

37
Des.
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

AVANCES EN EL DESARROLLO DE CULTIVOS
CELULARES A PARTIR DE CISTICERCOS DE

Taenia crassiceps

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CARMEN LETICIA CRUZ REVILLA



MEXICO, D. F.



1995

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Carmen Leticia Cruz Revilla

con número de cuenta 9052234-5 con el Título: _____

"Avances en el desarrollo de cultivos celulares a partir

del cisticerco de Taenia crassiceps"

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dra	Edda Lydia	Sciutto Conde	
Director de Tesis	Gabriela	Rosas Salgado	
QFB.	Fernando	Ramos Reyes	
Biol.	Carlos Albeto	Castillo Pompeyo	
Suplente	Jesús Manuel	León Cazares	
Suplente			

**"Any sufficiently advanced technology is indistinguishable
from magic"**

Arthur C. Clarke

A mis papás, a Manolete, Magos, Lupe y Ximena, por todo su amor.

*"El problema no es si te buscas o no más problemas
el problema no es ser capaz de volver a empezar
el problema no es vivir demostrando...
el problema no es darle un hacha al dolor
y hacer leña con todo y la palma,
el problema vital es el alma
el problema es de resurrección
el problema señor, será siempre sembrar amor"*

Silvio Rodriguez

A Luis, por ser mi mejor amigo y compañero.

*"..Y yo te hablaba y tú bebías cada palabra mía como si cada una de ellas
constituyera algo vital para tu organismo. Te hablaba, digo, y yo advertía
de que forma mi palabra germinaba en tí, fecunda y amada"*

Francisco Taria

A Edda, por toda su confianza, apoyo, entusiasmo y guía tan cercana y valiosa.

"Yo vivo de preguntar, saber no puede ser lujo"

Silvio Rodriguez

A Gina, Cris y Gioco por su invaluable amistad.

*"Amigo, no es posible ni nacer ni morir
sino con otro. Es bueno
que la amistad le quite
al trabajo esa cara de castigo
y a la alegría ese aire ilícito de robo"*

Rosario Castellanos

A todos los del laboratorio, por compartir el trabajo y la amistad conmigo: Gonzalo, Gaby, Gladis, Mary, Gemma, Karen, Tere, Fernando, Manuel y especialmente a Meche por todo su cariño, apoyo y enseñanzas.

A Andrea, por ser, afortunadamente, mi amiga y compañera de banca y compartir la experiencia de nuestros pininos científicos (en las buenas y en las malas).

A Carlitos Castillo, por su amistad y su gran idea de mi ubicación para comenzar (y ahora seguir) mi carrera científica.

A Bran (el cuervo), Corum, Kokorhercus y la niña Tremere:

"But the only way of discovering the limits of the possible is to venture a little way past them in to the impossible"

Arthur C. Clarke

Al Gus, por hacer más alegre y fuera de lo común la estancia en el Instituto.

" Cuando un pueblo en que se ha nacido no está al nivel de la época en que vive, es preciso ser a la vez el hombre de su época y el de su pueblo, pero hay que ser ante todo el hombre de su pueblo "

José Martí, 1877

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM, CON LA ASESORIA DE LA DRA. EDDA SCIUTTO CONDE.

Agradezco muy especialmente a:

A la Q.F.B. Mercedes Baca.

A la Biol. exp. Marisela Hernández.

A la Dra. Gladis Fragoso Gonzales.

Al M. en C. Alejandro Padilla.

A Marie Therese Merchant.

Al Dr. Andres Castell Rodriguez.

Por todo el apoyo técnico y académico prestado para la elaboración de este trabajo de tesis.

A Andrea Toledo-Rojas por su muy importante colaboración en la realización de este trabajo de tesis.

INDICE

	PAGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. OBJETIVOS	14
IV. MATERIALES Y METODOS	15
a. Obtención de células parasitarias a partir del cisticerco de <i>Toenia crassiceps</i> .	
a.1 Obtención de los cisticercos.	15
a.2 Obtención y cultivo <i>in vitro</i> de células del cisticerco.	16
a.3 Condiciones experimentales evaluadas en cultivos celulares <i>in vitro</i> .	17
a.4 Cultivos <i>in vivo</i> de células de cisticerco y evaluación de su capacidad de crecimiento en ratones susceptibles (BALB/cAnN).	18
a.5 Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN.	19
a.6 Cinética de formación de cisticercos a partir de células del cisticerco en cepas de ratones susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (C57BL/6J) a la parasitosis por <i>T. crassiceps</i> .	20
b. Preparación de la sonda c-myc de ratón.	
b.1 Obtención del plásmido.	21
b.2 Cuantificación de la concentración del plásmido pGEM2 con el gen c-myc.	21
b.3 Digestión del plásmido pGEM2 con el gen c-myc.	22
b.4 Electroforesis en gel de agarosa.	23
b.5 Extracción del ADN de 500 pb de la agarosa.	23
b.6 Extracción del ADN de los metacéstodos de <i>T. crassiceps</i> , variedad HYG y ORF.	25

b.7 Purificación del ADN de los metacéstodos de <i>T. crassiceps</i> , variedad HYG y ORF.	26
b.8 Extracción y purificación del ADN de ratón de la cepa BALB/cAnN.	26
b.9 Digestión del ADN de <i>T. crassiceps</i> variedad HYG y ORF y ratón BALB/cAnN.	27
b.10 Transferencia de ADN genómico de <i>T. crassiceps</i> variedad HYG y ORF y ratón BALB/cAnN.	28
V. RESULTADOS	30
a.1 Obtención de células parasitarias a partir del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> y evaluación de la capacidad de crecimiento de las células <i>in vitro</i> .	30
a.2 Cultivo <i>in vivo</i> de células del cisticerco y evaluación de su capacidad de crecimiento en ratones BALB/cAnN.	32
a.3 Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN.	33
a.4 Cinética de formación de cisticercos a partir de células de cisticercos en ratones de cepas susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (C57BL/6J).	35
b. Hibridación de ADN de ratones BALB/cAnN y del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> , variedad HYG y ORF.	37
VI. DISCUSION	38
VII. CONCLUSIONES	49
VIII. APENDICE I: Cultivos celulares.	51
IX. APENDICE II: Oncogen c-myc.	62
X. REFERENCIAS	74

I. RESUMEN

En el presente trabajo se establecen las condiciones para desarrollar cultivos primarios de células del cisticerco de *Taenia crassiceps* tanto *in vitro* como *in vivo*. Es la primera documentación de que los cisticercos pueden disgregarse hasta células viables en cultivos de 15 días de duración y señala algunos factores que podrían favorecer su crecimiento, reproducción y/o agregación *in vitro*. Se documenta además que a partir de células parasitarias inyectadas en la cavidad peritoneal de ratones susceptibles, se pueden formar cisticercos completos. Esto señala la posibilidad de una forma alternativa de reproducción asexual del parásito y permite proponer un nuevo modelo experimental para el estudio de la cisticercosis. Por otro lado, se reportan en esta tesis evidencias que sugieren la presencia del oncogen c-myc en el genoma del parásito, lo que ofrece la posibilidad de modificarlo genéticamente con el fin de producir immortalización de las células parasitarias y la posibilidad de aumentar el conocimiento de la biología del cisticerco.

Entidad	Población muestral	Seropositivos ^a	
		Población	Porcentaje
Baja California Sur	1 739	1	0.06
Sonora	2 251	5	0.22
Baja California	1 605	5	0.31
Tabasco	2 958	10	0.34
San Luis Potosí	2 125	10	0.47
Tlaxcala	1 434	7	0.49
Nuevo León	3 174	16	0.50
Tamaulipas	1 937	10	0.52
Veracruz	2 257	12	0.53
Coahuila	1 997	12	0.60
Oaxaca	1 709	12	0.70
Sinaloa	2 292	17	0.74
Chihuahua	2 194	17	0.77
Querétaro	1 642	13	0.79
Campeche	1 541	13	0.84
Morcles	1 254	13	1.04
Chiapas	1 912	20	1.05
Hidalgo	2 042	23	1.13
Estado de México	2 837	34	1.20
Yucatán	1 775	23	1.30
Colima	1 703	23	1.35
Puebla	2 814	38	1.35
Michoacán	2 036	29	1.42
Quintana Roo	1 515	22	1.45
Aguascalientes	1 518	24	1.58
Durango	1 963	31	1.58
Nayarit	1 474	30	2.04
Jalisco	3 563	75	2.10
Guanajuato	2 970	66	2.22
Zacatecas	2 162	58	2.73
Distrito Federal	2 644	78	2.95
Guerrero	1 717	51	2.97
Total	66 754	799	1.20

^a Títulos por HAI $\geq 1:80$

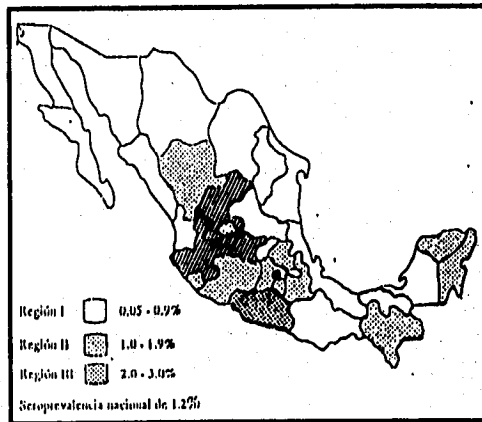


Figura 1. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Taenia solium* por entidad federativa en la población de 1 a 98 años. Tomado de Larralde, *et al*, 1992.

II. INTRODUCCION

La cisticercosis es una parasitosis frecuente en países en desarrollo, donde prevalecen condiciones inadecuadas de vivienda e higiene, fecalismo al aire libre y otras condiciones ambientales que favorecen la transmisión (Gemmel, *et al*, 1982). Las zonas más afectadas por este parásito se encuentran en Africa, Asia y Latinoamérica y de esta última México y Brasil son las zonas de mayor incidencia (Bird, *et al*, 1962; Gajdusek, 1978; Coker-Vann, *et al*, 1981; Balasubramaniam, *et al*, 1971). En México es un padecimiento frecuente. Las zonas de mayor seroprevalencia son las regiones centro occidental y sureste (Fig 1). Como se observa en la figura 1 los porcentajes de seropositividad oscilan entre el 0.06 % en Baja California y 2.97 % en Guerrero. En promedio estos resultados obtenidos en la encuesta serológica realizada entre 1987 y 1988, indican que el 1.20 % de la población mexicana ha estado en contacto con este parásito.

