parecido al de los ratones sanos, y un número similar de quistes el cual fue menor que en los infectados y no tratados.

Se concluyó que con ambas formas de administración del antígeno hubo modulación de la respuesta inmune tanto a nivel local como periférico, lográndose protección.

# IMPORTANCIA

La hidatidosis es una parasitosis de importancia mundial dentro de la salud pública humana y animal, es un problema en países con gran actividad en la explotación y utilización de diferentes especies de animales domésticos y económicamente representa pérdidas cuantiosas en países endémicos donde han reportado hasta US \$4.4 por animal infectado, afecta además al hombre, en el cual puede llegar a ser mortal. En México esta enfermedad, no obstante que ya ha sido reportada, no se le ha dado la importancia que tiene y por lo tanto no cuenta con estudios epidemiológicos formales. En 1979 Tavizón *et al* reportaron la presencia de esta parasitosis en el Estado de Zacatecas en cerdos criados en libre pastoreo urbano y sacrificados en rastros municipales, además de casos humanos positivos a hidatidosis por prueba de intradermorreacción. Afecta principalmente a los cerdos los cuales son una fuente importante de alimento para la población. La manera de crianza de la mayoría de estos animales, incluye en su alimentación granos, vegetación silvestre, desperdicios, carroña y excrementos de perros y de otras especies, forma en la que adquieren parasitosis que posteriormente son transmitidas al hombre (zoonosis). Además las pérdidas económicas son importantes pues el 7.86% de los hígados de los cerdos sacrificados en la región están infectados con el parásito. Es importante conocer los mecanismos inmunopatológicos involucrados en esta enfermedad para de esta manera, poder instituir medidas de control y tratar de investigar, mediante un modelo animal, cómo se comportaría en el humano ya que en ciertas circunstancias puede estar enmascarada con otros padecimientos. Es así como surge la inquietud de investigar a nivel experimental, diversas estrategias encaminadas a proteger específicamente tanto al hombre como a los animales, como sería la utilización de antígenos del mismo parásito.



# INTRODUCCIÓN

La equinococosis e hidatidosis son términos utilizados para referirse a las parasitosis causadas respectivamente por el adulto y el estado larvario (metacéstodo) del género *Echinococcus* (Familia Taeniidae). El término hidatidosis o enfermedad hidatídica se restringe para la infección con el metacéstodo, mientras equinococosis es aplicada para la parasitación con larvas como para con los adultos. En el primer caso el huésped es intermediario y en el segundo definitivo. Existen cuatro especies reconocidas dentro del género de *Echinococcus* (Rudolphi, 1801): *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*, las cuales son céstodos ciclofilídeos pertenecientes a la familia Taeniidae<sup>81</sup>. Las especies más involucradas en la patogenia del humano son las dos primeras, producen respectivamente hidatidosis unilocular y multilocular. La hidatidosis unilocular es una enfermedad zoonótica causada por el metacéstodo de *E. granulosus* y es la única que hasta ahora se ha encontrado en México.

La hidatidosis porcina no se conocía como problema de salud animal en Zacatecas ni en los demás estados del País, actualmente esta enfermedad se reconoce como un serio problema de salud pública y animal<sup>54,55,77</sup>, así mismo se han observado particularidades en el ciclo del parásito relacionadas con las condiciones ambientales, se reconoce la raza porcina como la causante de la hidatidosis en el Estado de Zacatecas y no la ovina como tradicionalmente se ha reportado en otros países<sup>25</sup>. El poco conocimiento de esta enfermedad cíclica ha hecho que no se tenga el cuidado suficiente a nivel de rastros municipales y menos en mataderos clandestinos, para poder controlar tanto la equinococosis en los cánidos, como la hidatidosis en el cerdo y su posible riesgo de infección para el hombre.

Sin embargo, en el campo zacatecano, las vísceras parasitadas de los cerdos que se sacrifican se las dan como alimento a los perros, se entierran o se desechan en los basureros a cielo abierto (el arroyo) donde son consumidas también por perros u otros cánidos que funcionan como huéspedes definitivos del parásito. De esta manera, el ciclo se convierte en silvestre propagándose la infección indefinidamente<sup>81,82,80</sup>.

La tenia adulta sólo se desarrolla en el intestino delgado (yeyuno e íleon) del huésped definitivo: cánidos como el perro doméstico (*Canis familiaris*), la zorra roja (*Vulpes vulpes*) y el dingo (*Canis familiaris dingo*)<sup>81,26,82</sup>; mientras que las larvas o protoescolices (PSC) se asientan en mamíferos y herbívoros, estos últimos probablemente se infecten mediante la ingestión de huevos que se encuentran en pasturas contaminadas. Entre los huéspedes intermediarios se encuentran el hombre, el cerdo, la oveja, el caballo, la vaca, el camello, el canguro, el alce<sup>80,42,9,43,26,33</sup> y en éstos casi en todos los órganos (cerebro, médula ósea, riñones, vesículas seminales, corazón y pericardio, vías biliares, glándulas maxilares y principalmente en hígado y pulmones).<sup>27, 29,53,73,15,1,51</sup> La implantación del parásito en un órgano blanco varía según el huésped produciendo quistes hidatídicos o hidátides (Batsch, 1786)<sup>32</sup>.

Los antígenos de *E. granulosus*, al entrar en contacto con los tejidos del huésped, inducen tolerancia inmunológica específica o inmunosupresión no específica<sup>6</sup>, lo cual lleva al parásito a una larga sobrevivencia en el órgano blanco, por tanto, ésta es una de las formas de evadir la respuesta inmune del huésped. Al aplicar el antígeno en un vehículo como los liposomas y que además estos sirvan como adyuvante para la respuesta inmune permitirá hacer la comparación de la misma con el antígeno libre, estas dos maneras de aplicación podrán dar protección.

## ANTECEDENTES

La hidatidosis es una enfermedad cosmopolita, difícil de controlar debido a las características de su ciclo, sobre todo su fase silvestre. Es dependiente de factores relacionados con la cultura y el pastoreo<sup>81,4,37</sup>. Representa un problema de salud pública y económico en regiones endémicas (cuadro 1)<sup>41,42,52,56,86,7,17</sup>, por ejemplo en Jordania se han reportado pérdidas hasta de US \$4.4 por borrego infectado<sup>2</sup>.

En el Estado de Zacatecas la hidatidosis es producida por una raza (cepa) en la que se completa el ciclo entre el perro y el cerdo. Representa un problema en la población porcina ya que el 7.86% de éstos animales sacrificados en los rastros están infectados con el parásito<sup>54</sup>. La raza cerdo-perro se ha reportado en Polonia donde se postula que puede ser diferente ya que está separada morfológica y genéticamente de otras. Exhibe características de significancia epidemiológica, incluso presenta una tasa rápida de desarrollo en perros y una aparente baja infectividad a humanos<sup>25</sup>.

*Echinococcus granulosus* es un céstodo ciclofilideo que se clasifica como sigue:  
81,80,43 26,33,17,25,28

Phylum Platyhelminthes

Clase Cestoidea

Subclase Eucestoda

Orden Cyclophyllidea

Familia Taeniidae

Género *Echinococcus*

Especie *E. granulosus*

El adulto de *E. granulosus* (figura 1 E) parasita a perros y otros cánidos que actúan como huéspedes definitivos. Diversos mamíferos pueden funcionar como huéspedes intermediarios, infectándose por medio del agua y por contacto directo; sin embargo, los herbívoros son los que probablemente lo hagan mediante la ingestión de huevos que encuentran en pasturas contaminadas. Los cerdos, por la manera de crianza en "libre pastoreo urbano", se infectan por comer directamente materia fecal de perros parasitados. El parásito adulto se encuentra fijo fuertemente a la mucosa del intestino delgado del huésped, es un gusano plano que tiene una longitud de 2 a 7 mm, tiene de tres a cuatro proglótidos en la cadena estrobilar, el último más ancho y largo que contiene el útero grávido; el escólex lleva cuatro ventosas y tiene un rostelo no retráctil con dos coronas de ganchos que pueden ser de 30 a 40, los cuales, por su forma o tamaño sirven para diagnóstico. La madurez sexual se alcanza entre 3 y 4 semanas, la producción de huevos comienza a los 28 días después de la ingestión de protoescolices (PSC) (figura 1 C y D), esto dependerá de la raza del parásito, el tiempo de maduración y la permanencia de la parasitación. Si no hay reinfección los parásitos permanecen de 5 a 6 meses. Los huevos del *E. granulosus* miden 30 a 38  $\mu\text{m}$  y son eliminados con la materia fecal de los cánidos; no se pueden diferenciar de los huevos de *Taenia solium* y *T. saginata*. Contienen oncósferas completamente diferenciadas, y una vez ingeridos por el hospedador intermediario los procesos digestivos de este provocan la liberación del embrión hexacanto u oncósfera, atraviesa el intestino por medio de movimientos de los ganchos del rostelo y proteasas, penetra los vasos mesentéricos y la oncósfera es pasivamente transportada hacia el hígado, puede llegar al corazón derecho y de ahí a pulmones donde se puede quedar o continuar hacia el corazón izquierdo. Se implanta casi en cualquier órgano<sup>16,28</sup>.

La oncósfera en el órgano blanco se comienza a desarrollar y como medio de evasión a la respuesta inmune del huésped se forman los quistes hidatídicos<sup>63</sup> (figura 1 A y B).

El tiempo de madurez de un quiste hidatídico depende de la raza del parásito adulto y de la especie del huésped intermediario y puede ser de 2 a 10 años, es típicamente unilocular. El huésped, en respuesta a la implantación del parásito, comienza a desarrollar una membrana adventicia de estructura fibrosa con células inmunocompetentes, la zona de tejido que está en contacto con el parásito se comienza a atrofiar por la presión ejercida por éste al comenzar a desarrollarse. El parásito sintetiza dos capas, la externa o laminar acelular, compuesta de mucopolisacáridos y que ultra-estructuralmente consiste de microvellosidades con funciones de conducción y absorción de sustancias nutritivas ya que está en contacto con los tejidos del huésped<sup>23</sup> (figura 2 A y B), es lechosa y opaca, permeable para ciertas sustancias del exterior hacia el interior del quiste, mide 1 mm aproximadamente de grosor el cual puede variar incluyendo su resistencia según la madurez del quiste, la otra capa es la germinativa o prolígera, granulosa y nucleada que mide alrededor de 25  $\mu\text{m}$ , da lugar a la formación de vesículas (figura 2 A) que se proyectan hacia la cavidad del quiste y son visibles a simple vista, miden de 258 a 300  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente, en su interior se originan PSC de 10 a 50 por vesícula (figura 2 C y D), estas vesículas prolígeras, los PCS libres y los corpúsculos calcáreos, forman la arenilla hidatídica. Cuando las vesículas no originan PCS los quistes se denominan estériles, acéfalos o no productivos. Los protoescólices son ovoides, invaginados, tienen cuatro ventosas un rostelo con 30 a 40 ganchos en dos hileras una interna y otra externa y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente.

traslapan entre sí; de esta forma son dos los principales grupos de antígenos provenientes del quiste hidatídico, el del Arco 5 de Capron el cual es una lipoproteína termoestable de 400 kDa dissociable en unidades de 67 kDa, y el B una lipoproteína termolábil de 150 kDa dissociable en unidades de 30 kDa<sup>57,59,61,48,11</sup>.

El antígeno producido por el parásito puede infiltrarse a través de la pared del quiste por fracturas sufridas conforme va creciendo, a los alrededores del tejido huésped. La interferencia de productos citotóxicos presentes en el líquido hidatídico, con células inmunocompetentes, pueden intervenir en la sobrevivencia del parásito a largo plazo,<sup>59</sup> también se ha estudiado el grado de inmunoregulación en ratones BALB/c durante una infección prolongada con *E. granulosus* para explicarse la longevidad del parásito; una posible explicación sería una reacción autoinmune por evasión de la respuesta dependiente de productos del MHC, lo que puede producir citotoxicidad alorreactiva unida a inmunosupresión<sup>6</sup>. En una infección primaria murina localizada, se ha observado que los linfocitos T juegan un papel central en el reconocimiento de los PSC y en la respuesta inflamatoria subsecuente ya que al entrar los PSC en contacto con los tejidos del ganglio linfático hay cambios histológicos y ultraestructurales<sup>64</sup>. Jenkins *et al* en 1986, estudiaron los cambios histológicos en las diferentes áreas del ganglio linfático del ratón durante la primoinfección con larvas de *E. granulosus*. Concluyeron que este parásito puede causar cambios en el ambiente celular pues los PSC actúan como mitógenos aumentando la reactividad de los linfocitos T y B<sup>36</sup>. Cox *et al* 1989, investigaron la activación de células B normales murinas por larvas de *E. granulosus* y concluyeron que es un activador policlonal de células B que induce transformación y diferenciación, efecto que es probablemente timo independiente<sup>21</sup>.

Bresson *et al* en 1989, demostraron la reactividad de los linfocitos a antígenos de *Equinococcus* en pacientes con echinococcosis alveolar. Además fue demostrada la reactividad linfocito específica a este parásito<sup>12</sup>. Vuitton *et al* 1989, encontraron disminuída la actividad de células "asesinas naturales" (NK) en sangre periférica y en granulomas periparasíticos de pacientes con echinococcosis alveolar, también encontraron bajo el porcentaje de células CD8 sin embargo el número de las células CD4 se encontraba aumentado. En hígado las células CD8 constituyeron la principal población de células T y los granulomas estuvieron poblados principalmente por macrófagos<sup>83</sup>.

Por mucho tiempo los liposomas fueron utilizados como modelos de membranas biológicas para realizar investigaciones básicas en bioquímica de membranas y también para mecanismos de transporte, sin embargo, hace ya varios años que los liposomas se han utilizado como un medio para introducir materiales en el compartimento intracelular<sup>10</sup>. Son vesículas artificiales microscópicas formadas de uno o mas fosfolípidos. Hay tres clases de liposomas, las vesículas multilamelares grandes (VMG) con un tamaño promedio de 200 nm hasta 5  $\mu$ m, las vesículas unilamelares pequeñas (VUP) de 20 a 70 nanómetros y las vesículas unilamelares grandes (VUG), con un tamaño promedio de 200 a 1  $\mu$ m. Las VMG se forman espontáneamente cuando los lípidos son hidratados, tienen un volumen promedio de captura de 4  $\mu$ l. Las VUP atrapan poco volumen por miligramo de lípido ya que su volumen de captura promedio es de 0.5  $\mu$ l. Las VUG presentan un volumen de captura de 11  $\mu$ l por mg de lípido en promedio. La eficiencia de atrapamiento para las VMG es de 10%, para VUP es del 1% y para VUG es del 40%<sup>50</sup>.

Los liposomas pueden interactuar con las células de varias maneras, por adsorción inespecífica, por ligandos específicos tales como anticuerpos, hormonas o lectinas, se puede llevar a cabo un intercambio de lípidos entre el liposoma y la membrana plasmática o pueden ser endocitados o fusionados. Cuando los liposomas son administrados *in vivo* se remueven de la circulación principalmente por las células fagocíticas y son transportados a los órganos del sistema inmune; una pequeña cantidad puede distribuirse en otros órganos, su destino se puede manipular al modificar algunas características de los propios liposomas (cuadro 2) lo que depende del tipo de fosfolípido, de la presencia de ligandos específicos, así como del tamaño, carga y cantidad de liposomas administrados<sup>8, 76, 39, 89, 31</sup>.