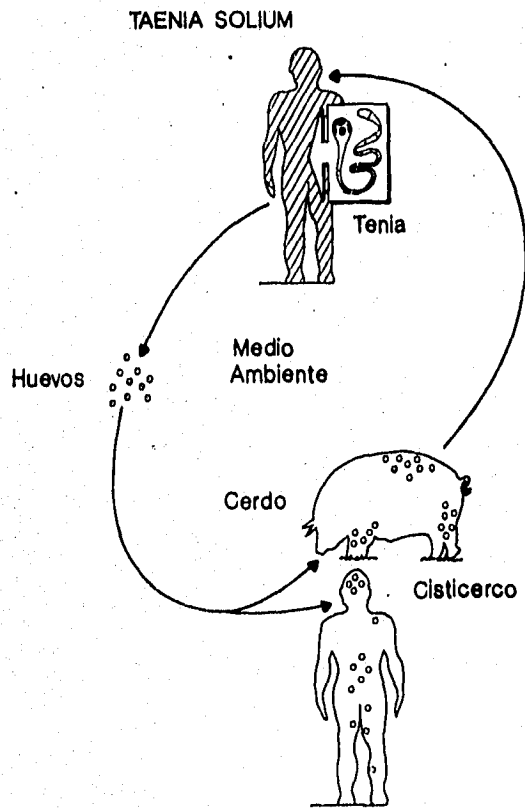


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

La cisticercosis es una enfermedad causada por el establecimiento de las formas larvianas de *Taenia solium* en el tejido de sus huéspedes, el cerdo y el hombre.

T. solium es un helminto hermafrodita, de cuerpo aplanado y alargado cuya reproducción sexual se lleva a cabo en el hombre (huésped definitivo) y su estadio larvario, el cisticerco, se aloja en músculo y cerebro principalmente, tanto del hombre como del cerdo (Fig 2). La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevecillos de *T. solium* excretados en las heces de los portadores del parásito adulto, que después eclosionan en el intestino. Los huevecillos son la única fase de vida que se puede encontrar (aunque no se desarrolla) en el medio ambiente, por lo que tiene una serie de envolturas protectoras. La envoltura más externa es la denominada vitelo o cápsula. La siguiente envoltura es el embrióforo (que consiste en una serie de tabiques proteicos llamados bloques embriofóricos, unidos mediante una proteína cementante) que se origina de una envoltura celular más profunda llamadas células embrioforales, las cuales se encuentran delimitadas por su propia membrana plasmática y hacia adentro por la membrana oncosferal que envuelve directamente al embrión hexacanto (que posee tres pares de ganchos), llamado también oncosfera. El ciclo de vida continúa cuando los huevecillos son ingeridos por el cerdo. El ácido clorhídrico y la pepsina gástrica del tracto digestivo inician la disgregación del embrióforo, liberándose la oncosfera, la cual atraviesa la mucosa intestinal, alcanza los vasos sanguíneos o linfáticos por los cuales es transportada a cualquier órgano y tejido (como músculo, tejido subcutáneo, sistema nervioso, ojo) en donde se desarrolla hasta metacéstodo (larva o

cisticerco). El ciclo biológico se completa cuando el hombre ingiere carne de cerdo cisticercoso insuficientemente cocida, de modo que las larvas permanecen viables e infectantes. Las enzimas del aparato digestivo inducen la activación del cisticerco que evagina y se ancla en la pared del intestino para desarrollarse en una tenia adulta, productora de proglótidos grávidos, los cuales son evacuados hacia el exterior en las heces fecales del hospedero. Al ser ingeridos por el cerdo o el hombre, los huevecillos contenidos en los proglótidos maduros, pueden desarrollarse en cisticercos (Flisser y Malagón, 1989; Flisser, *et al*, 1982; Aluja, *et al*, 1987). La alta frecuencia de infecciones en humanos por el cisticerco de *T. solium* resultan probablemente de su ingestión a través de:

- a. alimentos o agua contaminados (heteroinfección).
- b. autocontaminación por personas que tienen un gusano adulto en el intestino, o
- c. posiblemente por autoinfección interna, debida a que un peristaltismo inverso hace retroceder los huevecillos al duodeno o a estómago donde eclosionan y tras la migración al interior de los tejidos somáticos o viscerales, producen cisticercosis.

Los síntomas que produce el establecimiento del parásito varía de acuerdo al número y al tejido invadido. Se le ha encontrado en tejidos subcutáneos e intramusculares, en el ojo y también en el cerebro, donde se puede desarrollar en los ventrículos del tejido cerebral o en cápsulas quísticas superficiales. La presencia de larvas de céstodos en crecimiento provoca una secuencia típica de reacciones celulares locales, incluida infiltración de

Tabla I. Frecuencia de cisticercosis porcina en 75 rastros de 22 estados de la República Mexicana. Tomado de Flisser, *et al*, 1982.

Estado y localidad	Frecuencia (%)	Año	Origen ^a
Aguascalientes			
Aguascalientes	0.32	1980	SSA
Campeche			
Campeche	Datos no facilitados		
Chihuahua			
Chihuahua TIF ^b	0.49	1980	SARH
Chihuahua	3.32	1980	M
	1.65	1981	M
Colima			
Colima, Villa Alvarez, Coquimatla, Canala	2.4	1980	M
Coahuila			
Torreón	2.37	1981	M
Distrito Federal (Mexico City)			
Ferrería	0.13	1980	SSA
	0.16	1981	SSA
Durango			
Durango	2.21	1980	M
Guauhuatán			
Guauhuatán	10.0	1981	M
San Felipe	3.0	1981	M
Jalisco			
Guadalupe	0.005	1980	SSA
México (state)			
39 rastros	0.22 (0.09-7.9)	1980	SSA
Michoacán			
La Piedad	10.0 ^c	1980	SARH
Morelos			
Oremavaca	0.37	1980	SSA
Juchitán, Zacatepec, Tlahuiltepec, Puente de Ixtla	1.9	1980	M
Nuevo León			
Monterrey	0.001	1980	SSA
	0.016	1981	SSA
Querétaro			
Querétaro	0.56	1980	SSA
	0.74	1981	SSA
San Luis Potosí			
San Luis Potosí	0.67	1980	SSA
	0.39	1981	SSA
Sonora			
Hermosillo	0.07	1980	SSA
Tahuacan			
Vallehermosa	Cerdos no sacrificados en estos rastros		
Tamauilipas			
Cimbal Victoria	0.37	1980	SSA
Tlaxcala			
Tlaxcala	1.0	1981	M
Huamantla	0.63	1980	M
Ajitaco	3.3	1980	M
Veracruz			
Jalapa	0.11	1980	SSA
Veracruz	0.75	1980	SSA
Tuxpan	1.08	1980	SSA
Yucatán			
Merida	0.04	1980	SSA
Zacatecas			
Jerez	0.75	1980	SSA
Piedras Blancas	2.10	1980	SSA
Zacatecas	1.56	1980	SSA

^a Datos no publicados obtenidos de: SSA, Secretaría de Salud; M, Registros del rastro municipal; SARH, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

^b TIF, rastros en donde se prepara la carne para exportación, SARH.

^c Valor Estimado.

neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas. Las alteraciones histopatológicas son muy variables en tipo, severidad y localización topográfica. Los signos y síntomas causados rara vez permiten un diagnóstico, excepto cuando la cisticercosis es cutánea, subcutánea u ocular, en donde el parásito es fácilmente identificable. En este sentido, en zonas de alta prevalencia, un humano adulto que presente epilepsia tiene altas probabilidades de ser neurocisticercoso.

El cerdo desempeña un papel muy importante en la transmisión de la teniasis por *T. solium* a el hombre. La porcicultura rústica constituye un factor de suma importancia en la transmisión de la cisticercosis ya que la crianza de cerdos mantenidos en libertad, facilita que los animales tengan una mayor oportunidad de consumir heces de humano contaminadas. Mientras tanto, en la porcicultura altamente tecnificada la posibilidad de infección es muy baja. Una forma de evitar la transmisión de teniasis es la inspección sanitaria para evitar el consumo de carne de cerdo. De acuerdo al código sanitario, las canales afectadas por cisticercosis deben ser decomisadas. Numerosos estudios demuestran la elevada frecuencia de decomiso de canales de cerdo en México, lo que representa pérdidas económicas importantes (Aluja, *et al*, 1987). En la Tabla I se muestra la incidencia de la cisticercosis porcina en diferentes rastros distribuidos en el país. Sin embargo, son varios los factores que contribuyen al control ineficiente del consumo de cerdos criados rústicamente. Entre ellos figuran el consumo directo, la falta de rastros suficientes, la corrupción que frecuentemente se presenta en los mismos, la evasión de rastros premeditada y la poca efectividad de la forma de identificación de canales infectados. Dada la



Figura 3. Aspecto de cisticerco de *Taenia crassiceps* variedad ORF.

importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en México, ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos y patológicos así como diagnóstico, tratamiento y prevención.

Como estrategias para avanzar en el estudio de la relación huésped-parásito en la cisticercosis en una forma sistemática y controlada, nuestro grupo de investigación (Dra. Edda Sciutto, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) comenzó a estudiar un modelo experimental de cisticercosis murina causado por *Taenia crassiceps*, el que además de producir conocimientos sobre la cisticercosis del ratón, permitiera extrapolar las observaciones realizadas en el modelo murino a la cisticercosis por *T. solium* y facilitar así el estudio de esta compleja relación.

Existen varios tipos de cepas o variedades de cisticercos de *T. crassiceps*. La cepa de *T. crassiceps* llamada ORF (Fig 3), aislada en 1952 (Freeman, 1962) es una variedad anormal debido a que raramente produce escólex, lo que se ha acentuado conforme la cepa se ha transferido de ratón en ratón (Dorais y Esch, 1969), por lo cual no puede infectar a su hospedero definitivo. La cepa ORF presenta aberraciones cromosómicas (mutante aneuploide) (Smith, *et al*, 1972). *T. crassiceps* cepa KBS, aislada en 1965 (Dorais y Esch, 1969), presenta anomalías frecuentes en el escólex y es posible que no sea infectiva en cánidos; TOI, obtenida por Freeman (1961) a partir de una infección natural en marmotas (*Marmota monax*); ERS, obtenida por una infección en ratas a partir de parásitos de ratón; HYG, aislada en 1974 por infección de un ratón con huevecillos obtenidos de la tenia de una zorra y DEB, aislada de un ojo humano en 1972 (Freeman, *et al*, 1973).