Uno de los potenciales clínicos más promisorios es la utilización de los liposomas como acarreadores de inmunógenos, ya que aumentan la respuesta inmune, son biodegradables, no tóxicos y su uso en vacunas es prometedor<sup>65</sup>. Los liposomas pueden actuar como adyuvantes inmunológicos ya que al administrarlos con los antígenos se produce mayor cantidad de anticuerpos que con la misma dosis de antígeno libre. En el caso de animales con anticuerpos circulantes contra cualquier antígeno, al ser retados con el antígeno atrapado en liposomas, estarán mucho menos propensos a desarrollar reacciones alérgicas mediadas por anticuerpos que cuando se desafían con la misma cantidad de antígeno libre<sup>5</sup>.

Al comparar la capacidad del adyuvante completo de Freund, del gel de aluminio y los liposomas para aumentar la respuesta de la inmunidad humoral y celular a antígenos derivados del virus de la hepatitis B (HBsAg), se obtuvo una respuesta inmune elevada con adyuvante completo de Freund (ACF), el gel de aluminio fue



buen adyuvante para partículas de 22 nm. de HBsAg y los liposomas produjeron más inmunogenicidad a preparaciones polipeptídicas<sup>67</sup>. Van Rooijen *et al* en 1980 evidenciaron el efecto inmunoadyuvante de los liposomas con ventajas sobre los otros adyuvantes como ACF e hidróxido de aluminio, además demostraron que la exposición del antígeno en la superficie del liposoma es lo que va a mediar el efecto adyuvante<sup>84</sup>. Se encontró que las proteínas asociadas a liposomas actúan como estimuladores potentes de la memoria inmunológica. Ratones sensibilizados con albúmina sérica bovina asociada a liposomas generaron una fuerte respuesta con células formadoras de placa, en comparación al débil estímulo obtenido con la albúmina líquida<sup>70</sup>. Shek *et al* en 1982, compararon la capacidad de aumentar la respuesta inmune de la albúmina bovina atrapada en los liposomas. Encontraron que el antígeno atrapado en el liposoma es más inmunogénico que cuando es adsorbido a la superficie del mismo<sup>71</sup>. Desiderio *et al* en 1985, encontraron que el antígeno O de *Salmonella typhimurium* atrapado en liposomas fue capaz de inducir una respuesta inmune celular específica al lipopolisacárido y además produjo mayor protección que una vacuna preparada con la bacteria muerta, pero similar a la obtenida con una vacuna preparada con el organismo viable<sup>24</sup>. Rusell *et al* en 1988, obtuvieron inmunización efectiva contra leishmaniasis cutánea con antígenos reconstituidos dentro de liposomas, éstos se aplicaron como vacuna, los antígenos se aplicaron por vías subcutánea, intraperitoneal e intravenosa en ratones. Indujeron apreciables niveles de protección y los liposomas con el antígeno no causaron aumento de la enfermedad observada en otros estudios de vacunación sólo con extractos crudos del parásito<sup>66</sup>. Lesley *et al* en 1990 hicieron la caracterización de antígeno de *Leishmania major* en liposomas y este protegió a ratones BALB/c contra leishmaniasis cutánea<sup>38</sup>.

Hay varias dificultades para el uso de liposomas en vivo, para la liberación de sustancias, el problema es que son rápidamente removidos de la circulación por células fagocíticas en el hígado, pulmones y órganos linfáticos secundarios. De esta manera, a menos que la célula blanco sea fagocítica, los liposomas fallan en el alcance de su objetivo. Se han creado pruebas nuevas para mejorar la liberación de sustancias, por medio de liposomas, a células tumorales como blanco y aunque ha habido resultados positivos, todavía no se pueden considerar como satisfactorios. Una prueba promisorio, es que el liposoma vaya hacia su blanco por medio de anticuerpos. Se han hecho progresos por medio de uniones inespecíficas de anticuerpos unidos covalentemente a liposomas y se ha demostrado que se enlazan específicamente a las células blanco<sup>96,97,38</sup>.

En base a estas propiedades de los liposomas, decidimos utilizarlos como vehículo del AgLH en el modelo experimental y observar y valorar por medio de subpoblaciones de linfocitos la manera en que se modula la respuesta inmunológica del huésped, en comparación con el AgLH sin encapsular, además de observar la protección ejercida contra la parasitosis.

## HIPÓTESIS

Los antígenos principales del líquido hidatídico del metacéstodo de *Echinococcus granulosus* atrapados en liposomas, tienen mayor capacidad que los antígenos libres para modular la respuesta inmune del huésped e inducir protección.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Animales.

Se utilizaron ratones BALB/c<sup>23</sup> de ambos sexos de 8 a 12 semanas de edad desparasitados previamente, se mantuvieron con dieta estándar bajo condiciones de bioferio.

Los ratones se infectaron según el método descrito por Ganguly *et al*<sup>30</sup>; Los PSC se contaron en una cámara de Neubauer y los animales se inocularon por vía intraperitoneal (IP) con una suspensión de 2000 protoescolices (PSC) de *E. granulosus* en 2 ml de PBS estéril adicionado con 100 unidades/ml de penicilina sódica cristalina y 200 mg/ml de estreptomina. Los animales utilizados como controles sanos fueron inyectados con 2 ml de buffer salino fosfatos pH 7.2 (PBS), se separaron por sexo y se marcaron en las orejas para formar los diferentes grupos.

## Quistes hidatídicos.

Los quistes se obtuvieron del decomiso de hígados de cerdos parasitados, sacrificados en los rastros municipales de Zacatecas y Guadalupe, Zac. Se transportaron en refrigeración al laboratorio, se lavaron con agua corriente y se sumergieron en una solución de yodo al 1% durante 30 min. Se extrajeron el líquido y la arenilla hidatídica por punción y aspiración en condiciones asépticas.

Se utilizaron sólo quistes sanos fértiles (que no estuvieran calcificados, infectados o contaminados con componentes biliares) y el líquido con aspecto cristalino. Se mezclaron los líquidos de todos los quistes. La arenilla hidatídica se separó por sedimentación simple para obtener los PSC.

### ***Echinococcus granulosus* (Protoescólices).**

La arenilla hidatídica obtenida de los quistes se lavó con PBS pH 7.4 tres veces para separar los PSC y eliminar el LH, el sobrenadante se decantó cada vez, se valoró la viabilidad por medio de la observación de células en flama y del patrón de movimiento de los PSC, los que se pasaron a medio RPMI con 100 unidades/ml de penicilina y 200 mg/ml de estreptomycin; se inocularon de inmediato los ratones por vía intraperitoneal con jeringas para insulina, previo ayuno de 12 horas.

### **Modelo animal.**

Se formaron 4 grupos de 10 ratones cada uno, como sigue:

- Controles sanos para delimitar parámetros normales.
- Controles infectados con protoescólices.
- Inoculados con antígeno (300 µg) libre, por vía IP, siete días antes del desafío con PSC.
- Grupo inoculado por vía IP con antígeno (300 µg) atrapado en liposomas, siete días antes de retar con PSC.
- Sacrificio de todos los grupos 16 días después de las infecciones e inoculaciones.

## Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales (Ac Mo) que se utilizaron fueron donados por el Dr. José Moreno Rodríguez, del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. México, DF, los cuales fueron los siguientes.

NOMBRE	CONTRA	DETERMINA
GK 1.5	$\alpha$ CD 4	LT-cooperadores
LI T2 (ITs)	$\alpha$ CD 8	LT-supresores/citotóxicos
5 CG	$\alpha$ MAC-1	Macrófagos
CRIA-4 17.227	$\alpha$ JA VKD	Células portadoras de MHC-clase II (Ia)

## ATRAPAMIENTO DE Ag LH EN LIPOSOMAS.

(según técnica de M en C. Juan Manuel Alcocer, Dra. Cristina Rodríguez Padilla y Dr. Reyes Tamez Guerra)<sup>3</sup>.

- Se reconstituyeron 5 mgs de Ag hidatídico en 1 ml de PBS pH 7.2 estéril .

-En un matraz de 25 ml especial para un rotavapor, previamente estéril, se preparó la mezcla de lípidos con 5 mg de colesterol, 15 mg de fosfatidilcolina, 2.32 mg de ácido fosfatídico y 1 ml de cloroformo destilado, se cubrió el recipiente para evitar la oxidación de lípidos y se agitó vigorosamente por 30 minutos en un vórtex.

-Se colocó el matraz en el rotavapor durante 2 a 3 hrs a 37 - 38°C, a una presión de 101 libras para obtener una película de lípidos.

-Se hizo pasar un flujo de nitrógeno por la película de lípidos para eliminar las trazas de solventes que hubieran quedado.

-Una vez que se obtuvo la película se le agregó el LH reconstituido previamente y se sometió a agitación vigorosa con el vortex durante 45 minutos para obtener liposomas multilamelares.

-Para producir vesículas unilamelares, de tamaño uniforme, se utilizó el Extruder (Lipex, Biomembranes, Vancouver, Canadá) con membranas de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro.

-Los liposomas se pasaron por el Extruder 5 veces bajo una presión de nitrógeno entre 200 y 500 mm Hg.

-Los liposomas obtenidos de forma unilateral de 100 nm de diámetro (90 nm en promedio), se observaron por medio de microscopía electrónica en tinción negativa con acetato de uranilo al 2%, se colocaron en viales y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

El atrapamiento del AgLH se cuantificó dentro y fuera de los liposomas con la técnica de azul Comassie G-250; al sobrenadante en el que se encontraban los liposomas, se

le midieron las proteínas, y para cuantificarlas dentro de los liposomas, se procedió de la siguiente manera: a 500  $\mu$ l del preparado de liposomas con AgLH se le agregaron 500  $\mu$ l de Triton-X 100 al 1% para romperlos y medir su contenido. La concentración de proteína en ambos casos se leyó en espectrofotómetro a 610 nm de densidad óptica.



## **Antígeno.**

El antígeno se obtuvo en ambiente aséptico a partir de líquido hidatídico de hidátides de hígado de cerdo, se procesó según el método descrito por Varela Díaz *et al*<sup>85</sup>, se recolectó el líquido hidatídico por punción de los quistes y aspiración con aguja y jeringa. Se descartaron los quistes calcificados o infectados y sólo se utilizó el líquido cristalino. Se dejó reposar 30 minutos y se decantó, se centrifugó a 10 000 G a 4° C por 1 hora y el sobrenadante se dializó contra agua destilada pH 7. Se liofilizó el líquido en viales y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

## **Separación de fracciones principales del antígeno hidatídico (AgLH).**

El antígeno crudo se purificó parcialmente de acuerdo al procedimiento de Oriol *et al*<sup>57</sup> de la siguiente manera: el líquido concentrado 10 veces se colocó en bolsas de diálisis con poro de exclusión de 12 kDa; se dializó contra buffer de acetatos 0.005 M pH 5; se centrifugó a 50 000 G por 60 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se solubilizó en PBS 0.2 M pH 8.2, se dializó contra sulfato de amonio al 40% de saturación, se centrifugó a 10 000 G y se descartó el precipitado, en el sobrenadante quedaron las euglobulinas y los antígenos del parásito, éste se dializó contra agua destilada pH 7, y se liofilizó, se les determinó la concentración de proteínas por el método de azul Coomassie G-250 a una densidad óptica de 610 nm<sup>69</sup> y se guardó a - 20°C hasta su utilización posterior.

## **Antisueros.**

Se obtuvo suero de conejo hiperinmune con el esquema de inmunización de Varela Díaz *et al*<sup>85</sup>, el cual brevemente se describe a continuación. El antígeno obtenido se utilizó para la inoculación de conejos Nueva Zelanda juveniles previamente desparasitados; se aplicaron 8 inoculaciones, una cada semana con 5 mg de peso seco/ml del AgLH por vía subcutánea, en la región escapular, se alternaron los sitios de inoculación. Se disolvió la cantidad de AgLH correspondiente a cada inoculación en 0.5 ml de solución salina isotónica y se adicionaron 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, previa emulsión. Después de la primera inoculación, se sangraron los animales cada semana y se obtuvo el suero en cada ocasión, se colocó en viales y se guardó a -20°C hasta su utilización.

Se utilizaron sueros de control positivos y negativos y antígeno de referencia donados por el Centro Panamericano de Zoonosis - Organización Mundial de la Salud (CEPANZO-OMS) Argentina, Buenos Aires.

## **Inmuno doble difusión (IDD).**

Se disolvió agarosa al 1 % y azida de sodio al 0.001% en PBS, se homogeneizó y se depositaron 4 ml por portaobjeto, se dejó gelificar durante 30 minutos a -4%. Se hicieron 7 horadaciones en la agarosa de 4 mm de diámetro, uno central y 6 periféricos con una distancia entre los pozos de 5 mm, se colocaron 30 µl de la muestra antigénica en el pozo central y en los periféricos se depositaron los sueros de ratón hidatídico y de referencia.

Se dejó difundir durante 24 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y se lavaron varias veces con solución salina 0.15 M para eliminar precipitados inespecíficos. Se dio un último lavado con agua destilada y se dejó durante media hora también en agua destilada. Se tiñeron con azul Coomasie durante media hora y se aclararon con solución decolorante (figura 3 A).

### **Doble difusión 5 (DD5) Coltorti *et al*<sup>19</sup>.**

Se preparó un soporte de agar al 1.2 % (Agar Noble, Difco) en PBS (cloruro de sodio al 8.5 %, 9 partes y fosfato de potasio monobásico y dibásico al 0.1 M, pH 7.4, 1 parte) se agregó merthiolate a una concentración final de 1:5000. Se utilizaron 150 µl de suero problema, 150 µl de suero de referencia y 3µl de antígeno (a una concentración de 50 mg de peso seco en un ml de PBS). Se emplearon portaobjetos de 25X75 mm limpios y secos cubiertos con 4 ml de gel fundido y se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Los pozos para el suero fueron los laterales de 10 mm y para el antígeno fue el central de 1 mm con una distancia entre ellos de 5 mm.

Se colocaron en cámara húmeda de 24 a 48 horas a temperatura ambiente, las láminas se lavaron con solución salina al 0.9% por 36 horas a temperatura ambiente con 5 cambios en este lapso, se lavaron con agua destilada, se llenaron los pozos con gel y se dejaron secar en papel filtro a 37°C. Las láminas se sumergieron en agua destilada, luego se tiñeron con azul de Coomassie durante 30 minutos y se aclararon con solución decolorante a base de 400 ml de etanol, 100 ml de ácido acético glacial y 500 ml de agua destilada (figura 3 B).

## **Inmunoelectroforésis (IEF). Varela Díaz *et al*<sup>85, 18</sup>**

Se preparó la agarosa al 0.9% en solución amortiguadora de veronal pH 8.2 (10.309 gr de veronal sódico o 5-5 di-etil barbiturato de sodio, 100 mg de merthiolate en polvo, 800 ml de agua destilada hasta disolver, se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a un litro), se disolvió a baño María sin sobrepasar los 90°C. Se fraccionó la solución de agarosa en tubos (10 ml en cada uno), y se dejó gelificar, conservándolo a 4°C. Se disolvieron 200 mg de peso seco de antígeno por ml en buffer de veronal pH 8.2.

Las laminillas se cubrieron con 4 ml de agarosa. Se dejaron gelificar a temperatura ambiente, se transfirieron a una cámara húmeda y se refrigeraron a 4°C durante 30 min. Se perforó el gel de las láminas, en el pozo medio se alojó el antígeno y en las canaletas laterales el suero problema en una y el suero de referencia en la otra. El pozo medio se llenó con el antígeno (200 mg /ml), en seguida se colocó una pequeña gota de azul de bromofenol en el borde de la lámina a la altura del pozo del antígeno como indicador de la migración electroforética, el portaobjetos fue colocado en el recipiente de electroforésis y en cada extremo del gel se aplicó una tira de papel filtro embebida en buffer. Se corrió por 90 minutos a 100 volts (2.5 mA por laminilla), se finalizó el corrimiento cuando la mancha de bromofenol migró 35 mm. Ya finalizado el corrimiento del antígeno se retiró el gel de las canaletas laterales y se aplicaron los sueros problema y de referencia; las laminillas se colocaron en cámara húmeda y se dejaron difundir de 12 a 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la incubación fueron sumergidas las láminas en una solución de citrato trisódico al 5% durante 10 minutos para disolver los precipitados inespecíficos. El lavado, secado y teñido de las láminas se llevó a cabo como las de IDD5 (figura 3 C).

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).**

Se realizó en base a la técnica de Laemmli<sup>69</sup> con modificaciones de acuerdo a las condiciones del laboratorio de la siguiente manera; el corrimiento electroforético se hizo con el antígeno preparado en minigeles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones reductoras, con una concentración de acrilamida al 11% y la relación acrilamida-bisacrilamida fue de 1:60 en el gel separador.

El antígeno fue preparado por ebullición durante 3 minutos en buffer para muestras en condiciones reductoras (tris HCl 1M pH 6.8 4.685 ml, glicerol 7.5 ml, SDS 10% 1.5 grs, azul de bromofenol al 0.5% 1.5ml, EDTA 28 mg, H<sub>2</sub>O tridestilada aforar a 25 ml). De este stock se tomó 1 ml y se agregaron 150 µl de 2-mercaptoetanol y 2.5 mg de ditioneitol. Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular: ovoalbúmina (43 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). Se utilizó como buffer de corrimiento una parte del buffer concentrado 10 veces (tris base 0.5 M 15.5 g, glicina 0.3 M 71.32 g, SDS al 10% 10 ml, ajustar el pH a 8.4 y aforar con H<sub>2</sub>O tridestilada a 500 ml) y 9 partes de H<sub>2</sub>O tridestilada. Se utilizó un equipo Miniprotean II (Bio-Rad), se aplicaron 100 volts y se corrió por 2 horas, posteriormente el gel se tiñó con azul Coomassie, se aclaró con solución desteñidora y solución aclarante y se secó (figura 4).

## **ELECTROTRANSFERENCIA (*Western Blot*).**

El AgLH fue separado por PAGE, el gel sin teñir fue electrotransferido a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por Towbin<sup>83</sup> ; se utilizó para la transferencia buffer stock 8X (tris base 0.025M 24.228 g, glicina 0.192 M 115.3075 g, aforar a un litro de H<sub>2</sub>O tridestilada). Para preparar 6 litros se diluyó 1:10 (600 ml de buffer stock, 1200 ml de metanol, agua tridestilada 4200 ml pH 8.2). La transferencia se llevó a cabo en una cámara de minitrans-blot electrophoretic transfer cell (BIO-RAD) a 20 volts durante toda la noche a 4°C. Las proteínas fueron reveladas con el colorante Fast green al 0.1% durante 5 minutos y posteriormente decoloradas con agua destilada. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue cortado en tiras de 2 mm de ancho en forma paralela al corrimiento, se bloquearon a temperatura ambiente con PTX-ASB: PTX 10% (Na PO<sub>4</sub> 100 mM, Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub> 84mM, Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 16 mM, tritón X-100 al 2% 10 ml, NaCl 1.5 M, EGTA 10 mM, azida de sodio 0.06% 5 ml; aforar a 500 ml y a un pH 7.5), solución de trabajo PTX-ASB (albúmina de suero bovino 65 ml, PTX 10X 50 ml, aforar a 500 ml) en agitación suave. Las tiras se incubaron con los sueros problema y control a una dilución de 1:200 en PTX-ASB toda la noche en agitación suave. Se lavaron con solución de lavado GB (Tritón X-100 0.5% 2.5 ml, trietanolamina 5 mM pH 7.4 4.6 gr, NaCl 100 mM 2.92 gr, EDTA 1mM pH 7.4 0.38 gr, SDS 0.1% 0.5 ml, aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O tridestilada). Se lavaron en solución 1X (1:10) en agitación moderada 5 veces por 10 minutos cada una, posteriormente se le agregó PTX-ASB y se colocaron en agitación por 15 minutos. Los anticuerpos unidos al papel de nitocelulosa, se marcaron con proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA) SPA-<sup>125</sup>I, 90,000 cpm/ml de PTX, se incubaron por

45 minutos en agitación suave a temperatura ambiente, posteriormente las tiras de nitrocelulosa fueron lavadas con solución de GB cinco veces durante 10 minutos cada una, se secaron y montaron en cartulina, se pasaron a autorradiografía utilizando película Kodak XAR5 en casetes con pantalla intensificadora, las bandas antigénicas se revelaron incubándose por 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  (figura 5).

### **Técnica de inmunoperoxidasa (IPX).**

Se determinaron las poblaciones de células mononucleares en tejido hepático con la técnica de inmunoperoxidasa según Sato *et al*<sup>68</sup>, la que se describe con las modificaciones hechas en el laboratorio: a la recolecta de hígados de ratones experimentales, siguió la selección del material a procesar. Se hicieron cortes histológicos en congelación por medio del crióstato e inmediatamente después de obtenidos, se fijaron en acetona fría por 5 minutos, se lavaron con PBS 5 minutos y se incubaron con suero de caballo al 2% descomplementado por 30 minutos.

Se lavaron dos veces con PBS en agitación magnética 5 minutos, se incubaron 30 minutos con anticuerpos monoclonales en cámara húmeda y nuevamente se lavaron con PBS 2 veces en agitación magnética por 5 minutos, se incubaron 30 minutos con anti IgG de ratón marcada con peroxidasa, se lavaron 2 veces con PBS en agitación magnética por 5 minutos, se revelaron con 3,3-diaminobencidina por 10 minutos, se lavaron con agua destilada y se contrastaron con hematoxilina durante 3 minutos (figura 6 A,B,C,D, E, F y G). Se lavaron en agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron con resina sintética, se observaron al microscopio de luz y se contaron las células de la siguiente manera:

Se contataron las células marcadas con IPX de diez campos a 40 X de cada monoclonal y cada ratón, y se calculó la media de cada población, tabla 2, 3, 13, 14, 15 y 16. (Según condiciones estandarizadas en el Centro de Biología Experimental UAZ.).

### **Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

La determinación de las poblaciones de células mononucleares en sangre periférica por la técnica de inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo con fundamento en la de Laroche *et al*<sup>45</sup>, la cual se describe a continuación, con las modificaciones hechas en el laboratorio; se utilizó el paquete leucocitario de los ratones, obtenido de 1 ml de sangre periférica heparinizada; se separó el paquete de linfocitos con Ficoll-Hypaque en una relación 1:2; se centrifugó a 2000 rpm durante 45 minutos a -4°C, se separó la interfase y se lavaron 2 veces en solución de HANK'S a 2000 rpm a -4°C 10 minutos. Los linfocitos obtenidos se contaron en cámara de Neubauer hasta tener una concentración  $\geq 4 \times 10^6$  células por ml, se les agregó 20  $\mu$ l de los anticuerpos monoclonales CD4, CD8, MAC y CRIA-4, y se incubaron a una dilución de 1:200, durante 30 minutos; las células se lavaron con solución de HANK'S y se incubaron con anti IgG de ratón conjugada a isotiocianato de fluoresceína a una dilución de 1:400; nuevamente se lavaron 2 veces con solución de HANK'S y se resuspendieron en 10 ml de la misma solución e inmediatamente se leyeron en el microscopio de epifluorescencia de la siguiente manera; se contaron 100 células de cada monoclonal y cada ratón. Se obtuvo la media de cada población de células marcadas con fluoresceína, tabla 4, 17, 18, 19 y 20, (según condiciones estandarizadas en el Centro de Biología Experimental UAZ.).



## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para determinar las diferencias entre los grupos celulares se utilizaron las pruebas, chi cuadrada ( $X^2$ ) y T de Student<sup>47, 75</sup> con los procesadores estadísticos; Statistical Graphics System, versión 2.0 y Epistat.

## RESULTADOS

### Desarrollo de la hidatidosis hepática murina.

El presente trabajo evalúa el efecto protector del AgLH de *Echinococcus granulosus* libre y atrapado en liposomas en un modelo experimental por lo cual se estableció un modelo murino para estudiar la respuesta inmune en hidatidosis. Primariamente establecimos las condiciones óptimas para el desarrollo de quistes hidatídicos en ratones BALB/c. En este modelo encontramos 1) La inoculación intraperitoneal con protoescólices vivos obtenidos de quistes hidatídicos de hígados porcinos, tienen gran utilidad para la inducción de hidatidosis murina, ya que la mayoría de los ratones desarrollan quistes hidatídicos. 2) El número óptimo de protoescólices para desarrollar infección murina fue de 2000, un número menor es deficiente para una adecuada implantación hepática, por otro lado un número mayor (5000) habitualmente indujo la muerte de los ratones. 3) Una vez establecidas las condiciones, los animales utilizados en el presente estudio desarrollaron hidatidosis hepática con una sola administración IP de PSC.

Para demostrar la presencia de quistes hidatídicos, los animales experimentales fueron sacrificados con sobredosis de éter etílico inhalado, acto seguido fueron disecados y se hizo un examen macroscópico de la cavidad abdominal, poniendo especial atención en las vísceras. Los animales infectados desarrollaron quistes de 1 a 6 mm de diámetro en parénquima hepático, eventualmente los animales sacrificados desarrollaron quistes en epiplón; no se encontraron quistes en otras

vísceras u órganos de la cavidad abdominal. Todos los animales fueron disecados de la cavidad torácica y en ningún caso se encontraron quistes pulmonares y/o pleurales (figura 6 A).

Después del análisis macroscópico, todos los hígados se evaluaron histológicamente. En el grupo de animales infectados invariablemente se encontraron implantes con un promedio 8.8 quistes en hígado (tabla 1). Microscópicamente se observó una reacción inflamatoria granulomatosa en el parénquima hepático, con lisis de hepatocitos y necrosis del sitio de implante del quiste. En la estructura quística se observaron las membranas laminar y germinativa, en algunos quistes se encontraron protoescólices (figura 6 B, C, D, E, F y G).

### **Evaluación del implante de quistes hidatídicos en los grupos de ratones.**

1.- *Grupo de ratones control sano.* Este grupo fue pareado por peso, edad y sexo con los grupos restantes, con la finalidad que las condiciones experimentales fueran similares, este al igual que los otros grupos fueron mantenidos en el mismo ambiente de bioteio durante el desarrollo del estudio. Los animales sanos fueron inyectados en cavidad abdominal con 2 ml de PBS y fueron sacrificados a las 16 semanas, en ningún caso se observaron quistes hidatídicos en ningún órgano, epiplón ni peritoneo. No se observó ninguna patología asociada y/o inducida por la administración intraperitoneal de PBS estéril. El examen histológico del parénquima hepático resultó normal.

2.- *Grupo de ratones control infectado.* Todos los animales infectados desarrollaron quistes hepáticos hidatídicos productivos con un promedio de 8.8 quistes y un rango de 6-12 quistes (tabla 1). Complementariamente se observaron quistes en epiplón y peritoneo todos improductivos. También se encontraron quistes hepáticos improductivos con una media de 2.6 quistes, macroscópicamente observamos hiperemia hepática en el sitio de implante. Los hallazgos microscópicos fueron descritos previamente, llamó la atención el aumento en el número de células inflamatorias hepáticas más de 10 veces. Al comparar el número de células en animales infectados con los controles encontramos una diferencia altamente significativa  $p < 0.05$  ( $X^2$ ).

3.- *Grupo de ratones tratados con AgLH libre y retados con PSC.* En este grupo se intentó evaluar el efecto protector inducido por la pre-inmunización con antígeno extraído de líquido hidatídico. Los animales fueron retados con protoescólices viables siete días después de ser inmunizados, al igual que los grupos restantes los animales fueron sacrificados a las 16 semanas. El 40 % de los animales desarrollaron quistes hidatídicos no productivos, el promedio para el total del grupo fue de 0.6 quistes. Por otro lado no se encontraron quistes en otros órganos, en peritoneo ni epiplón. Microscópicamente la improductividad de los quistes fue evidenciada por la ausencia de protoescólices, el número de células inflamatorias no aumentó lo esperado en los infiltrados hepáticos al ser comparadas con los controles sanos. Al comparar el número de quistes en animales infectados con los controles, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

4.- Grupo de ratones tratados con AgLH atrapado en liposomas y retados con PSC. Como en el grupo anterior solo el 40 % de los animales lograron ser infectados cuando fueron tratados con anígeno atrapado en liposomas, además todos los quistes hepáticos observados resultaron improductivos y la media resultó de 0.4 siendo el número de células mayor que en el grupo previo, pero no estadísticamente diferente a los controles sanos ( $p>0.05$ ). No se observaron quistes en otros órganos, peritoneo ni epiplón. No se observó ninguna otra patología.

## **ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS**

### **Características del antígeno.**

El antígeno soluble obtenido de líquido hidatídico fue parcialmente purificado por un procedimiento de precipitación con sales de acetato y sulfato, el exceso de sales fue eliminado mediante diálisis exhaustiva contra agua destilada, las proteínas así obtenidas fueron liofilizadas y el polvo fue resuspendido en agua tridestilada usando una proporción de 100 mg de peso seco/ ml de agua estéril. Esta mezcla fue homogeneizada por agitación magnética toda la noche a 4° C y la cantidad de proteínas fue estandarizada por el método de azul de Coomassie, encontrando una concentración de 5 mg/ml a una densidad óptica de 610 nm. Se tomó como estándar la gráfica obtenida con albúmina sérica bovina, usando diluciones de 1, 5 y 10 microlitros del AgLH.

## **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- *E. granulosus* POR TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN EN GEL.**

El antígeno del LH probado con suero testigo positivo de referencia y con suero hiperinmune, mostró reacción de precipitación por DD5 (figura 3 B) a las 24 horas. Los sueros de los animales infectados mostraron fuerte reactividad inmunológica contra el líquido hidatídico total, así como con el antígeno parcialmente purificado por precipitación salina (3 A). Además en estos sueros se estableció la identidad inmunológica total usando los sueros de referencia gentilmente proporcionados por la OMS de Argentina.

Por la técnica de IEF el suero de referencia mostró el arco 5 de Capron el que tenía identidad inmunológica con los sueros de animales infectados. A partir de la segunda semana de inoculación, los sueros de los grupos 2,3 y 4 fueron positivos exhibiendo bandas de precipitación similares, características del arco 5. Los controles resultaron negativos.