TABLA II. Inducción de inmunidad protectora en contra de la cisticercosis murina e inmunoprevención de la cisticercosis porcina por vacunación con antígenos de *Taenia crassiceps*. Tomado de Manoutcharian, *et al*, 1995.

	RATON		CERDO	
	CONTROL	VACUNADO	CONTROL	VACUNADO
INMUNIZADO CON:				
<i>T. crassiceps</i> (Extracto total)	^a 25.8 ± 1.9	0*	519 ± 49.2	216.8 ± 53.8*
<i>T. solium</i> (Extracto total)	25.8 ± 1.9	1 ± 0*		
<i>T. crassiceps</i> (Fluido vesicular)	38.1 ± 6.7	14.3 ± 7.2*	5 ± 0.85	2.5 ± 1.19*
<i>T. crassiceps</i> (Fracciones de 56, 66 y 74 Kd)	38.1 ± 6.7	9.7 ± 6.6*	5 ± 0.85	0.16 ± 0.17*
KETc1	28.2 ± 18.38	6.6 ± 4.72*		
KETc7	28.2 ± 18.38	7.6 ± 7.57*		
KETc11	28.2 ± 18.38	40.6 ± 22.2		
KETc12	28.2 ± 18.38	4.4 ± 5.3*		

*Diferencias protectoras significativas con los controles.

^aPromedio ± error estándar de los cisticercos recuperados. El número de animales de cada grupo varía de 5 a 15. KETc 1, 7, 11 y 12 son antígenos recombinantes de *T. crassiceps*.

El modelo experimental murino de *T. crassiceps* ofrece características que favorecen su utilización, dentro de las cuales se encuentran:

a. La capacidad del cisticerco para reproducirse por medio de gemación exógena en su estadio larvario, propiedad que le permite mantenerse fácilmente en ratones de laboratorio por pases intraperitoneales sucesivos. La velocidad de reproducción varía dependiendo del sitio donde se desarrolla la infección, pero en cavidad peritoneal es mayor, por lo que la inoculación intraperitoneal en ratones ha sido seleccionada con fines experimentales (Freeman, 1962).

b. La similitud antigénica que existe entre el metacéstodo de *T. solium* y el de *T. crassiceps* (Larralde, *et al*, 1989) lo que ha permitido utilizar los antígenos de *T. crassiceps* con fines de diagnóstico. Así los antígenos de *T. solium* se pueden reemplazar por los de *T. crassiceps* en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana (Larralde, *et al*, 1989; Ramos-Kuri, *et al*, 1992). También los antígenos de *T. crassiceps* han demostrado inducir niveles altos de protección al igual que los de *T. solium* en contra de la cisticercosis murina y ser de utilidad en la inmunoprevención de la cisticercosis porcina (Manoutcharian, *et al*, 1995), como se ilustra en la Tabla II.

c. Prácticamente no ofrece riesgos potenciales altos de infección para el humano.

La cisticercosis en el ratón es una parasitosis de tipo crónico, no mata a su huésped aún cuando puede continuar multiplicándose hasta que la carga parasitaria supera el peso del propio ratón. A consecuencia de las infecciones crónicas, hay presencia de antígenos circulantes, estimulación antigénica y formación de complejos inmunes. Es característico que en este tipo de

TABLA III. Diferencia de susceptibilidad (Promedio \pm SEM) a la infección con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* variedad ORF entre hembras y machos en diferentes cepas de ratones, a los 30 días de infección. Tomado de Sciutto, et al, 1991.

Haplotipo H-2	Cepa	Promedio de la carga parasitaria en hembras	Promedio de la carga parasitaria en machos
d	BALB/c	110.3 \pm 4.6 (70) ^a	25.8 \pm 1.9 (58) ^b
	DBA/2	83.2 \pm 9.6 (9) ^a	ND
	(BALB/c x DBA/2) F1	123.6 \pm 17.3 (7) ^a	34 \pm 4.2 (16) ^b
a(k/d)	A/J	115.3 \pm 5.4 (47) ^a	30 \pm 2.5 (45) ^b
b	BALB/b	18.1 \pm 2.3 (18) ^b	0.9 \pm 0.4 (20) ^{d,c}
	C57BL/6J	4.8 \pm 1.9 (28) ^c	0.4 \pm 0.2 (20) ^{d,c}
k	BALB/k	33.1 \pm 8.0 (15) ^b	0.0 \pm 0.0 (15) ^d
	C3H/HcJ	21.8 \pm 5.3 (15) ^b	3.7 \pm 1.7 (15) ^d
	C3HcB/FcJ	6 \pm 2.2 (10) ^c	2.7 \pm 1.5 (21) ^{d,c}

Los números en paréntesis representan los números de ratones probados.

^{a,b,c,d} Los datos con las mismas letras no son significativamente diferentes entre ellos al contrario de aquellas que tienen letras distintas ($P=0.01$). Los datos para los grupos con dos letras no son significativamente diferentes de aquellos datos que tienen al menos alguna de estas letras.

parasitosis se encuentren niveles elevados de inmunoglobulinas, específicamente IgE (Roitt, *et al*, 1991).

Los estudios realizados por Freeman (1964) muestran el desarrollo de un alto grado de eosinofilia y leucocitosis general junto con una disminución en el número de células cebadas en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inoculados con cisticercos. Esto también fue observado en sangre periférica, aunque en menor grado. Los machos presentan eosinofilia antes que las hembras y en general, los animales que desarrollan más rápido la eosinofilia consiguen abatir a los parásitos con mayor éxito.

Otro factor importante que interviene en la regulación de la respuesta inmune son las hormonas sexuales. Se ha demostrado que existe un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas-timo, que junto con el sistema inmune se puede autoregular (Grossman, 1985). Se acepta generalmente que los machos son más susceptibles que las hembras para las infecciones parasitarias y la susceptibilidad se ve aumentada en varias parasitosis durante el embarazo (Alexander y Stimson, 1988), aunque en la parasitosis murina producida por el metacéstodo de *T. crassiceps* se observó que las hembras son más susceptibles que los machos (Sciutto, *et al*, 1991) (Tabla III). Además de la respuesta inmunitaria dirigida contra el parásito se observa inmunosupresión y efectos inmunopatológicos, fenómenos que ocurren simultáneamente. Tanto el parásito como el hospedero han sufrido procesos de coevolución que los han llevado a una convivencia muy específica. Dentro de una misma especie existen también variaciones individuales de resistencia a la parasitosis.

TABLA IV. Cepas de fondo genético B10 que son resistentes a la cisticercosis murina. Tomado de Fragoso, *et al*, 1995.

Cepa	H-2								Carga Parasitaria Promedio \pm ES	
	I								Hembra	Macho
	K	A α	A β	E α	E β	S	D/L	Qa-2		
BALB/cAnN	d	d	d	d	d	d	b	-	132.96 \pm 6.88 ^a	27.49 \pm 1.95 ^b
C57BL/6J b	b	b	b	b	-	b	b	+	18.60 \pm 5.38 ^c	0.34 \pm 0.14 ^d
C57BL/10J (B10) ^b	b	b	b	b	-	b	b	+	23.00 \pm 5.52 ^c	0 \pm 0 ^d
B10.D2	d	d	d	d	d	d	d	+	16.04 \pm 3.47 ^c	0 \pm 0 ^d
B10.D2 (R103)	d	d	d	d	d	d	b	+	18.38 \pm 2.61 ^c	0.70 \pm 0.46 ^d
B10.D2 (R107)	b	b	b	b	-	b	d	+	21.68 \pm 4.42 ^c	0.36 \pm 0.36 ^d
B10.A (2R)	k	k	k	k	k	k	b	+	18.05 \pm 4.70 ^c	0 \pm 0 ^d

Promedio \pm SE de cisticercos recuperados 30 días después de retarlos con 10 cisticercos por ratón.
^{a,b,c,d} Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre ellos, mientras que los datos con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.01$).

Tabla V. Cepas con fondo BALB que presentan diferentes grados de susceptibilidad a la cisticercosis murina. Tomado de Fragoso, *et al*, 1995.

Cepa	Haplotype		Carga parasitaria Promedio \pm ES	
	H-2	Qa-2	Hembra	Macho
	BALB/cAnN	d	-	122.1 \pm 8.07 ^a
BALB/cByJ	d	-	31.1 \pm 4.80 ^b	4.46 \pm 1.84 ^c
BALB/cJ	d	+	10.2 \pm 2.98 ^d	0.39 \pm 0.16 ^c
BALB/B	b	+	23.7 \pm 3.76 ^b	0.53 \pm 0.27 ^c
BALB/K	k	-	27.7 \pm 5.49 ^b	0 \pm 0 ^c

Promedio \pm SE de cisticercos recuperados 30 días después de retarlos con 10 cisticercos por ratón.
^{a,b,c,d} Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre ellos, mientras que los datos con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.01$).

Varios estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que existen diferencias de susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina, genéticamente determinadas. Los resultados obtenidos recientemente nos señalan que las cepas que tienen un fondo genético B10 son resistentes a cisticercosis (Tabla IV), mientras que las cepas que presentan un fondo BALB tienen diferentes grados de susceptibilidad (Tabla V). Así, entre las cepas BALB, la cepa BALB/cAnN es la más susceptible. La cepa BALB/ByJ resultó de susceptibilidad intermedia, e igualmente susceptible que las cepas BALB/K y BALB/B. La cepa BALB/cJ resultó la de mayor resistencia. Esta última cepa presenta, entre otras diferencias genéticas reportadas, los genes codificadores de la proteína no clásica de histocompatibilidad Qa-2 funcionalmente activos. Como uno de los genes de resistencia probable, se evaluó su capacidad funcional para transferir este fenotipo a través de transgénesis y se observó que la transferencia del gen transfería efectivamente resistencia a la cisticercosis murina (Fragoso, *et al*, 1985). Este parece ser al menos uno de los genes que determinan la resistencia. Queda aún por evaluar la funcionalidad por medio de la cual se determina la resistencia.

T. crassiceps (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un gusano platelminto de la clase Céstoda, que se encuentra comúnmente en el intestino de las zorras rojas de Europa y Norteamérica. Las zorras rojas son los hospederos más comunes, pero también se les ha encontrado en otros cánidos como lobos, coyotes y perros. El gusano mide aproximadamente 70 a 140 mm de largo y 2.4 mm de ancho. Presenta un escólex constituido por cuatro ventosas y un rostelo o corona formado por dos anillos con 32 a 36 ganchos rostelares. El gusano

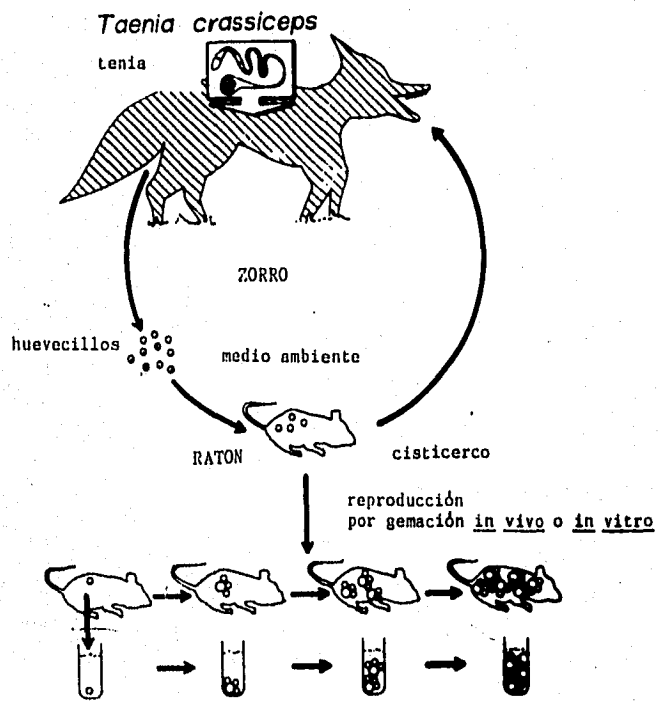


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

alcanza la edad madura después de seis semanas de haber ingresado en el intestino de cánidos (Freeman, 1962). El estado larvario de *T. crassiceps* es el *Cysticercus longicollis* y sus hospederos son pequeños roedores de Europa y Norteamérica, los cuales adquieren la infección al ingerir los huevecillos presentes en las heces de cánidos infectados. La capa estriada de los huevecillos es removida gracias a la acción de los jugos gástricos permitiendo la liberación del embrión u oncosfera de aproximadamente 0.02 mm de diámetro y que posee tres pares de ganchos (de aproximadamente 6 a 8 μ de longitud). El embrión migra al sitio donde se transformará en cisticerco, generalmente en las cavidades pleural y subcutánea y ocasionalmente en la cavidad peritoneal. El cisticerco presenta un escólex incipiente en uno de sus extremos y por el lado opuesto comienzan un proceso de gemación (reproducción asexual) que darán lugar a nuevos cisticercos (Freeman, 1962). El ciclo de vida se cierra cuando un roedor con cisticercos es ingerido por un cánido. En la figura 4 se describe el ciclo de vida de *T. crassiceps*.

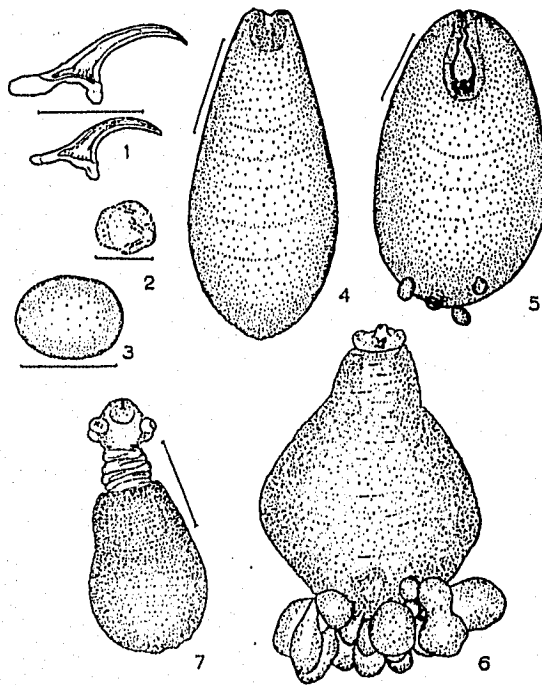


Figura 5. Etapas del desarrollo del metacéstodo de *Taenia crassiceps*. (valor de la escala entre paréntesis): 1. Ganchos rostellares (0.1 mm); 2. Embrión (0.02 mm); 3. Vesícula joven (0.5 mm); 4. Cisticerco joven (0.5 mm); 5. Cisticerco con gemas (0.5 mm); 6. Cisticerco totalmente gemante (unidad gemante).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

El cisticerco es un parásito complejo, que está constituido por diferentes tejidos bien diferenciados como lo son el muscular, el nervioso, excretor y contiene una vesícula llena de fluido vesicular (Flisser, *et al*, 1982). La morfología de las diferentes etapas del desarrollo del metacéstodo se muestra en la figura 5. Su tamaño y estructura compleja son factores que probablemente han dificultado la posibilidad de identificar componentes inmunológicos que sean capaces de dañarlo. Al considerar este punto, se ha propuesto generar un modelo experimental potencialmente sensible a las moléculas y células inmunes con el cual avanzar en la identificación de mecanismos inmunológicos asociados a las condiciones de resistencia genética determinadas o inducidas por vacunación. Para ello se considera importante la producción *in vitro* de células obtenidas a partir de cisticercos de *T. crassiceps*. El disponer de células parasitarias ofrecería un blanco más susceptible al ataque de diferentes mecanismos inmunológicos del huésped y probablemente resultaría más accesible a la identificación de los componentes inmunológicos que participan en el control del crecimiento parasitario.

Además, el contar con células parasitarias permitiría disponer de una versión simplificada del parásito de donde se puede obtener información más amplia y profunda sobre su biología celular, molecular y la fisiología de su desarrollo. La manipulación de células provenientes de parásitos ofrece un gran potencial para ahondar en el conocimiento de la estructura y la fisiología del parásito y los esfuerzos por establecer líneas celulares parasitarias han comenzado a tener éxito. Para el desarrollo de cultivos primarios de cisticercos, se tomó como antecedente la producción de líneas celulares de invertebrados

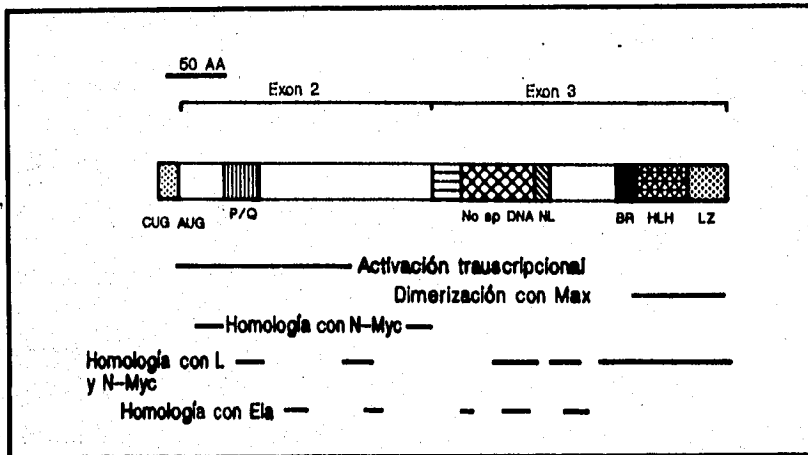


Figura 6. Esquema del polipéptido c-Myc y sus dominios funcionales. CUG, sitio de iniciación dentro del exón; AUG, sitio de iniciación definido para el exón 2; P/Q, región rica en prolina/glutamina; No sp DNA, región de unión no específica al DNA; NL, localización de la señal nuclear; BR, región básica; H-L-H, dominio de la hélice-asa-hélice; LZ, el cierre de leucina (Marcu, 1992).

(Hink, 1979) y parásitos (Bayne, *et al*, 1994), las cuales se modificaron a fin de encontrar las condiciones apropiadas para desarrollar cultivos celulares provenientes del cisticerco de *T. crassiceps*.

En el intento de immortalizar las células parasitarias, se planea evaluar la presencia de genes de interés que se puedan modificar con el propósito de incrementar la proliferación celular. En este sentido, se ha visto que existen genes específicos (oncogenes) que intervienen en fenómenos de neoplasia, tumores y proliferación celular (Watson, *et al*, 1987). Algunos genes celulares normales o proto-oncogenes tienen el potencial de convertirse en oncogenes. Entre ellos figuran el gen *c-myc* (Fig 6), el cual se ha reportado que interviene en procesos de proliferación y diferenciación celular. Varias de las formas de activación del oncogen *myc*, que dan lugar a estados cancerosos, incluyen translocaciones cromosomales no azarosas, como en la génesis de leucemias de células T, leucemia linfocítica de células B aguda e inmunocitomas de rata; la amplificación de genes (expresión elevada del gen *c-myc*) que se observa en la progresión de un gran número de tumores de humanos y generalmente asociados a fenotipos—altamente malignos como en células gástricas adenocarcinomas, células pequeñas de carcinoma de pulmón, glioblastoma, carcinoma del colon y leucemia de células plasmáticas, entre otras y la activación del gen *c-myc* por inserción proviral como en la linfomagénesis bursal en donde el locus *c-myc* se encuentra integrado en el mismo sitio que el virus de la leucosis en aves (Marcu, *et al*, 1992). Además, en la mayoría de los diferentes tipos celulares, *c-myc* se expresa de forma omnipresente (Kelly, 1986). El gen *c-myc* se agrupa dentro de los oncogenes nucleares, por codificar

proteínas nucleares que participan por un lado como transactivadores de la transcripción y por otro como agentes de immortalización celular (Weinberg, 1985). Además, se le ha propuesto un papel potencial en la transcripción y postranscripción de otros genes celulares y en la duplicación del ADN (Marcu, *et al*, 1992; Watson, *et al*, 1987). El gen *c-myc* codifica para dos polipéptidos (Myc-1 y Myc-2). Myc-1 es el polipéptido más largo y su transcripción inicia en el codón CUG cerca del extremo 3' del exón 1. El resto del exón 1 es una secuencia larga, no codificadora, la cual se encuentra muy conservada entre los genes de humanos y murinos y se propone que presenta múltiples funciones regulatorias. El polipéptido más pequeño Myc-2, es el predominante y su sitio de iniciación es en el codón AUG que se encuentra en el inicio del exón 2 (Marcu, *et al*, 1992).