## **ELECTROFORÉISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).**

Se utilizaron seis muestras diferentes de AgLH aisladas cada una de quistes fértiles de hígado de cerdos infectados, las seis muestras antigénicas exhibieron un patrón de bandeo antigénico similar. Usando condiciones reductoras en PAGE, encontramos más de veinte bandas proteicas con pesos moleculares con rangos de 5 a 200 kD, de estas encontramos cinco bandas mayores con pesos

moleculares de 72, 60, 52, 42 y 31 kDa, las más relevantes fueron las de 72, 60 y 31 kDa. Por otro lado el antígeno de referencia proporcionado por el CEPANZO-OMS de Argentina, dio el mismo patrón electroforético que el encontrado en nuestro antígeno (figura 4).

### **ELECTROTRANSFERENCIA (*WESTERN BLOT*).**

Los antígenos separados por PAGE y no teñidos fueron electrotransferidos a papel de nitrocelulosa, encontrando que las condiciones de transferencia del antígeno hidatídico son similares para otras fracciones proteicas, también encontramos que transferencias a mayor voltaje (40-50 V) durante durante 3 horas y a 4°C proporcionaban resultados similares a los obtenidos por transferencias prolongadas. En todos los casos la transferencia protéica al papel de nitrocelulosa fue corroborada, tiñendo el papel con el colorante "Fast green", esto permitió marcar las bandas antigénicas con puntos muy finos de lápiz con la finalidad de ubicar las bandas inmunoreactivas al ser comparadas con la autorradiografía y los geles teñidos; se hizo lo propio con los estándares de peso molecular.

Los anticuerpos de los animales inmunizados con AgLH reconocieron principalmente las bandas de 60 kDa y 31kDa, aunque existieron bandas antigénicas menores. Los animales sanos no reconocieron bandas antigénicas.

Los antígenos reactivos a los sueros prototipo, reconocieron las mismas bandas de los animales infectados (inmunizados o no), por lo que consideramos que

estas pueden corresponder a las unidades más representativas del antígeno 5 de Capron, la de 60 kDa y del antígeno B, la de 31 kDa (figura 5).

## **POBLACIONES DE LINFOCITOS EN TEJIDO HEPÁTICO**

Encontramos diferencias en el número de células de los infiltrados hepáticos al comparar el grupo de animales sanos (tabla 13) con los animales infectados (tabla 14), en los controles eventualmente se lograron observar células inflamatorias en el parénquima hepático. El número de células en los animales sanos a las 16 semanas fue de 56 células, el número se elevó a 386.4 células en promedio en animales infectados. Por otro lado al comparar los números de células obtenidos en los animales pre-inmunizados con antígeno hidatídico libre (tabla 15) o atrapado en liposomas (tabla 16), fue mayor que los controles sanos, pero significativamente menor que en los animales infectados (tabla 2 y 3).

Al hacer el estudio fenotípico de los infiltrados inflamatorios, se encontraron diferencias significativas en el número de células  $CD4^+$  de los grupos 1 ( $14 \pm 6.8$ ) y 2 ( $96 \pm 72$ ) con una  $p < 0.05$ . Además los números de células cooperadoras en los grupos 3 y 4 estuvieron por encima de los controles, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. El número de células  $CD4$  aumentó significativamente en los animales infectados al compararlo con los grupos 3 y 4 de animales inmunizados  $p < 0.05$  (Tabla 5, gráfica 1).

Las células citotóxicas  $CD8^+$ , también aumentaron significativamente en el grupo de animales infectados ( $66 \pm 58$ ), al compararla con los controles sanos ( $10 \pm 6.2$ ),



con una  $p < 0.05$ . Las diferencias encontradas entre el grupo 1 y 3 y 4 no fueron significativas, pero al comparar el número de células del grupo 2 con el 3 y el 4 hubo diferencias estadísticamente significativas  $p > 0.05$  (Tabla 6, gráfica 1).

Los macrófagos identificados con el monoclonal MAC1 representaron el fenotipo celular mayor en el control, por encima de las células cooperadoras y citotóxicas y tuvieron un promedio de  $19.1 \pm 8.4$ , pero la cantidad de macrófagos hepáticos en animales infectados resultó significativamente mayor  $61.5 \pm 48$   $p < 0.05$  (tabla 7, gráfica 1).

Las células portadoras de moléculas de clase II, que corresponden a células de Kupffer y macrófagos (tabla 8), exhibieron cifras mayores en el grupo 2 de animales infectados, como en los casos previos hubo diferencias significativas al ser comparadas con los grupos restantes (gráfica 1).

#### **POBLACIONES DE CMN EN SANGRE PERIFÉRICA.**

Los porcentajes de células marcadas con los monoclonales descritos, en general fueron bajos para todos los grupos de animales estudiados (tabla 4, 17, 18, 19, y 20). Estos resultados probablemente fueron debido a que el conteo celular se hizo manualmente observando las células en un microscopio de epifluorescencia. Las poblaciones de CD4 aumentaron en los animales infectados del grupo 2, no obstante, al comparar las poblaciones de células de los grupos 3 y 4 no hubo diferencias significativas  $p > 0.05$  (Tabla 9, gráfica 2).

Las células citotóxicas CD8 también mostraron elevación significativa en el grupo 2 al ser comparadas con los grupos restantes con  $p < 0.05$ , las diferencias encontradas entre los grupos 1, 3 y 4 fueron más discretas (Tabla 10, gráfica 2) . El índice de células T ayudadoras/T citotóxicas-supresoras ( $T_A/T_C$ -s), se invirtió en el grupo infectado (tabla 22).

El monoclonal Mac-1 marca en sangre periférica a los monocitos y a las células NK y el número mayor de células con este marcador correspondió al de animales infectados y no inmunizados (grupo 2). Al comparar los porcentajes del grupo 2 y los restantes resultaron significativamente diferentes, con  $p < 0.05$  (Tabla 11, gráfica 2).

Las células de sangre periférica que expresaron moléculas de clase II, marcadas por el monoclonal CRIA-4 fueron mayores en el grupo 2 de animales infectados y al comparar sus niveles con los animales sanos, hubo diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$ . Entre los grupos restantes las diferencias fueron discretas (Tabla 12, gráfica 2).

## DISCUSIÓN

Para establecer el modelo animal se tomaron en cuenta las experiencias de otros investigadores, ya que había reportes previos de hidatidosis hepática en ratones singénicos BALB/c, C57BL/6J, CBA, ATH, C57/BL10 y C57/BL6, de las cuales la primera, BALB/c representaba para este trabajo la mejor opción. Por medio del aislamiento de quistes fértiles de origen porcino, obtenidos en condiciones asépticas, se logró inducir hidatidosis en ratones BALB/c. La inoculación intraperitoneal permitió observar que los protoescolices tienen especial tropismo por los hepatocitos, de tal forma que el modelo murino resultó de gran conveniencia para estudiar la respuesta inmune en la enfermedad hidatídica.

Para evaluar el implante del quiste en nuestro modelo, tuvimos paralelamente que compararlo con el implante de quistes hidatídicos en cerdos, en los cuales la mayoría de los quistes se desarrollan en hígado, hallazgo que resulta lógico ya que los huevos de *E. granulosus*, al ser ingeridos por el animal, pasan a la circulación porta y en algunos casos a la circulación sistémica. En el modelo propuesto se esperaba encontrar quistes hepáticos e implantes de quistes fértiles en otras vísceras, ya que la vía de administración fue intraperitoneal y evita la circulación porta, permitiendo en teoría implantarse en una amplia superficie de la serosa peritoneal. Las razones por las cuales el sitio de implante fue el hígado, aún no las hemos determinado.

En relación al proceso inflamatorio, es evidente que la administración intraperitoneal del parásito induce tanto una respuesta inmune local en hígado

como sistémica, manifestadas por cambios hematológicos de células mononucleares. Los animales infectados y no inmunizados presentaron un mayor número de células portadoras de moléculas de clase II definidas por el monoclonal CRIA-2, esta observación sugiere que estas células corresponden a células presentadoras de antígeno los cuales interactúan con células Tcooperadoras (TH<sub>1</sub> y TH<sub>2</sub>) en forma de macrófagos activados y/o células de Kupfer; por otro lado, se encontró el número de células cooperadoras (CD4) y citotóxicas (CD8), que activamente producen citocinas que promueven la inflamación y ayudan a limitar el proceso infeccioso en eventos tardíos de reparación tisular. Es de llamar la atención que los infiltrados en hígado o los niveles de células en sangre periférica de los grupos 3 y 4 de animales inmunizados con el antígeno hidatídico y después infectados con el parásito, no se elevaron a niveles comparables a los de animales infectados y no inmunizados, no obstante, los ratones de los grupos 3 y 4 desarrollaron menor cantidad de quistes, los cuales no fueron fértiles y el número de células en su conjunto fue menor en el sitio de implante del quiste, estos resultados pudieran sugerir un efecto protector desencadenado por la inmunización.

Llama la atención que el porcentaje de macrófagos resultó discretamente mayor en el grupo de animales inmunizados con antígenos atrapados en liposomas, al igual que las células portadoras de moléculas de clase II, lo cual podría sugerir que el antígeno incorporado en forma liposomal favorece la fagocitosis, el procesamiento y la presentación de antígeno, cuyo efecto probablemente se traduce en una protección ya que se encontró un menor número de quistes.

Los resultados obtenidos en el modelo animal de esta investigación son similares a los reportados por otros autores<sup>25, 30, 20</sup>, donde la infección seguida a la inoculación IP provee de un número aceptable de quistes que ayudan a evaluar la respuesta inmune del huésped contra *E. granulosus*. La cinética de respuesta sugiere que en los animales inoculados con los PSC, por vía IP, se estimula la captación y englobamiento del antígeno por los macrófagos peritoneales (MAC-1), luego el antígeno se procesa y es presentado a las células CD4<sup>+</sup> vía moléculas de clase II. Los ratones protegidos con AgLH atrapado en liposomas, mostraron elevación de las células con fenotipo MAC-1, lo que concuerda con lo propuesto por Waine y McManus, 1995<sup>88</sup>, en donde la respuesta se genera por las proteínas del parásito componentes del antígeno 5 de Caprón y el antígeno B (68 y 30 kDa), que son endocitadas, luego forman los endosomas tempranos donde luego de sufrir acción enzimática, los péptidos antigénicos, son ensamblados con las cadenas en este compartimiento celular alpha y beta de moléculas clase II de CMH las que forman un complejo maduro antígeno-CMH clase II en el endosoma tardío, que después es presentado a las células Th1 (Tcooperadoras) CD4<sup>+</sup>, inician un proceso de amplificación clonal a través de mitosis, las clonas resultantes proveen señales de ayuda para la producción de células sensibilizadas y de anticuerpos específicos por células B, además de los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Por otro lado la respuesta del organismo huésped al contacto masivo con los componentes mayores del líquido hidatídico, (lípidos, aminoácidos y carbohidratos) que son las principales sustancias asociadas con los efectos tóxicos por los

antígenos del parásito, observados en varios experimentos, han llevado al shock anafiláctico incluso hasta la muerte<sup>23,6</sup>. Esta elevada respuesta puede deberse a la acción de los carbohidratos, sin embargo cuando se miden proteínas al mismo, no son abundantes, lo que puede también estar dando una respuesta independiente de células T como han observado Cox *et al*<sup>21</sup>.

Las CMN con fenotipo CD8 fueron las más elevadas en sangre periférica en los ratones parasitados, lo que sugiere gran actividad citotóxica; en la relación de T<sub>H</sub>/T<sub>C</sub>-s hay una inversión 1:2 (tabla 22), lo que nos indica el mismo evento; sin embargo en las poblaciones protegidas la relación T<sub>H</sub>/T<sub>C</sub>-s se conserva 2:1 (tabla 22). En correspondencia con otros autores que hicieron investigaciones en hidatidosis multilocular murina, las células CD8 se incrementaron en bazo, interviniendo en la regulación de la supresión en la respuesta inmune. En otros estudios llevados a cabo por Riley *et al*, infectaron ganglios de ratones con PSC de *E. granulosus*, con lo que demostraron que la relación Lyt 1<sup>+</sup> a Lyt 2<sup>+</sup> disminuyó a los 21 días después de la infección, estos experimentos dieron un lugar importante al papel que juegan las poblaciones celulares Lyt 1<sup>-</sup> - Lyt 2<sup>+</sup> (putativa T<sub>C</sub>-s) en la regulación de la respuesta inmune antiparasitaria<sup>62,63,64</sup>. La supresión no específica puede ser suficiente para la sobrevivencia de los PSC en el huésped, como ya se ha reportado es característica de varias infecciones parasitarias como malaria, esquistosomiasis y tripanosomiasis<sup>40</sup>. En estudios hechos por Vuitton *et al* (1989)<sup>87</sup>, en pacientes con *E. alveolar* las poblaciones de CMN en sangre periférica la relación de células T CD4/CD8 fue de 2:1 (tabla 22) y en el tejido hepático la relación de células T CD4/CD8 fue de 1:2 (tabla 21) lo que está en discrepancia con nuestros resultados sin embargo, ellos consideran que

esta variación fenotípica puede estar relacionada con la resistencia o sensibilidad a la infección, por otro lado, las diferencias pueden ser debidas al tiempo de estudio después de inducir la infección. En este estudio se determinaron las subpoblaciones celulares a la semana 16.

Al utilizar el AgLH de *E. granulosus* en un vehículo como son los liposomas se esperaba una mejor respuesta que en los animales tratados solamente con el AgLH, ya que este vehículo favorece la internalización del antígeno y por lo tanto su procesamiento, Nuestros resultados demuestran que el comportamiento de todas las poblaciones celulares tanto en tejido como en circulación, fue sensiblemente igual en los grupos control sano que en los grupos tratados tanto con AgLH como con AgLH en liposomas y retados con PSC, estos resultados probablemente no reflejan la cinética celular inductora de la protección que se inicia desde la 1ª semana ya que la determinación de los fenotipos celulares se hizo a la semana 16.

En síntesis, con los resultados de esta investigación confirmamos que las CMN juegan un papel muy importante en el reconocimiento de los PSC de *E. granulosus* y en la subsecuente respuesta inflamatoria, y que la utilización del antígeno atrapado o no en liposomas puede ser una alternativa en la protección del huésped contra la hidatidosis.

6) En la sangre periférica de los ratones infectados las CMN con fenotipo CD8 fueron la población más elevada, que parece ser un reflejo de un mecanismo efector citotóxico para limitar la infección.

7) En tejido hepático de los ratones tratados con AgLH/Lip y retados con PSC la población de CMN con fenotipo MAC-1 fue la más elevada, esto podría indicar un importante papel de los macrófagos en la protección del huésped contra *E. granulosus*, como célula presentadora de antígenos y/o como célula efectora.

8) Los inmunógenos hidatídicos tienen un efecto protector contra la infección.



## COMENTARIOS

Esta investigación permitió conocer más acerca de los componentes de AgLH y de la importancia de algunas proteínas del antígeno 5 de Capron, que intervienen directamente para generar una respuesta protectora. La utilización de la técnica de inmunoelectrotransferencia (*western blot*), puede ser una importante herramienta molecular para afinar el diagnóstico serológico de la enfermedad, abriéndose otras expectativas para conocer mas acerca de las características moleculares específicas de la hidatidosis.