Estos antecedentes permiten contemplar la posibilidad de modificar al cisticerco con el uso de *c-myc* como una alternativa para la immortalización de las células parasitarias. Con este objetivo se decidió en una primera etapa identificar secuencias homólogas del gen *c-myc* en el cisticerco de *T. crassiceps* para acceder, en un siguiente paso, a la modificación génica de las células del cisticerco.

III. OBJETIVOS

- a. Obtener a partir de cisticercos de *Taenia crassiceps* células del parásito aisladas.**
- b. Estudiar la capacidad de crecimiento de las células *in vitro* en diferentes tiempos y circunstancias de cultivo.**
- c. Evaluar la capacidad de crecimiento de las células *in vivo* en hospederos genética y sexualmente diferentes.**
- d. Identificar secuencias homólogas al gen c-myc en el genoma del cisticerco de *Taenia crassiceps*, a fin de considerarlo como una herramienta para la immortalización de las células.**

IV. MATERIALES Y METODOS

a. Obtención de células parasitarias a partir del cisticerco de *Taenia crassiceps*

a.1 Obtención de los cisticercos

Los cisticercos utilizados fueron de *T. crassiceps* variedad ORF, obtenidos a partir de la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa BALB/cAnN de 4 a 6 semanas de edad, proporcionados por el bioterio del IIB, UNAM.

La obtención de los cisticercos se realizó siguiendo el procedimiento siguiente:

a. Se infectó a los ratones intraperitonealmente con 10 cisticercos que medían entre 1 a 1.5 mm y que no presentaban gemaciones, suspendidos en aproximadamente 0.5 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) 1x (0.15 M de cloruro de sodio (NaCl), 0.01 M de amortiguador de fosfatos de sodio, pH 7.2). A los 60 días posteriores a la infección, se sacrificaron por dislocación cervical.

b. Los ratones se sumergieron en una solución de Benzal por 10 minutos y posteriormente en una solución de alcohol al 70 %.

c. Se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal del ratón con una solución de PBS estéril. Se lavaron en la misma solución 4 a 5 veces.

a.2 Obtención y cultivo *in vitro* de células de cisticerco

Después de haber obtenido entre 450 y 500 cisticercos de un tamaño aproximado de 5 mm de longitud y 2 mm en su parte más ancha, se dejaron durante una hora en una solución de agua/antibiótico al 10 % (Penicilina 10.000 UI/ml /Estreptomina 10,000 µg/ml). Este tratamiento se utilizó con el fin de lisar las posibles células que provenían del ratón y hayan quedado adheridas a los cisticercos.

Se lavaron nuevamente los cisticercos para eliminar el exceso de agua/antibiótico y se colectaron en 50 ml de RPMI 1640 (GIBCO) complementado estéril, pH 7.4. Cada 87 ml de medio se complementó con:

Suero fetal bovino (HyClone, Laboratories) 10 ml; Piruvato de sodio, 1 ml; Penicilina/Estreptomina (GIBCO), 1 ml; aminoácidos no esenciales (GIBCO), 1 ml; L-glutamina (220 mM), 100 µl; β-mercaptoetanol (50 mM), 3.25 µl; HEPES, 2.5 µl; bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 2 gr/l.

El RPMI 1640 es un medio que fue desarrollado especialmente para cultivo de linfocitos, aunque también se utiliza para otros tipos de células y para cultivo de cisticercos *in vitro* (Bruckner, 1979; Lacleste, *et al.*, 1981; Taylor y Baker, 1987).

Posteriormente los cisticercos se cortaron en pedacitos pequeños y se pasaron a frascos de cultivo de 50 ml (FALCON), a los que se adicionó 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 complementado. Se realizaron pruebas con diferentes nutrientes y mitógenos, al igual que a diferentes temperaturas, con el fin de identificar las mejores condiciones de cultivo. Los fragmentos se

mantuvieron en cultivo durante siete días para permitir la liberación de las células parasitarias.

Toda la metodología anteriormente descrita se realizó en condiciones de esterilidad.

a.3 Condiciones experimentales evaluadas en cultivos celulares *in vitro*

Temperaturas utilizadas:

Las temperaturas que se probaron fueron de 27°C y 37°C, las cuales son temperaturas ideales para el cultivo de insectos (Hink, 1979).

Mitógenos:

A los cultivos *in vitro* de células de cisticercos se les adicionó dos diferentes mitógenos, con el fin de evaluar su capacidad de inducir división celular:

- Concanavalina A (Con A) a diferentes concentraciones: 1, 10 y 100 µg/ml.
- Acetato de forbol miristato (PMA) (10 nM) - Ionóforo de calcio A23187 (5 mM).

Nutrientes adicionales al medio RPMI 1640 complementado:

En la búsqueda de la optimización de los cultivos *in vitro* de células de cisticercos se les adicionó diferentes nutrientes:

- a. Líquido peritoneal de ratón parasitado al 10% (infectados con cisticercos de *T. crassiceps*)
- b. Líquido peritoneal de ratón (no parasitado) al 10%.
- c. Suero de ratona preñada al 10%.
- d. Suero de ratona (no preñada) al 10%.

- e. Gonadotropina obtenida a partir de suero de yegua preñada (Folligon) al 1%.
- f. Gonadotropina obtenida a partir de suero de yegua preñada (Folligon) al 10%.
- g. Gonadotropina (Folligon) 10% - PMA (10 nM) - Ionóforo de calcio A23187 (5 mM).
- h. Estradiol 1 µg/ml.
- i. Estradiol 0.4 µg/ml.
- j. Estradiol 0.2 µg/ml.

Tiempos de cultivo *in vitro*:

Los tiempos de cultivo *in vitro* evaluados fueron los siguientes: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 15 días.

Parámetros para definir el efecto de los diferentes tratamientos en el cultivo:

Con el fin de comparar el efecto de los diferentes tratamientos en el cultivo, se definió un parámetro cualitativo: la presencia y la frecuencia de la formación de cúmulos celulares, que permitiera calificar las condiciones del cultivo. La alta frecuencia de cúmulos se definió con tres cruces (+++), la intermedia con dos cruces (++) y la presencia escasa se calificó con una cruz (+). El signo N.E. identifica los parámetros no evaluados.

a.4 Cultivos *in vivo* de células de cisticerco y evaluación de su capacidad de crecimiento en ratones susceptibles (BALB/cAnN)

Con el fin de evaluar la posibilidad de mantener las células en la cavidad peritoneal de los ratones, a los siete días de incubación se agregó al cultivo

Tripsina-EDTA 1x (GIBCO) en una proporción 1:1 al volumen total del cultivo (v/v) y se agitó suavemente por 15 minutos. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos para eliminar la tripsina-EDTA. Se lavó y resuspendió el botón 3 veces con medio RPMI 1640 complementado estéril. Se tuvo especial cuidado de que en el paquete celular no hubieran pequeños cisticercos o restos de ellos (fragmentos) y se inoculó 4×10^5 y 1.5×10^6 células por ratón en la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa susceptible (BALB/cAnN) y resistente (C57BL/6J) a la parasitosis por *T. crassiceps*. El volumen final utilizado para la inoculación fue de 0.5 ml. Treinta días más tarde se sacrificaron los ratones y se lavaron las cavidades peritoneales de los mismos, con los que se hicieron frotis.

Como control del experimento se inoculó en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa susceptible BALB/cAnN, 0.5 ml de medio RPMI 1640 complementado.

a.5 Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN

Se procedió a inyectar 5 ratones hembras de la cepa BALB/cAnN, con células clonadas obtenidas a partir de células parasitarias de un cultivo 7 días, en medio RPMI 1640, complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon) al 10 %, por medio de una dilución limitante. La dilución se realizó colocando en cada pozo (de una placa de cultivo de 96 pozos) la dilución adecuada para incluir 6 células. De los 60 pozos utilizados, en solo 3 se observó proliferación, después de 3 días de cultivo, en el medio anteriormente referido. Las células de estos pozos se colectaron e inocularon en la cavidad

peritoneal de los ratones. Cada uno de los animales fue inoculado con un promedio de 5 a 10 células. Se sacrificaron a los 18 días posteriores a la inoculación y se procedió a coleccionar el contenido peritoneal, con lo cual se hicieron frotis.

a.6 Cinética de formación de cisticercos a partir de células del cisticerco en cepas de ratones susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (C57BL/6J) a la parasitosis por *T. crassiceps*

Se realizó una cinética de crecimiento de células *in vivo* en ratones previamente definidos como susceptibles y resistentes a la infección parasitaria experimental, con las células de cisticerco cultivadas durante 7 días *in vitro*.

En ratones BALB/cAnN se inocularon 4×10^5 células resuspendidas en 0.5 ml de medio RPMI 1640 complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon) al 10 % por cada ratón. Se sacrificaron 5 animales a los 1, 3, 5, 7, 15 y 30 días después de la inyección de células respectivamente y se procedió al conteo de la carga parasitaria. Los ratones hembras C57BL/6J se inocularon con 4×10^5 células resuspendidas en 0.5 ml de medio RPMI 1640 complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon 10%). Se sacrificaron 5 animales a los 10, 15 y 30 días respectivamente y se procedió al conteo de la carga parasitaria.

Todos los animales fueron sangrados previamente a blanco para coleccionar el suero. Se tomaron muestras del contenido peritoneal y se hicieron frotis para observar los tipos de células presentes.