Al conocer el comportamiento del parásito en el huésped así como en el medio celular, tenemos nuevas perspectivas, para ampliar los conocimientos de la respuesta inmune y su influencia en la relación huésped-parásito, lo que hace necesario seguir con el estudio de *E. granulosus* y de la hidatidosis. La biotecnología en antígenos recombinantes y el conocimiento del DNA-RNA de *E. granulosus*, será la forma de acceso para conocer vías para desafiar a la parasitosis y para establecer en un futuro estrategias de protección como base para el control y el comienzo de la elaboración de métodos biológicos de control de la enfermedad.

## RECOMENDACIONES

Es importante continuar los estudios epidemiológicos, parasitológicos, inmunológicos y de genética molecular del *E. granulosus* y de la hidatidosis, ya que por una parte la raza porcina de *E. granulosus* no ha sido suficientemente estudiada y aunque se encuentra en forma mas o menos habitual en Europa del Este, los estudios realizados en Zacatecas son los primeros reportes del comportamiento de esta raza en la región neártica y subtropical en América. Por otra parte, la importación del ganado ovino procedente de Australia a la República Mexicana puede ser la forma mas directa para importar la raza ovina de *E. granulosus*, altamente patógena para el humano en contra posición de la raza porcina, de baja patogenicidad para el hombre. Ante esta eventualidad las Autoridades Mexicanas de Sanidad Animal y de la Secretaría de Salud, deben tomar las precauciones que el caso requiere, como sería que el ganado importado estuviera acompañado de un certificado de no portación de hidatidosis, apoyado por las pruebas inmunológicas específicas correspondientes y expedido por las autoridades sanitarias del país exportador, bajo la vigilancia de las autoridades mexicanas.

CENTRO	CANTIDAD	REFERENCIAS
AUSTRALIA	A\$ 1.2 millones	Kumaratilake and Thompson (1982) <sup>41</sup>
CHILE	US\$ 5 millones	Neghme and Silva (1970) <sup>56</sup>
GRECIA	US\$ 20 millones	Vassalos <i>et al</i> (1984) <sup>86</sup>
ITALIA	L 33 billones	Arru <i>et al</i> (1984) <sup>7</sup>
REINO UNIDO	UK £ 250,000	Clarkson (1978) <sup>17</sup>

**Cuadro 1.-** Estimación anual de pérdidas económicas en rastros, causadas por decomisos de órganos infectados con hidátides.

- Metabolizables.
- Fáciles de preparar.
- No son tóxicos ni antigénicos.
- Las moléculas son atrapadas sin unión química.
- Las moléculas sensibles son protegidas de la degradación o inactivación.
- Debido a su permeabilidad constituyen un sistema de liberación de moléculas dependiente del tiempo.
- Aumentan la incorporación de moléculas al citoplasma.
- Retardan la metabolización de moléculas atrapadas en las vesículas.
- El patrón de distribución en el organismo puede ser controlado por la clase de lípido, tamaño, carga, permeabilidad y ligandos acoplados a la superficie de las vesículas.
- Tienen un alto rango en el transporte de moléculas ya que pueden ser liposolubles así como hidrosolubles.

**Cuadro 2.-** Propiedades generales de los liposomas.

INFEC	10+	7+	11+	6+	9+	8+	10+	12+	6+	9+	8.8
PERIT	2	2	3	1	2	3	5	3	2	3	2.6
AgLH	2	0	0	0	2	1+	0	1+	0	0	0.6
PERIT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AgLH/L	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0.4
PERIT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 1.-** Número de quistes encontrados en hígado y peritoneo de ratón, en los diferentes grupos estudiados.

	CD4	CD8	MAC-1	CRIA-4	TOTAL
SANOS	14.7	10.9	19.1	11.3	56
INFECT	96.6 24.8%	66.9 17%	61.5 15.8%	161.4 41.7%	386.4
AgLH	15.7 23.8%	8.8 12.6%	21.5 33.3%	17.9 26.9	63.9
AgLH/LIP	27.5 20.6%	19.9 14.5%	54.8 43.1%	25.3 19.0%	127.5

**Tabla 2.-** Células de tejido hepático marcadas con IPX.

Ac Mo	CD4	CD8	MAC-1	CRIA-4
Control sano	14.7	10.9	19.1	11.3
Control infectado	96.6	66.9	61.5	161.4
Tratado con AgLH	15.7	8.8	21.5	17.9
Tratado con AgLH/LIP	27.5	19.9	54.8	25.3

Control sano Vs infectados	diferentes	T= P <0.05
Control sano Vs trat/AgLH	iguales	T= P >0.05
Control sano Vs trat/AgLH-Lip	iguales	T= P >0.05
Control infectado Vs trat/AgLH	diferentes	T= P <0.05
Control infectado Vs trat/AgLH-Lip	diferentes	T= P <0.05

**Tabla 3.-** Valores medios y significancias en poblaciones de CMN de los diferentes grupos en tejido hepático.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	14.7 Vs 96.6	P <0.05 T= 3.849278	Diferentes
1 Vs 3	14.7 Vs 16.7	P >0.05 T= 1.279204	Iguales
1 Vs 4	14.7 Vs 27.5	P >0.05 T= 1.9731	Iguales
2 Vs 3	96.6 Vs 16.7	P <0.05 T= 3.60678	Diferentes
2 Vs 4	96.6 Vs 27.5	P <0.05 T= 2.787063	Diferentes
3 Vs 4	16.7 Vs 27.5	P >0.05 T= 1.887809	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 5.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador CD4 con técnica de IPX.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	10.9 - 66.9	P <0.05 T= 3.153019	Diferentes
1 Vs 3	10.9 - 8.8	P >0.05 T= 1.6904	Iguales
1 Vs 4	10.9 - 20.25	P >0.05 T= 1.994843	Iguales
2 Vs 3	66.9 - 8.8	P <0.05 T= 3.211361	Diferentes
2 Vs 4	66.9 - 20.2	P <0.05 T= 2.363263	Diferentes
3 Vs 4	8.8 - 20.2	P >0.05 T= 2.865564	Diferentes

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 6.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador CD8 con técnica de IPX.



GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	19.1 - 61.5	P <0.05 T= 2.768464	Diferentes
1 Vs 3	19.1 - 21.5	P >0.05 T= 0.407855	Iguales
1 Vs 4	19.1 - 54.8	P <.05 T= 2.520163	Diferentes
2 Vs 3	61.5 - 21.5	P <0.05 T= 2.599498	Diferentes
2 Vs 4	61.5 - 54.8	P >0 .05 T= 0 3142079	Iguales
3 Vs 4	21.5- 54.8	P >0.05 T= 2.243155	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 7.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador MAC-1 con técnica de IPX.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	11.3 - 161.4	P <0.05 T= 2.503094	Diferentes
1 Vs 3	11.3 - 17.9	P <0.05 T= 3.307358	Diferentes
1 Vs 4	11.3 - 25.8	P >.05 T= 2.110433	Iguales
2 Vs 3	161.4 - 17.9	P <0.05 T= 2.383879	Diferentes
2 Vs 4	161.4 - 25.8	P >0.05 T= 2.153326	Iguales
3 Vs 4	17.9 - 25.8	P >0.05 T= 1.312843	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 8.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador CRIA-4 con técnica de IPX.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	6.5 - 17.8	P <0.05 T= 4.497668	Diferentes
1 Vs 3	6.5 - 10.3	P <0.05 T= 2.604396	Diferentes
1 Vs 4	6.5 - 7.4	P >.05 T= 0.4651717	Iguales
2 Vs 3	17.8 - 10.3	P <0.05 T= 2.96335	Diferentes
2 Vs 4	17.8 - 7.4	P <0.05 T= 3.929583	Diferentes
3 Vs 4	10.3 - 7.4	P >0.05 T= 2 129566	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 9.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador CD4 con técnica de IFI.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	2.4 - 23.6	P <0.05 T= 5.162719	Diferentes
1 Vs 3	2.4 - 6.1	P <0.05 T= 4.253529	Diferentes
1 Vs 4	2.4 - 5.3	P <0.05 T= 2.917887	Diferentes
2 Vs 3	23.6 - 6.1.	P <0.05 T= 4.0522	Diferentes
2 Vs 4	23.6 - 5.3	P <0.05 T= 3.961963	Diferentes
3 Vs 4	6.19 - 5.3	P >0.05 T= 0.671871	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 10.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador CD8 con técnica de IFI.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	5.0 - 13.1	P <0.05 T= 3.571599	Diferentes
1 Vs 3	5.0 - 7.2	P >0.05 T= 1.5157	Iguales
1 Vs 4	5.0 - 6.5	P >0.5 T= 1.4795	Iguales
2 Vs 3	13.1 - 7.2.	P <0.05 T= 2.099274	Diferentes
2 Vs 4	13.1 - 6.5	P <0.05 T= 3.07578	Diferentes
3 Vs 4	7.2 - 6.5	P >0.05 T= 0.5152696	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 11.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador MAC-1 con técnica de IFI.

GRUPO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA/ VALOR DE T	RESULTADO/ POBLACIONES
1 Vs 2	3.4 - 11.6	P < 0.05 T= 3.342687	Diferentes
1 Vs 3	3.4 - 8.3	P < .05 T= 3.49505	Diferentes
1 Vs 4	3.4 - 7.2	P > 0.5 T= 2.0827	Iguales
2 Vs 3	11.6 - 8.3.	P > 05 T= 1.495714	Iguales
2 Vs 4	11.6 - 7.2	P < 0.05 T= 2.441098	Diferentes
3 Vs 4	8.3 - 7.2	P > 0.05 T= 0.711862	Iguales

Grupo 1                    control sano  
 Grupo 2                    control infectado  
 Grupo 3                    tratado con AgLH  
 Grupo 4                    tratado con AgLH-liposomas

**Tabla 12.-** Pruebas estadísticas en valores de células con marcador CRIA-4 con técnica de IFI.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	$\bar{X}$
CD 4	14	14	24	29	17	10	11	11	10	7	14.7
CD 8	8	10	16	19	12	9	7	10	13	5	10.9
MAC-1	19	14	22	27	38	15	8	13	18	17	19.1
CRIA-4	5	7	12	25	22	11	2	10	11	8	11.3

**Tabla 13.-** Resultados obtenidos en ratones sanos (grupo control) marcados con AcMo y con técnica de IPX. Promedio de valores totales de CMN en lectura de diez campos microscopicos a 100 X.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	$\bar{X}$
CD 4	178	75	188	188	38	21	28	152	28	70	96.6
CD 8	8	106	87	186	61	24	22	129	17	29	66.9
MAC-1	10	105	89	78	57	27	1	153	19	76	61.5
CRIA-4	80	235	561	442	62	26	15	121	25	47	161.4

**Tabla 14.-** Resultados obtenidos en ratones infectados (grupo control) tratados con AcMo marcados con técnica de IPX. Promedio de valores totales en lectura de diez campos microscópicos a 100 X.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	$\bar{X}$
CD 4	10	11	24	26	21	14	23	16	10	12	16.7
CD 8	9	8	10	13	12	6	11	10	4	5	8.8
MAC-1	17	12	29	71	15	4	27	18	6	16	21.5
CRIA-4	9	10	18	31	21	16	20	21	10	23	17.9

**Tabla 15.-** Resultados obtenidos en ratones tratados con AgLH libre y retados con PSC, marcados con AcMo y con técnica de IPX. Promedio de valores totales en lectura de diez campos microscópicos a 100 X.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	$\bar{X}$
CD 4	8	40	27	7	31	30	33	36	6	57	27.5
CD 8	6	25	19	5	23	27	29	23	5	40	20.2
MAC-1	9	37	28	54	25	145	84	51	27	88	54.8
CRIA-4	5	30	15	15	11	65	41	35	10	31	25.8

**Tabla 16.-** Resultados obtenidos en ratones tratados con AgLH atrapado en liposomas y retados con PSC, marcados con AcMo con técnica de IPX. Promedio de valores totales en lectura de diez campos microscópicos a 100 X.



RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	X
CD 4	11	12	2	6	10	4	6	4	8	2	6.5
CD 8	4	4	2	2	5	1	2	1	2	1	2.4
MAC-1	4	7	10	6	3	4	3	2	6	5	5.0
CRIA-4	5	8	0	0	4	11	4	2	0	0	3.4

**Tabla 17.-** Resultados obtenidos en ratones sanos (grupo control) marcados con AcMo y con técnica de IFI. Promedio de valores totales en lectura de 100 células.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	X
CD 4	34	12	10	11	19	30	12	17	19	14	17.8
CD 8	17	28	17	16	56	24	7	28	13	30	23.6
MAC-1	27	7	19	9	7	6	7	18	14	17	13.1
CRIA-4	8	4	15	15	19	11	4	10	15	15	11.6

**Tabla 18.-** Resultados obtenidos en ratones infectados con PSC (grupo control) marcados con AcMo y con técnica de IFI. Promedio de valores totales en lectura de 100 células.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	X
CD 4	10	11	7	12	6	13	8	10	14	12	10.3
CD 8	3	7	4	6	5	8	7	8	6	7	6.1
MAC-1	3	7	4	4	11	10	8	10	8	7	7.2
CRIA-4	4	10	5	3	9	9	12	13	10	8	8.3

**Tabla 19.-** Resultados obtenidos en ratones tratados con AgLH libre y retados con PSC, marcados con AcMo y con técnica de IFI. Promedio de valores totales en lectura de 100 células.

RATON/ AcMo	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	X
CD 4	8	4	9	3	4	9	10	12	5	10	7.4
CD 8	6	3	11	4	5	7	8	2	3	4	5.3
MAC-1	7	3	12	5	7	6	9	6	3	7	6.5
CRIA-4	8	5	13	6	8	3	10	7	4	8	7.2

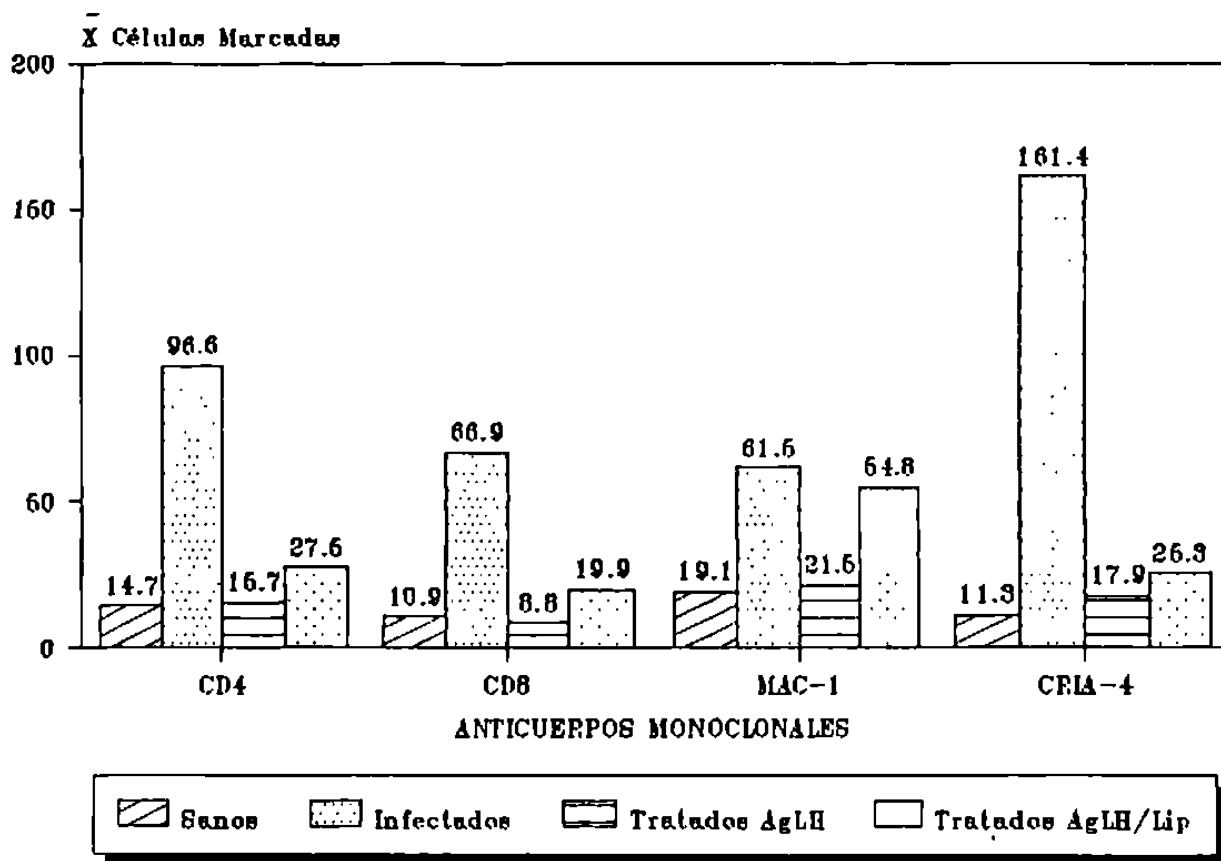
**Tabla 20.-** Resultados obtenidos en ratones tratados con AgLH en liposomas y retados con PSC, marcados AcMo y técnica de IFI. Promedio de valores totales en lectura de 100 células.

Ac Mo	CD4	CD8	Relación Cop/C
Control sano	14.7	10.9	1.35
Control infec.	96.6	66.9	1.44
Tratado Ag	15.7	8.8	1.78
Tratado Ag/Lip	27.5	19.9	1.38

**Tabla 21.-** Relación de medias entre CMN de tejido hepático, cooperadoras (CD4) y citotóxicas-supresoras (CD8).

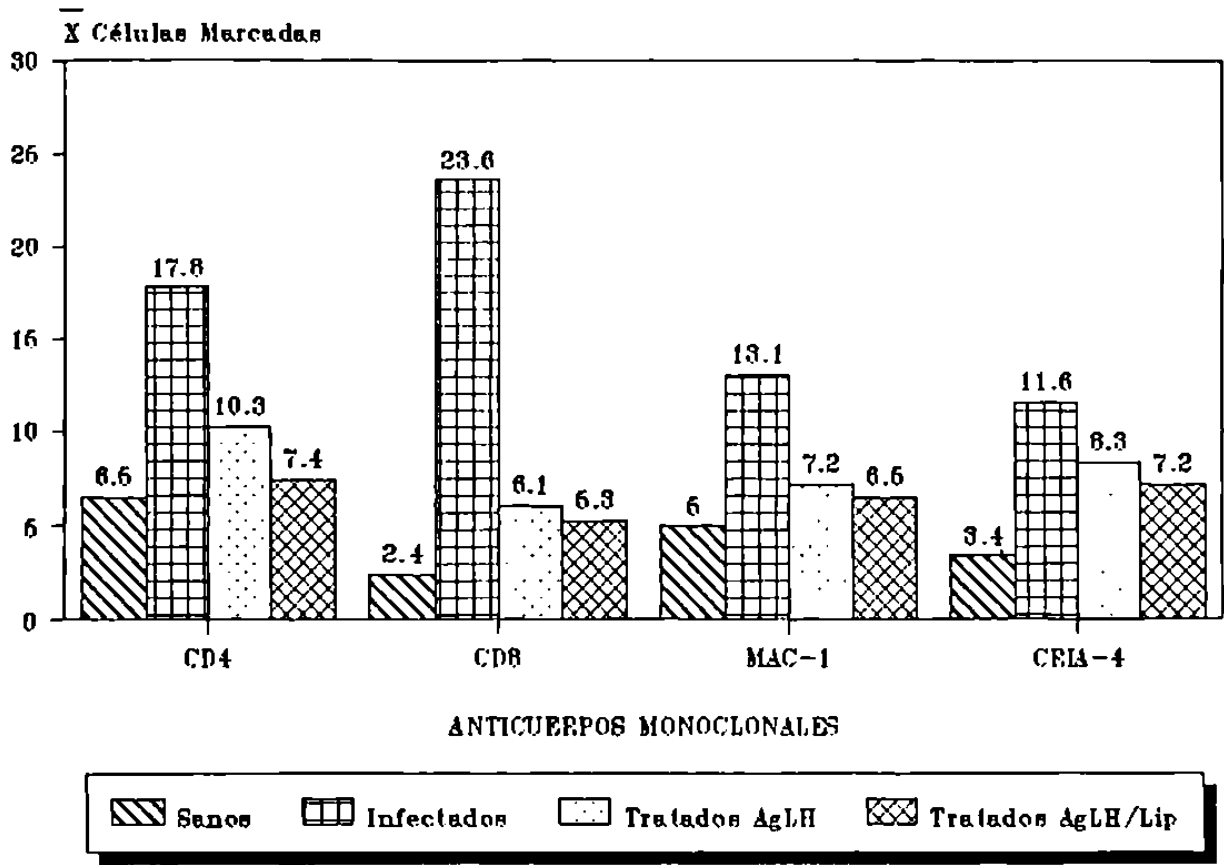
Ac Mo	CD4	CD8	Relación Cop/C
Control sano	6.5	2.4	2.70
Control infec.	17.8	23.6	0.75
Tratado AgLH	10.3	6.1	1.68
Tratado AgLH/Lip	7.4	5.3	1.39

**Tabla 22.-** Relación de medias entre CMN de sangre periférica Tcooperadoras (CD4) Y Tcitotóxicas-supresoras (CD8)



Ac Monoclonales Tec de IPX  
Tejido Hepático

GRÁFICA 1.- Muestra la comparación de células de tejido hepático, marcadas con AcMo e IPX, entre los grupos de ratones.

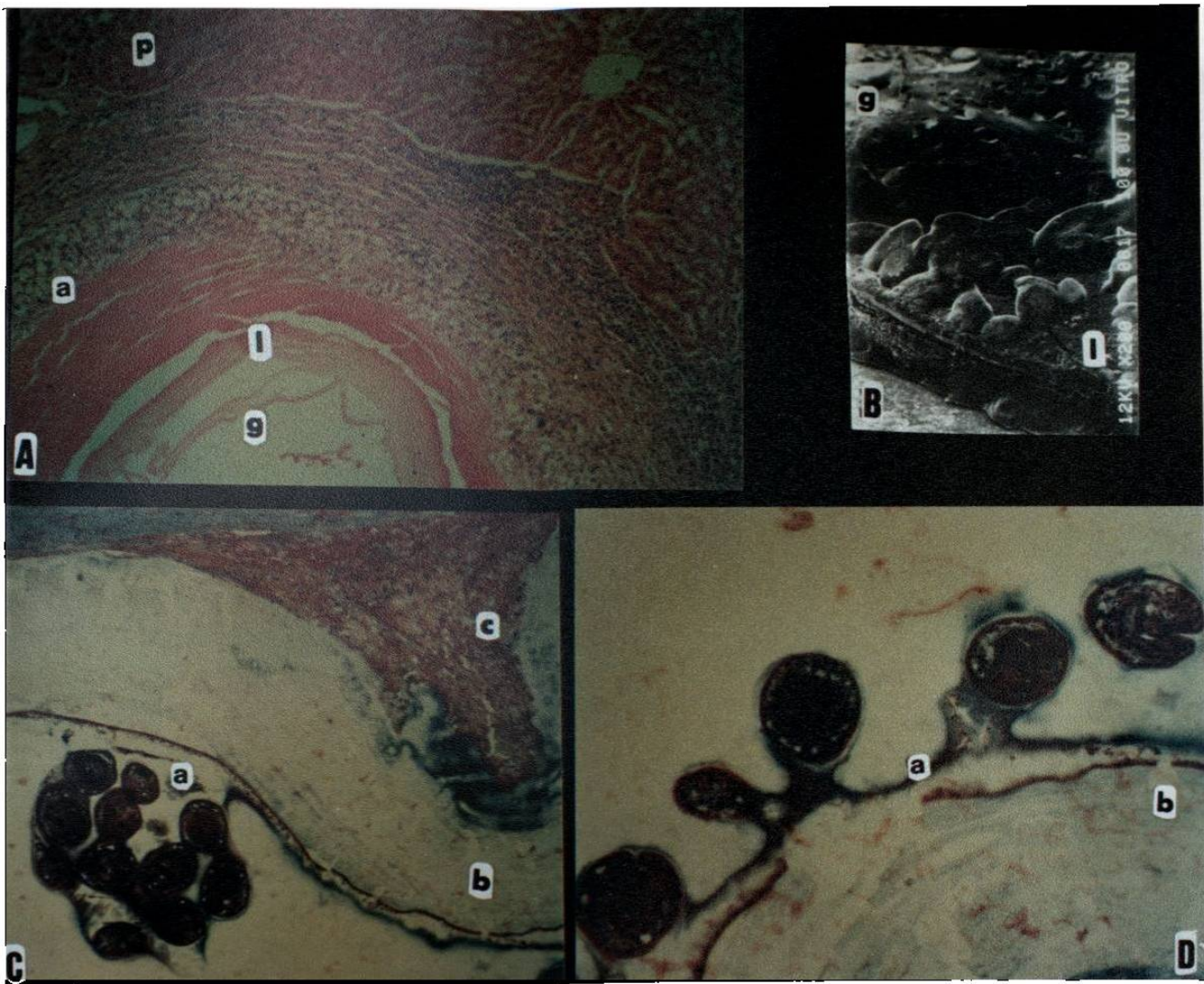


Ac Monoclonales Tec de IFI  
Sangre Periférica

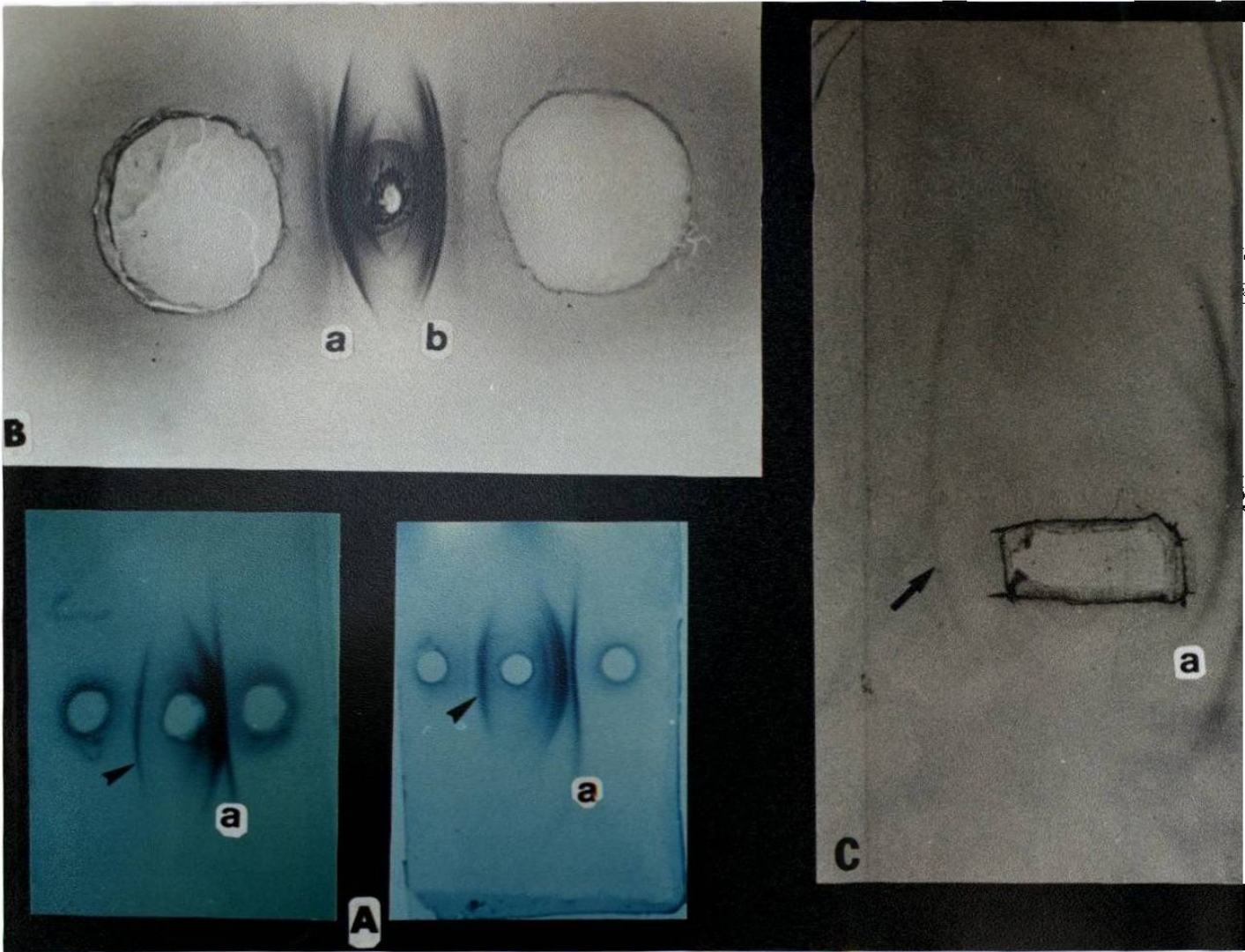
**GRÁFICA 2.- Muestra la comparación de células MNC, marcadas con AcMo e IFI, entre los grupos de ratones.**



**Fig. 1.- *Echinococcus granulosus*: Quistes hidatídicos en hígado de cerdo. A) Cara superior. B) Cara inferior, C) Protoescólices en los que se observan sus características; corona de ganchos, ventosas y corpúsculos calcáreos (microscopía de luz). D) Protoescólex con su pedúnculo. Microscopía electrónica de barrido (600 X).**