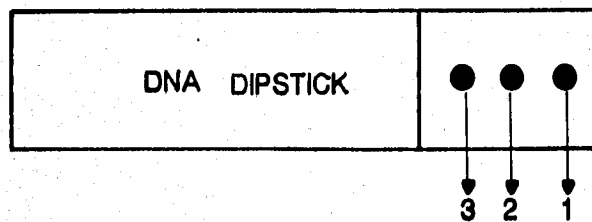


Figura 7. En la tira se coloca 1 μ l tanto de la muestra sin diluir como de cada dilución y se deja secar entre 5 y 10 minutos.

Nº 1.- Muestra no diluida.

Nº 2.- Muestra diluida (1/10).

Nº 3.- Muestra más diluida (1/100).

b. Preparación de la sonda c-myc de ratón

b.1 Obtención del plásmido

El plásmido utilizado fue facilitado amablemente por el M en C Marco Bonilla.

b.2 Cuantificación de la concentración del plásmido pGEM 2 con el gen c-myc

Para la cuantificación de la concentración, se utilizó el Kit DNA Dipstick (Invitrogen), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. El Kit determina la concentración de ADN mono o dicatenario, ARN u oligonucleótidos (de 6 bases o más) a concentraciones muy bajas (0.1 ng/ μ l). Los resultados visibles se producen a los 10 o 15 minutos y el color de las tiras es permanente. El protocolo consiste en realizar diferentes diluciones de la muestra de ADN del que se quiere medir las concentraciones (las convencionales son 1/10 y 1/100). En las tiras se colocaron las diferentes soluciones y la muestra sin diluir (Fig 7).

Se colocó 1 ml de la solución de lavado en la cubeta 1, 1 ml de la solución de acoplamiento en la cubeta 2 y 1 ml de la solución de revelado en la cubeta 3; se realizó el siguiente protocolo:

- Se colocó la tira en la cubeta 1 por 10 segundos.
- Se transfirió a la cubeta 2 por 3 minutos.
- Se lavó en agua destilada/desionizada/estéril por 20 segundos.
- Se pasó a la cubeta 3 por 2 minutos.

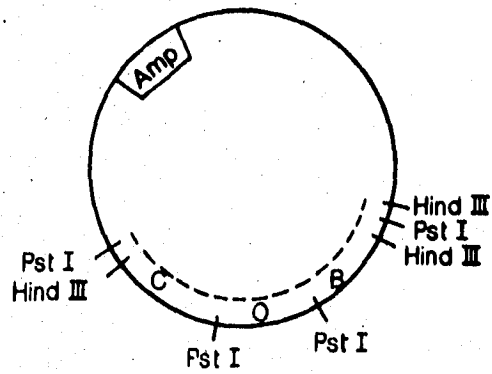


Figura 8. Plásmido pGEM 2 (3,000 pb) con el gen *c-myc*.
Fragmentos:

- B: 1,000 pb.
- C: 750 pb.
- O: 500 pb.

- Se lavó en la cubeta 1 por 20 segundos.
- Se dejó secar.
- Se comparó la intensidad de la muestra con el estandar del Kit.

b.3 Digestión del plásmido pGEM2 con el gen c-myc

Con base en lo descrito en la introducción y en el apéndice II se decidió utilizar como sonda la región del exón 2, la cual puede obtenerse por digestión con la enzima Pst 1 (10 U), lo que permitió obtener un fragmento de 500 pb (Fig 8).

Para la digestión se utilizó el siguiente protocolo:

Agua destilada/desionizada/estéril	31.5 μ l
Plásmido pGEM2 con el gen c-myc (1 μ g)	12.5 μ l
Buffer (10 X)	5.0 μ l
Enzima (PST 1)	1.0 μ l (10 U/ μ g)

	50.0 μ l

Después se incubó a 37°C durante 4 horas.

b.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para identificar y aislar el fragmento de 500 pb (que se utilizó como sonda) y eliminar el ARN presente en la muestra.

Soluciones:

TBE 5 x (Tris-Borato-EDTA)

Trizma base (Tris [hidroximetil] aminometano hidroclorehídrico) 0.4 M

Acido Bórico 0.4 M

EDTA (Acido etilendiaminotetracético) 10 mM

Se aforó a 1 litro con agua bidestilada/desionizada/estéril.

Procedimiento:

Se disolvió la agarosa (0.9 %) en TBE y se agregó 6 ml de Bromuro de etidio. Una vez gelificado, se cargaron los pozos con la digestión obtenida del plásmido pGEM2/gen c-myc con la enzima Pst I y se aplicó una corriente de 150 volts, durante 1 hora.

b.5 Extracción del ADN de 500 pb (sonda c-myc) de la agarosa

Soluciones:

TE

Trizma base 1 M, pH 8.0

EDTA 0.5 M, pH 8.0

Solución A: Fenol, cloroformo y etanol en una relación 5:4:1

Procedimiento:

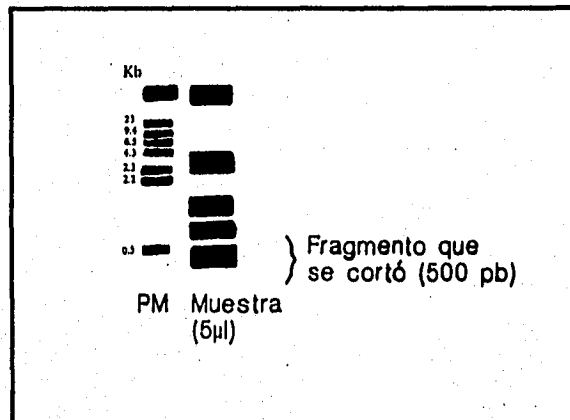


Figura 9. Esquema del producto obtenido a partir de la digestión del plásmido pGEM2 con la enzima Pst I. El fragmento de 500 pb se utilizó como sonda para la identificación del gen c-myc.

- Se cortó el fragmento de 500 pb del gel (Fig 9) y se colocó en un tubo eppendorf.
- Se disolvió el gel (baño María a 65°C).
- Se estimó el volumen y se agregó un volumen igual de fenol (equilibrado con 0.2 M de acetato de sodio pH 5.4).
- Se agitó en el vortex y se centrifugó a 14,000 rpm, por 5 minutos.
- Se quitó el sobrenadante y se guardó.
- Se agregó TE (volumen a volumen).
- Se agitó en el vortex y se centrifugó a 14,000 rpm, por 5 minutos.
- Se quitó el sobrenadante.
- Se juntaron los sobrenadantes.
- Se hicieron dos extracciones más con fenol.
- Se agregó la solución A en una relación volumen a volumen al sobrenadante.
- Se agitó en el vortex y centrifugó a 14,000 rpm, durante 5 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante.
- Se adicionó NaCl (que quedó 0.1 M con el ADN) y se agregó 2.5 x de volumen de etanol absoluto.
- Se dejó a -70°C una hora.
- Se centrifugó a 14,000 rpm, por 30 minutos a 4°C.
- Se desechó el etanol absoluto.
- Se lavó el botón con etanol al 70 % y se dejó secar.
- Se resuspendió en 10 a 20 ml de TE.

- Se cuantificó la concentración de la sonda utilizando el Kit DNA Dipstick (Invitrogen).

b.6 Extracción del ADN de los metacéstodos de *T. crassiceps*, variedad HYG y ORF

Soluciones:

SSC 20 x pH 7.6

Cloruro de sodio (NaCl) 3 M

Citrato de sodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 0.3 M

Se aforó a un litro.

Las soluciones y el material de cirugía que se utilizó fueron esterilizados.

Procedimiento:

Los cisticercos de *T. crassiceps* tanto de la variedad ORF como HYG fueron extraídos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN hembras de 8 a 10 semanas de infección. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

Para la obtención de los cisticercos se realizó lo siguiente:

- Se sumergió al ratón en benzal.
- Se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal con SSC 1x y se lavaron los cisticercos varias veces para eliminar al máximo las proteínas murinas adheridas a su superficie.
- Se lavaron los cisticercos varias veces, pero ahora con agua bidestilada/desionizada/estéril.

- Se quitó el agua.
- Se colocó 1.5 ml de cisticercos en cada tubo eppendorf.

b.7 Purificación del ADN de los metacéstodos de *T. crassiceps*, variedad HYG y ORF

La extracción del ADN de los cisticercos se realizó con el Kit "Genomic DNA for cell culture DNA, protocol mini" (Qiagen). El Kit proporciona un procedimiento de purificación seguro para el aislamiento de ADN genómico de alto peso molecular (con un intervalo de tamaño de 50-140 Kb, con un promedio de extensión de 80 a 100 Kb); proveniente de cultivo de células, de las que se obtiene un ADN genómico muy puro, libre de contaminantes. El procedimiento se basa en la optimización de soluciones amortiguadoras para una lisis cuidadosa de la célula y el núcleo, combinada con una separación por resinas de Qiagen, lo cual proporciona una purificación del ADN genómico sin el uso de extracciones con fenol y/o cloroformo.

La cuantificación de la concentración del ADN se realizó con el Kit DNA Dipstick (Invitrogen).

b.8 Extracción y purificación del ADN de ratón de la cepa BALB/cAnN

El ADN fue proporcionado amablemente por la M en C Gladis Fragoso.

b.9 Digestión del ADN de *T. crassiceps* HYG y ORF y de ratón BALB/cAnN

ADN purificado de *T. crassiceps* y de ratón BALB/cAnN fueron digeridos con las enzimas Eco RI, Pst I y Hind III respectivamente, con los protocolos siguientes:

ADN Ratón BALB/cAnN	13.3 μ l
Agua bidestilada/desionizada/estéril	9.7 μ l
Amortiguador (10 x)	3.0 μ l
Enzima	4.0 μ l

	30.0 μ l

Se incubó a 37°C durante 4 horas.

ADN <i>T. crassiceps</i> variedad ORF	78.0 μ l
Agua bidestilada/desionizada/estéril	6.0 μ l
Amortiguador (10 x)	10.0 μ l
Enzima	6.0 μ l

	100 μ l

Se incubó a 37°C durante 4 horas.