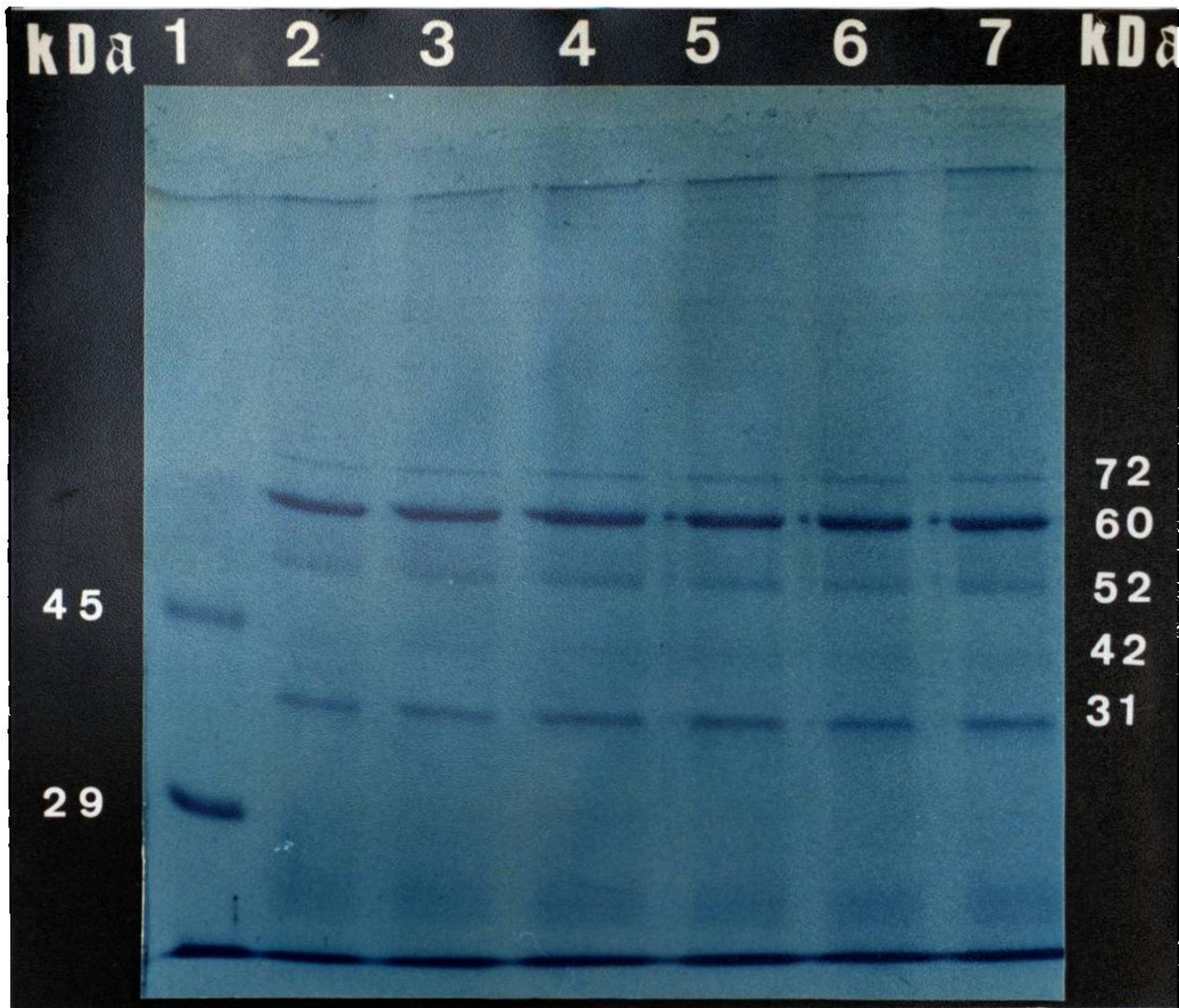


**Fig 2.-** Quiste hidatídico: A) Corte histológico en el que se observa la disposición de las membranas en una hidátide. p) Parénquima hepático. a) Membrana adventicia o fibrosa. l) Capa laminar. g) capa germinativa. B) Microscopía electrónica de barrido que muestra l) capa laminar. g) capa germinativa en su cara externa. C) Corte histológico teñido con tricrómico de Masson. a) Vesículas con protoescolices pedunculada a la capa germinativa. B) Capa laminar. c) Membrana adventicia. D) Corte histológico teñido con tricrómico de Masson. a) capa germinativa que muestra protoescolix unidos a esta en distintos grados de desarrollo. b) capa laminar.

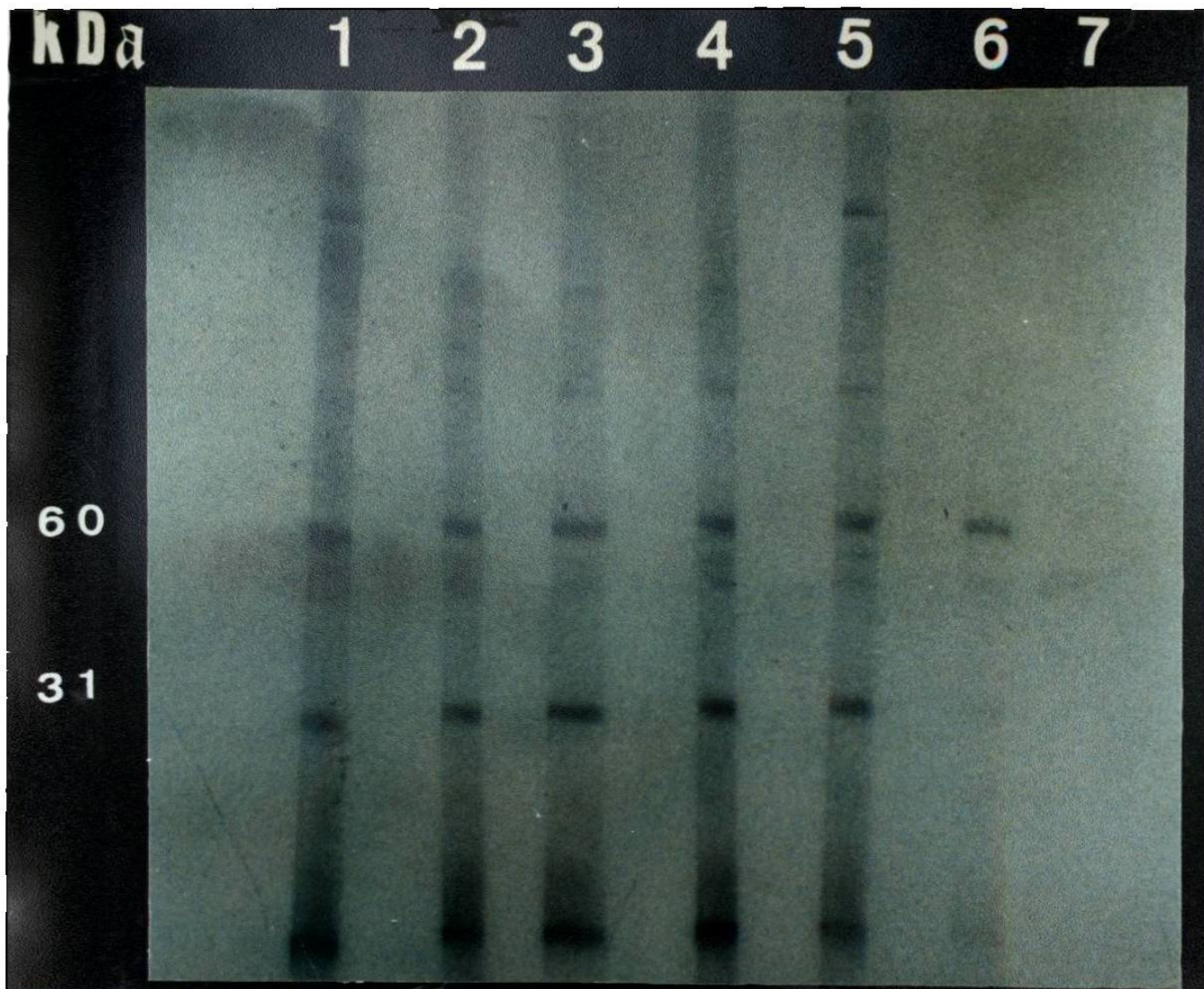


**Fig 3.- A) Inmuno doble difusión (IDD) la flecha muestra el precipitado , de antígeno con suero de ratón hidatidoso. a) Suero de referencia. B) Doble difusión 5 (DD5). a) Muestra la reacción con el suero de refencia y b) Problema. C) Inmuno electrolisis (IEF). Se observa el arco 5 de Capron en los sueros testigo (flecha) y problema a).**

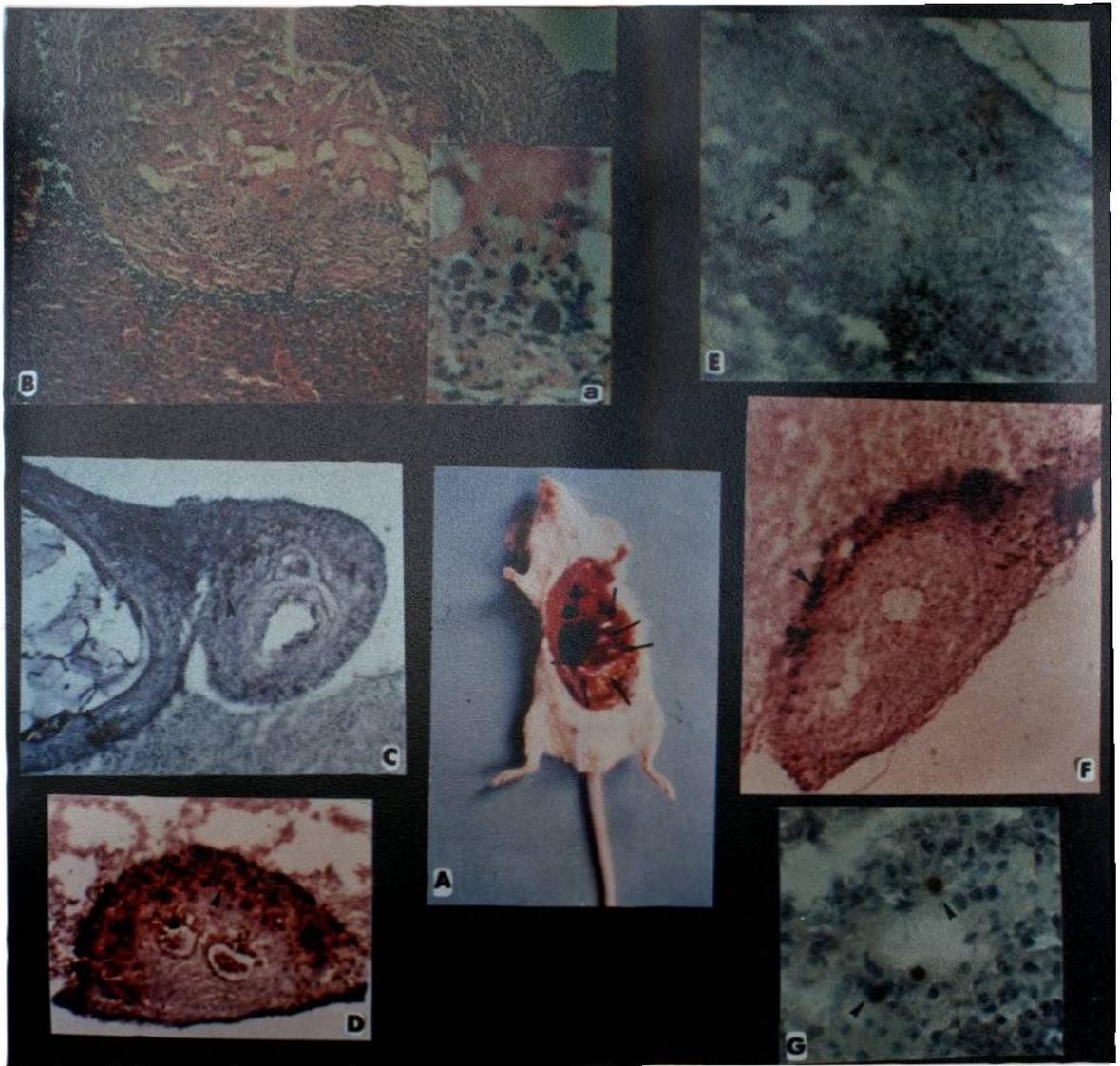




**Fig 4.- SDS-PAGE de AgLH: Se observa el mismo patrón electroforético en cada lote de antígeno. El carril 1 muestra los estándares de peso molecular de 45 kDa y 29 kDa. Los carriles 2 al 7 muestran corrimiento de seis lotes de AgLH de origen porcino.**



**Fig 5.- *Western Blot* : Del carril 1 al 6 muestran sueros positivos, estos presentan una fuerte reacción en las bandas de 60 y 31 kDa. El carril 7 muestra corrimiento del suero control negativo.**



**Fig 6.- A) Quistes hidatídicos en hígado de ratón (flechas). B) Corte histológico de hígado de ratón con un quiste hidatídico mostrando sus diferentes componentes: en la membrana adventicia se aprecia una fuerte reacción inflamatoria con abundantes CMN (flecha), a) detalle de protoescólices en la luz del quiste. C,D,E, y F) Muestran quistes hidatídicos en hígado de ratón, con CMN marcadas con AcMo y peroxidasa. G) CMN en en tejido hepático marcadas con AcMo y peroxidasa.**

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Abid-A, A-Khayati and N-Zargouni. 1991. Hydatid cyst of the heart and pericardium. *Int J Cardiol.* **32** (1): 108-109.
- 2.-Abo-Shehada-MN. 1993. Some observations con hydatidosis in Jordan. *J Helminthology.* **167** (3): 248-252.
- 3.-Alcocer G. J. M., Rodríguez P. C. y Taméz G. R. Técnica para la elaboración de liposomas según condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- 4.-Allan D., Jenkins P., Connor R.J., and Dixon J.B. 1981. A study of immunoregulation of BALB/c mice by *Echinococcus granulosus* equinus during prolonged infection. *Parasit Immunol.* **3**: 137- 142.
- 5.-Allison A.C. and Gregoriadis G. 1974. Liposomes as immunological adyuvants. *Nature.* **252**: 252.
- 6.-Annen J.M., Köller P. and Eckert J. 1981. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* Cyst Fluid in Vitro. *Z Parasitenkd.* **65**: 79-88.
- 7.-Arru E., Mantovani A. and Vicari G. 1984. Echinococcosis-hidatidosis and taeniasis-cysticercosis in Italy. In: Agriculture. Some important parasitic infections in bovines considered from economic and social (zoonosis) points of view. Parasitological symposium, Lyons, 24 -26 October 1983. (Edited by Euzeby, J. ; Gevrey J.) Luxembourg, France; Commission of the European Communities: 215-233.
- 8.-Backer J., Wounbenberg J. S. and Roendink F. H. 1986. Antimicrobial chemotherapy directed by liposmes. *J. Antimicrobiol Chemotherapy.* **17**: 547.

- 9.-Baldock F. C., Thompson R.C.A. and Kumaratilake L. M. 1985. Strain identification of *Echinococcus granulosus* in determining origin of infection in a case of human hydatid disease in Australia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* **79**: 238-241.
- 10.-Bangham A. D. 1978. The properties and uses of lipid vesicles: and overview. *Ann. New York Acad Sci.* **308**: 2-7.
- 11.-Bout D., Fruit J. and Capron A. 1974. Purification d' un antigène de liquide hydatique. *Ann Immunol.* **125**: 775-788.
- 12.-Bresson-Hadni S., Vuitton D.A., Lenys D. Liance M., Racadot E. and Miguet J.P. 1989. Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. I. Lymphocyte reactivity to *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin exp immunol.* **78**; 61-66.
- 13.-Capron A., Biguet J., Vernes A., and Afchain D. 1968. Estructure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Pathol Biol.* **16**: 121-138.
- 14.-Capron A., Vernes A. and Biguet J. 1967. Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. *Les Journées Lyonnaises d'Hydatidologie.* (SIMEP Ed.) Lyon 27-40.
- 15.-Cesbron J. Y., Capron M. et Capron A. 1986. Foie et voies biliaires. Le diagnostic immunologique de l'hydatidose humaine. *Gastroenterol Clin Biol.* **10**: 415-418.
- 16.-Cheng C. Thomas. 1978. Cestoda las verdaderas tenias. *Echinococcus granulosus*. In *Parasitologia General.* (Ed. A., C. Madrid, España). **14**: 474-542.
- 17.-Clarkson M. J. 1978. Hydatid disease in Wales: 2. Erradication. *Vet Rec.* **102** (12): 259-261.

- 18.-Coltorti E.A. and Varela Diaz V. M. 1975. Modification of the immunoelectrophoresis test for the Immunodiagnosis of Hidatidosis. *J Parasitol.* **61** (1): 155-157.
- 19.-Coltorti E.A. and Varela-Diaz. 1978. Detection of antibodies gainst *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* **72** (3): 226-229.
- 20.-Cox D., A. Dixon J., B. & Marschall-Clarke S. 1986. Transformation induced by *Echinococcus granulosus* protoescoleces in unprimed murine spleen cells: identity and MHC restriction of participating cell types. *Immunology.* **57**: 461-466.
- 21.-Cox D. A., Marshall-Clarke, and Dixon J.B. 1989. Activation of normal murine B cell by *Echinococcus granulosus*. *Immunology.* **67**: 16-20.
- 22.-De Haro A. I., Salazar S. P. M., Cabrera B. M. 1995. Helmintos generalidades. Céstodos. En: Méndez Editores, S. A. de C. V. Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis. Segunda edición. México D., F.
- 23.-Dempster R. P., Berridge M. V., Harrison G. B. L. and Heath D. D. 1991. *Echinococcus granulosus*: Development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *Int J Parasitol.* **21** (5): 549-554.
- 24.-Desiderio J. V. and Campbell S. G. 1985. Immunization Against experimental Murine Salmonellosis with Liposome-Associated O-Antigen. *Infect Imm.* **48** (3): 658-663.
- 25.-Eckert J., Thompson R.C.A., Lymbery A. J., Pawlowski Z. S. Gottstein B. and Morgan U.M. 1993. Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res.* **79**: 42-48.
- 26.-Eckert J., Thompson R.C.A., Michael S.A., Kumaratilake L.M. and El-Sawah H. M. 1989. *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dogs and parasite morphology. *Parasitol Res.* **75**: 536.

- 27.-Farmer M P, Chatterley S, Spier N. 1990. Echinococcal Cyst of the Liver: Diagnosis and Surgical Management. *Ann clin lab scien.* **20** (6): 385-391.
- 28.-Faust E. C., Russell P. F. and Jung R. C. 1975. Céstodos ciclofilídeos del hombre. *Echinococcus granulosus*. In Craig y Faust Parasitología Clínica. (Ed. Salvat Barcelona, España). **31**: 520-558.
- 29.-Frydman Ch P, Raissi S and Watson C W. 1989. An Unusual Pulmonary and Renal Presentation of Echinococcosis. *Acta Cyt.* **33** (5):655-658.
- 30.-Ganguly N. K., Mahajan R. C., Wangoo A., Bose S. M and Dilawari J. B. 1986. Potential experimental model of unilocular hydatid disease. *Indian J Med Res.* **84**: 210-212.
- 31.-Gregoriadis G. 1985. Liposomes for drugs and vaccines. *Trends biotechnol.* **3** (9): 235.
- 32.-Grove David I. 1990. *Echinococcus granulosus* and Echinococcosis and Hidatyd disease. In A History of Human Helminthology. (Ed. C.A.B. International. U K.). **12**: 319-351.
- 33.-Hobbs R. P., Lymbery A. J. L. and R C A Thompson R.C.A. 1990. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian host, and its implications for strain recognition. *Parasitology.* **101**: 273-281.
- 34.-Huang, A. L.Huang, L. and Kennel, S. J. 1980. Monoclonal antibody covalently coupled with fatty acid, a reagent for in vitro liposome targeting. *J Biol Chem.* **2**: 125-131.
- 35.-Hurd H. 1989. *Echinococcus granulosus*: a comparison of free amino acid concentration in hydatid fluid from primary and secondary cyst and host plasma. *Parasitology.* **98**: 135-143.

- 36.-Jenkins P., Dixon J.B., Ross G. and Cox D. A. 1986. *Echinococcus granulosus*: Changes in the transformational behaviour of murine lymph node cells during early infection. *Ann Trop Med Parasitol.* **80** (1): 43-47.
- 37.-Kagan I. G. and Agosin M. 1968. *Echinococcus* antigens. *Bull Wld Helth Org.* **39**: 13-24.
- 38.-Kahl L. P. 1990. Characterization of *Leishmania major* Antigen-liposomes that protect BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect Imm.* **58** (10): 3233-3241.
- 39.-Kaye S. B. 1981. Liposome-problems and promise as selective drug carriers. *Cancer Treat Rev.* **8**: 27.
- 40.- Kizaki T., Kobayashi S., Ogasawara K., Day N. K., Good R. A. and Onoé K. 1991. Immune suppression induced by protoscoleces of *Echinococcus multilocularis* in mice. Evidence for the presence of CD8<sup>dull</sup> suppressor cells inspleens of mice intraperitoneally infected with E. multilocularis. *J Immunol.* **147** (1); 1659-1666.
- 41.-Kumaratilake L. M. and Thompson R.C.A. 1982 .Hidatidosis/echinococcosis in Australia. *Helminthology Abstracts, Series A.* **51**(6): 233-252.
- 42.-Kumaratilake L. M. and Thompson R. C. A. 1984. Morphological Characterisation of Australian Strains of *Echinococcus granulosus*. *Int J Parasitol.* **14** (5): 467-477.
- 43.-Kumaratilake L M, R C A Thompson and J Eckert. 1986. *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *International J Parasitology.* **16** (5): 529-540.
- 44.-Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.



- 45.-Laroche L. & Bach J.F. 1981. T-cell imbalance in nonleukemic and leukemic cutaneous lymphoma defined by monoclonal antibodies Clin Immunol Immunopathol. **20**: 278.
- 46.-Leserman, L. D. Barbet, J. Kourilsky F. 1982. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. Nature, **288**: 602.
- 47.- Lewis A. E. 1979. Bioestadística. Compañía Editorial Continental. pp 70-72.
- 48.-Lightowers M. W., Rickard M.D. and Honey R. D. 1986. Serum antibody response following parenteral immunization with hydatidic cyst fluid in sheep infected whit *Echinococcus granulosus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35** (4): 818-823.
- 49.-Lucius, R. Frosch, M. and Kern, P. 1995. Alveolar Echinococcosis: Immunogenetics and Epidemiology. Parasitology. **11** (1): 4.
- 50.-Maierhofer G. 1985. Liposomes: Preparation and application. American Laboratory: 129-135.
- 51.-Majul E J. 1991. Primary hydatid cyst of the maxillary gland: Case report. Prensa Médica Argentina. **78** (2): 51-53.
- 52.-McManus D. P., Thompson R.C.A. and Lymbery A. J. 1989. Comment on the Status of *Echinococcus granulosus* in the U K. Parasitol Today **5** (11): 365-367.
- 53.-Ming-gian X. 1985. Hydatid disease of the lung. Amer J Surg. **150**: 568-573.
- 54.-Mondragón-de la Peña M. C. y Tavizón G. J. P. 1991. Panorama de la Enfermedad Hidatídica. Rev Méd ISSSTE-ZAC. **2** (1): 7-9.
- 55.-Mondragón de la P., C. Tavizón G., J., P. Taméz G., R. Herrera E., R. Rodriguez P., C. 1993. *Echinococcus granulosus*: Modulación de la respuesta inmune celular local y periférica en hidatidosis experimental. Invest Cient **1**(4): 3-8.

- 56.- Neghme A. and Silva R. 1970. A hidatidose como problema médico, sanitário e social e esboço básico para sua profilaxia. *Revista da Associação Medica Brasileira*. **16** (8): 279-286.
- 57.-Oriol R., Williams J.F., Perez Esandi M. V. and Oriol C. 1971. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hidatid fluid. *Am J Trop Med Hyg.* **20** (4): 569-574.
- 58.-Pawlowski L D Yap K W and Thompson R C A. 1988. Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid cestodes. *Parasitol Res.***74**: 293-296.
- 59.-Pozzuoli R., Musiani P., Arru E., Patrono C. and Piantelli M. 1974. *Echinococcus granulosus*: Evaluation of Purified Antigens Immunoreactivity. *Exp Parasitol.* **35**: 52-60.
- 60.-Richards K. S., Arme C. and Bridges J., F. 1983. *Echinococcus granulosus equinus*: An ultrastructural study of the laminated layer including changes on incubating cysts in various media. *Parasitology.* **86**: 399-405.
- 61.-Rickard M., D. and Lightowers M. W. 1986. *Inmunodiagnosis of Hidatid Disease* (Thompson R.C.A. ed.), pp 217-240, George Allen and Unwin London.
- 62.-Riley, E. M., and Dixon J. B. 1987. Experimental *Echinococcus granulosus* infection in mice: immunocytochemical analysis of lymphocyte populations in local lymphoid infections during early infection. *Parasitology*, **94**: 523.
- 63.-Riley F. M., Dixon J. B., Kelly D. F. and Cox D. A. 1984. Immune response to *Echinococcus granulosus*: histological and immunocytochemical observations. *Ann Trop Med Parasit*, **78** (3): 210-212.
- 64.-Riley E. M., Dixon J. B., Kelly D. F. and Cox D. A. 1985. The immune response to *Echinococcus granulosus*: Secuential histological observations of limphoreticular and conective tissues during early murine infection. *J Comp Path.* **95**: 93-104.

- 65.-Rouse B. T. 1982. Liposomes as carriers of antigens as well as other molecules involved in immunity. *JAVMA*, Vol. **181**: 988-991.
- 66.-Russell D. G. and Alexander J. 1988. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol.* **140**: 1274-1279.
- 67.-Sanchez Y., Ionescu Matiu I., Dreesman G.R., Kramp W., Six H. R. Hollinger F.B. and Melnick J.L. 1980. Humoral and Cellular Immunity to Hepatitis B Virus-Derived Antigens: Comparative Activity of Freund Complete Adjuvant Alum, and Liposomes. *Infect Immunol.* **30**: 728-733.
- 68.-Sato Y., Mukai K., Watanabe S., Goto M. and Shimosato Y. 1986. The AMeX Method. A Simplified Technique of Tissue Processing and Paraffine Embedding with Improved Preservation of Antigens for Immunostaining. *AJP* **125** (1): 431-435.
- 69.-Sedmak J. J. and Grossberg S. E. 1977. A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Ann Biochem.* **79**:544-552.
- 70.-Shek P.N. & Sabiston B. H. 1981. Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. 1. Potentiation of the plaque-forming cell response. *Immunology* **45**: 349-356.
- 71.-Shek P.N. & Sabiston B. H. 1982. Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. II Comparison of the effectiveness of vesicle-entrapped and surface-associated antigen in immunopotential. *Immunology* **47**: 627- 632.
- 72.-Sherif S D, Dar F K, and Kidwai S A. 1984. Metallic elements in hydatid fluid. *J Helminthol.* **58**: 335-336.
- 73.-Sierra J, Oviedo J, Berthier M and Leiguarda R. 1985. Growth rate of secondary hydatid cyst of the brain. *J Neurosurg.* **62**: 781-782.

- 74.-Smyth J. D. 1970. The Biology of the Hydatid Organisms. In *Advances in Parasitology*. (Ed. Ben Dawes. Academic Press: London & New York). **2**: 327-346
- 75.-Statistical Graphics Corporation, EXE\*U\*STAT Inc., Lauer Software: Statistical Graphics System, version 2.0. 1985, 1986.
- 76.-Swenson C. E., Popesca M. C., and Ginsenberg R. S. 1988. Preparation and use of liposomes in the treatment of microbiology infection. *CRC Rev Microbiol Suppl.* **1**: 51.
- 77.-Tavizón GJP, Rivas R M, Mondragón de la P M C, Martínez C F y Osegueda B C. 1981. Estudio Morfológico, Bacteriológico e Histológico de la Hidatidosis Hepática Porcina en Cerdos Sacrificados en el Rastro Municipal de Zacatecas Zac. II Convención y Exposición Nacional de Salud Animal. X Reunión Anual de Sanidad Animal. México, D.F.
- 78.-Tay Z J, Lara A R, Velazco C O y Gutiérrez Q M. 1985. Cisticercosis e Hidatidosis. In *Parasitología Médica*. (Ed. Francisco Méndez Cervantes, México). **XV**: 215-234.
- 79.-Thompson R. C. A, Allsopp C. E. 1988. *HYDATIDOSIS: Veterinary perspectives and annotated bibliography*. C.B.A International Walingford, Oxon OX10 8DE UK.
- 80.-Thompson R C A. and L M Kumaratilake. 1985. Comparative development of Australian strains of *Echinococcus granulosus* in dingoes (*Canis familiaris dingo*) and domestic dogs (*C. f. familiaris*), with further evidence for the origin of the Australian Sylvatic strain. *Int J Parasitol.* **15** (5): 535-542.
- 81.-Thompson R.C.A. and Lymbery A. J. 1988. The Nature, Extent and Significance of Variation Within the Genus *Echinococcus*. In *Advances in Parasitology*. ( Backer J R, and Muller R. Eds. ). **27**: 209-258. Academic, London.

- 82.-Thompson R.C.A., Nicholas W.L., Howell M.J. and Kumaratilake L.M. *Echinococcus granulosus* in a fox. *Aust Vet J.* **62**: 200-201.
- 83.-Towbin H. T., Stahelin T. and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**: 4350-4354.
- 84.-Van Rooijen N., and Van Nieuwmegen R. 1980. Liposomes in Immunology: Evidence That Their Adjuvants Effect Results from Surface Exposition of the Antigens. *Cell Immunol.* **49**: 402-407.
- 85.-Varela Díaz V. M. y Coltorti A. 1974. Técnicas para el Diagnóstico Inmunológico de la Hidatidosis Humana. Centro Panamericano de Zoonosis
- 86.-Vassalos M., Himonas C. and Saravanos A. 1984. Hydatidosis in Greece. In: Agriculture. Some important parasitic infections in bovines considered from economic and social (zoonosis) points of view. Parasitological Symposium, Lyons, 24-26 October 1983. (Edited by Euzeby, J. ; Gevrey J.) Luxembourg, France; Commission of the European Communities: 205-213.
- 87.-Vuitton D.A., Bresson-Hadni S., L., Kaiserlian D., Guerret-hocker S., Bresson J.L. and Guillet M. 1989. Celular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulation in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol.* **78**: 67-74.
- 88.-Waine, G. J. and McManus. 1995. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitol Today*, **11** (3): 113.
- 89.-Weinstein J. N. 1984. Liposomes and drugs carriers in cancer therapy. *Cancer Treat Report.* **68** (1): 127.