ADN <i>T. crassiceps</i> variedad HYG	60.0 µl
Agua bidestilada/desionizada/estéril	9.0 µl
Amortiguador (10 x)	9.0 µl
Enzima	6.0 µl

	84.0 µl

Se incubó a 37°C durante 4 horas.

b.10 Transferencia de ADN genómico de *T. crassiceps* variedad HYG y ORF y ratón BALB/cAnN (Southern, 1975)

Soluciones:

Amortiguador alkali 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl

Amortiguador neutral 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5/3 M NaCl

20 x Dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 M, al 10 %

Procedimiento:

Los fragmentos del ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con TBE y se desnaturalizaron con el amortiguador alkali durante una hora a temperatura ambiente y con el amortiguador neutral durante otra hora. Después el ADN se transfirió por capilaridad del gel al filtro de nitrocelulosa (Southern, 1975).

La transferencia se dejó transcurrir por 20 horas y después se fijó el ADN a la nitrocelulosa por irradiación con luz ultravioleta.

Para marcar la sonda se usó el Kit "Random primed DNA labeling" (Boehringer Mannheim Biochemica), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El Kit se basa en la hibridización de una mezcla de todos los hexanucleótidos posibles del ADN que serán marcados. La hebra complementaria es sintetizada desde el extremo 3'OH del primer hexanucleótido fortuito utilizando la enzima Klenow. Los deoxinucleótidos trifosfatos modificados (^{32}P)-, [^{35}S]-, [^3H]-, [^{125}I]- o marcados con biotina) presentes en la reacción son incorporados en la nueva hebra complementaria sintetizada. La longitud de los fragmentos del ADN que se marca no influye en la reacción. La muestra de ADN sirve como un molde para la síntesis del ADN marcado y no se degrada durante la reacción, lo que hace posible marcar por este método una cantidad mínima de ADN (10 ng).

La placa se expuso durante 5 días, en película para diagnóstico (Kodak).

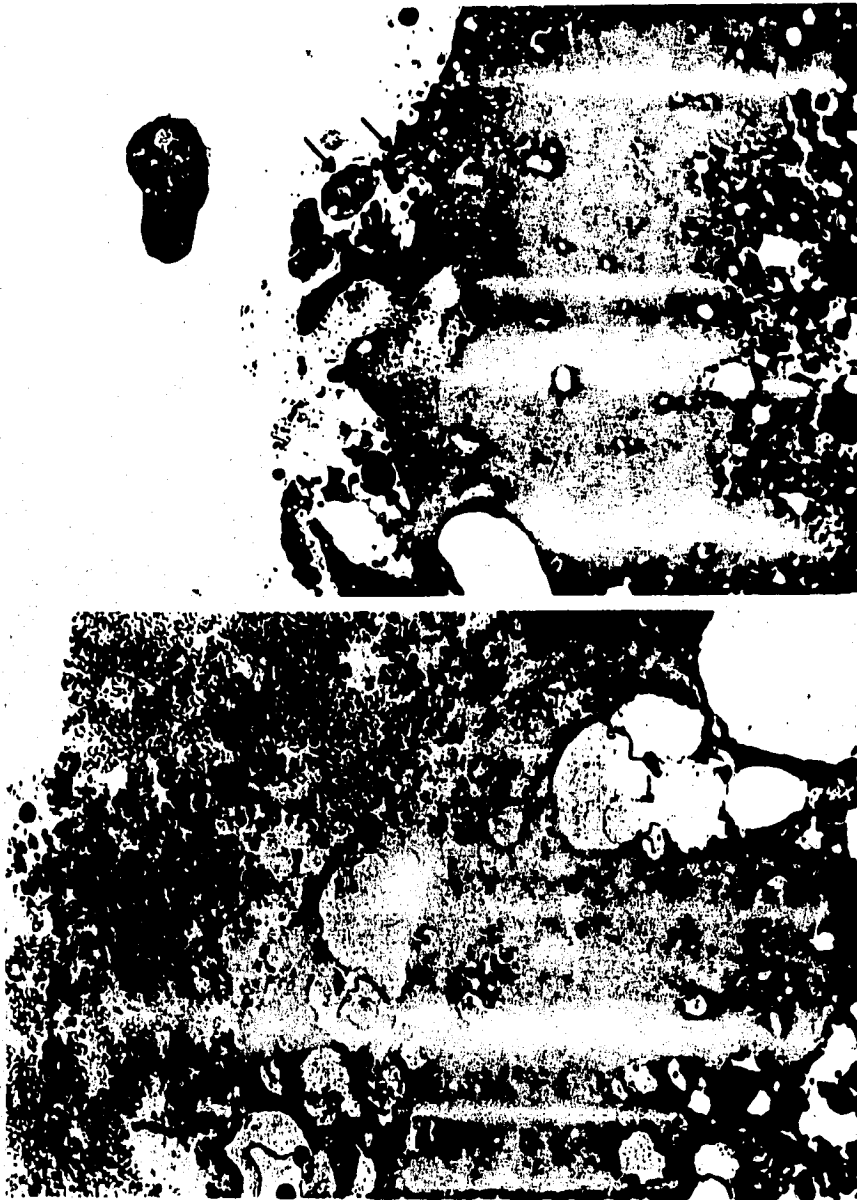


Figura 10. Aspecto de las células parasitarias obtenidas a los 7 días de cultivo *in vitro* en presencia de medio RPMI-1640 complementado y adicionado con gonadotropina al 10%, sin el tratamiento de tripsina-EDTA. Se observan células incluidas en los extremos de los fragmentos de cisticercos aún sin liberarse. Aumento 60x.

V. Resultados

a.1 Obtención de células parasitarias a partir del cisticerco de *Taenia crassiceps* y evaluación de la capacidad de crecimiento de las células *in vitro*

Con el fin de obtener células parasitarias se evaluaron diferentes procedimientos. Los primeros tratamientos no incluyeron tripsina-EDTA y a consecuencia de esto, como se observa en la figura 10, las células no alcanzaron a separarse de los fragmentos de los cisticercos, por ello se consideró un tratamiento adicional con tripsina-EDTA.

Con el propósito de encontrar las mejores condiciones para los cultivos celulares se evaluaron diferentes mitógenos y nutrientes adicionados al medio de cultivo. Las condiciones evaluadas se presentan en la Tabla VI. Como puede observarse, se obtuvo un mejor desarrollo de cúmulos celulares a 27°C que a 37°C.

La Concanavalina A (Con A) es una de las tres lectinas más frecuentemente utilizadas en cultivos, pues tienen la propiedad de activar a un gran número de clones de linfocitos T y B, sin importar la especificidad de unión al antígeno. Las lectinas presentan tres propiedades fundamentales: unión específica a azúcares, aglutinación de células y estimulación de linfocitos por lo cual también son llamados activadores policlonales (Klein, 1990). Existen reportes en los cuales se describe que existe una reactividad entre la Con A y los antígenos parasitarios del cisticerco (Vidal Tamayo, *et al*, 1990). Se utilizó

Tabla VI. Obtención de células parasitarias a partir del cisticerco de *Taenia crassiceps*. Optimización de cultivos *in vitro*.

Medio de cultivo RPMI 1640 complementado y adicionado con.	Temperaturas	
	27°C	37°C
Con A 1 µg/ml	++	+
Con A 10 µg/ml	+	+
Con A 100 µg/ml	+	+
PMA(10 nM) Ionóforo de calcio(5 mM)	++	+
Líquido peritoneal ratón no parasitado al 10%	+	+
Líquido peritoneal ratón parasitado 10%	+	+
Suero ratona no preñada al 10%	+	N.E.
Suero ratona preñada 10%	++	N.E.
Gonadotropina (Folligon) 1%	+	+
Gonadotropina (Folligon) 10%	+++	+
Gonadotropina (Folligon) 10%-PMA-Ionóforo de calcio	+	N.E.
Estradiol 1 µg/ml	++	N.E.
Estradiol 0.4 µg/ml	+	N.E.
Estradiol 0.2 µg/ml	+	N.E.

PARAMETROS EVALUADOS. Presencia y frecuencia de formación de cúmulos celulares.

+++ Alta frecuencia de cúmulos celulares en el medio de cultivo y alrededor de los cisticercos cortados (fragmentos). ++ Mediana frecuencia de cúmulos celulares en el medio de cultivo y alrededor de los cisticercos cortados. + Muy escasa frecuencia de cúmulos celulares. N.E. Parámetros no evaluados.

PMA-Ionóforo de calcio A23187, ya que se ha descrito que cuando se emplean ambos se activan linfocitos T y B, debido al aumento del calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Drexler, *et al*, 1990; Liu Lin, *et al*, 1992; Truneh, *et al*, 1985). Por lo anterior se decidió utilizar la Con A y el PMA-Ionóforo de calcio a diferentes concentraciones, con el propósito de observar si estos favorecían los cultivos de células parasitarias. Se encontró que la Con A y el PMA-Ionóforo de calcio inducían una frecuencia mediana de cúmulos celulares a una concentración de 1 µg/ml para la Con A y 10 nM/5 mM para el PMA-Ionóforo a 27°C, aunque estos no resultaron ser los factores que indujeron la mayor proliferación celular (Tabla VI).

Al considerar que los cisticercos se desarrollan óptimamente en la cavidad peritoneal de los ratones, se procedió a utilizar líquido peritoneal de ratones no parasitados y ratones parasitados, con la esperanza de que existieran factores que ayudaran al desarrollo y manutención de las células parasitarias. En ambos casos se encontró presencia escasa de cúmulos (Tabla VI).

Se ha reportado que en las infecciones causadas por *T. crassiceps* las hembras son más susceptibles que los machos (Sciutto, *et al*, 1991). Por este motivo y al considerar que las hormonas sexuales participan en el control de la infección parasitaria, se procedió a la utilización del suero de ratonas preñadas y no preñadas. En los cultivos con suero de las hembras no preñadas, se indujo una presencia de cúmulos escasa, mientras que en los cultivos con el suero de las hembras preñadas, la presencia de cúmulos fue mayor, estas variables sólo fueron evaluadas a 27°C, por ser la mejor temperatura encontrada para el desarrollo de los cultivos celulares parasitarios (Tabla VI).

Al observar que el suero de hembra preñada mejoraba los cultivos, se decidió evaluar una de las hormonas principales asociadas al embarazo. Se utilizó gonadotropina comercial purificada a partir de suero de yegua preñada (Folligon) y los mejores resultados se obtuvieron a una concentración del 10% a 27°C (Tabla VI).

Al encontrar que el PMA-Ionóforo de calcio y la gonadotropina al 10% por separado mejoraban las condiciones de los cultivos celulares, se procedió a utilizarlos en conjunto, a fin de mejorar las condiciones del cultivo, sin embargo los resultados no indicaron efectos potenciadores (Tabla VI).

También se evaluó la adición de estradiol al medio de cultivo, ya que esta hormona también participa en la susceptibilidad a la parasitosis. Se utilizaron diversas concentraciones (0.4, 0.2 y 1 µg/ml) y se encontró que la concentración de 1 µg/ml favorecía la presencia de cúmulos celulares (Tabla VI).

De las diferentes condiciones evaluadas en el cultivo de células parasitarias se deduce que los mejores resultados consistieron esencialmente en el medio RPMI 1640-complementado, adicionado con gonadotropina purificada a partir de suero de yegua preñada (Folligon) al 10%, a una temperatura de 27° C. Las células en mejor estado se observaron a los siete días de cultivo *in vitro*.

a.2 Cultivos *in vivo* de células de cisticercos y evaluación de su capacidad de crecimiento en ratones BALB/cAnN

Con el fin de evaluar la posibilidad de mantener las células en la cavidad peritoneal de los ratones, se inocularon 1.5×10^6 células por ratón en la cavidad

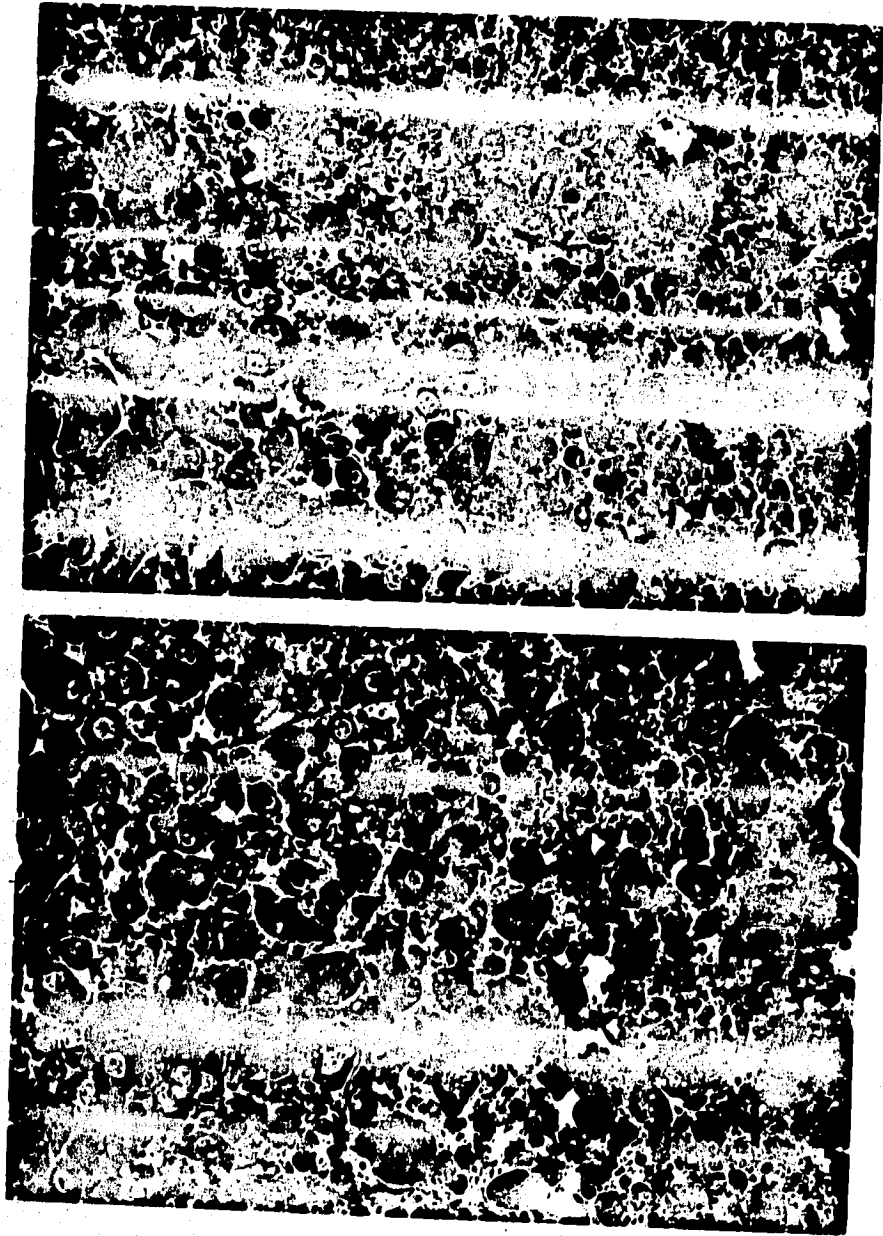


Figura 11. Aspecto de las células parasitarias obtenidas a los 7 días de cultivo *in vitro* en presencia de medio RPMI-1640 complementado y adicionado con gonadotropina al 10%, con el tratamiento tripsina-EDTA. Las células se encuentran libres de los fragmentos de cisticercos. Aumento 60x.

peritoneal de ratones hembras susceptibles BALB/cAnN. En la figura 11 se observa el aspecto de las células a los siete días de cultivo *in vitro* antes de ser inyectadas en la cavidad peritoneal de ratón, con el tratamiento tripsina-EDTA. Treinta días más tarde se sacrificaron los ratones y se lavaron las cavidades peritoneales de los mismos. Fue sorprendente encontrar un promedio de 120 cisticercos por ratón. Este resultado sugirió que las células parasitarias se multiplicaron y/o se agruparon formando cisticercos. Para confirmar este hallazgo se procedió a repetir este procedimiento con un número de células menor y con 4×10^5 células se encontraron 15 cisticercos en promedio, después de 30 días de infección.

a.3 Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN

A fin de descartar la posibilidad de la presencia de fragmentos parasitarios (Bunge, 1991) incluidos en las células utilizadas para inyección, se decidió clonar las células parasitarias considerando que algunas de estas células aisladas podían incluir a probables células capaces de proliferar y/o agregarse. Se procedió a inocular en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN, con células clonadas obtenidas a partir de un cultivo de células *in vitro*, por medio de una dilución limitante. Cada uno de los animales fue inoculado con un promedio de 5 a 10 células. Se sacrificó a un animal a los 18 días posteriores a la inoculación y se procedió a colectar el contenido peritoneal. Los resultados fueron satisfactorios:

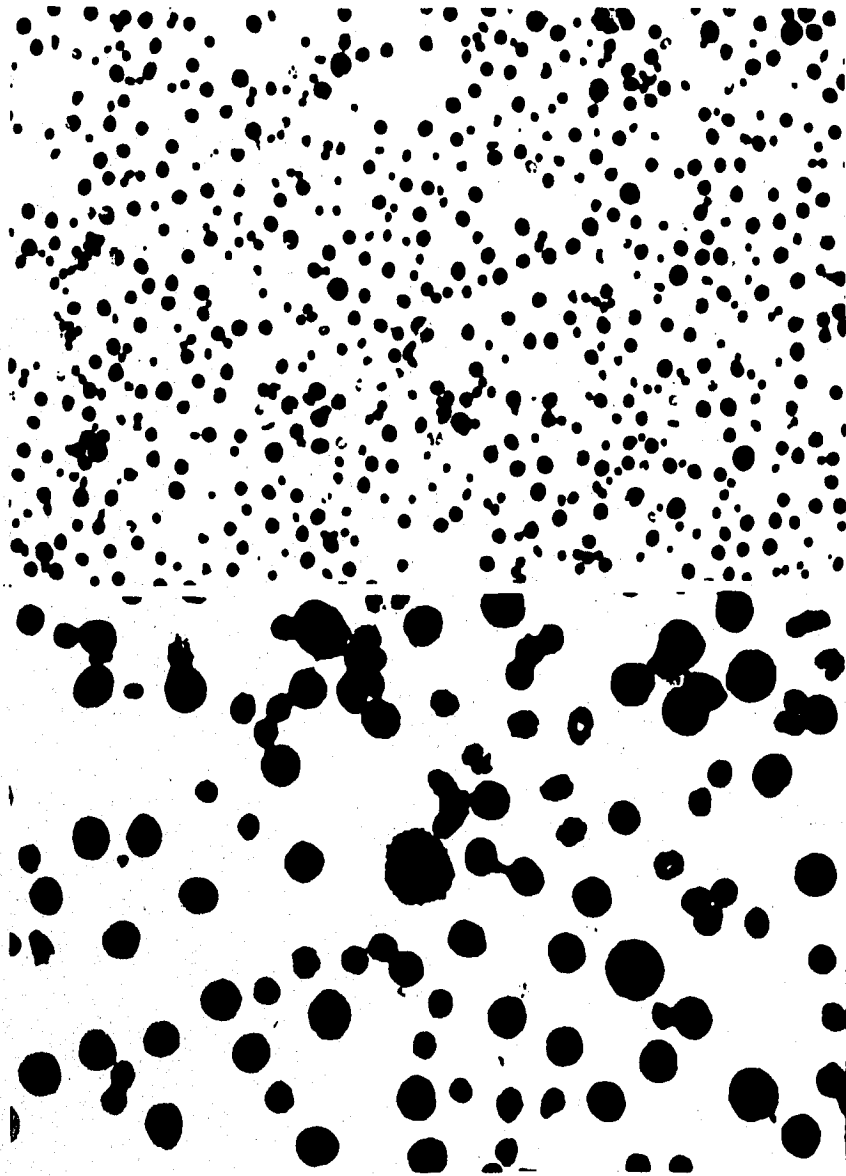


Figura 12. Aspecto de las células recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 24 días de haber sido inoculadas con las células de cisticerco clonadas. Se observan células binucleadas que aparentemente no pertenecen al hospedero ya que en la cavidad peritoneal de un ratón control no se observaron células con este aspecto. Cabe señalar que a los 24 días ya se habían encontrado cisticercos macroscópicamente visibles. Aumento 32 y 80 x, respectivamente.

1. De las 360 células parasitarias aisladas (60 pozos de placa de cultivo con 6 células parasitarias en cada uno) solo el 5 % del total fueron capaces de proliferar.

2. A los 18 días después de haberlas inoculado en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN susceptibles (cepa y sexo reportados como los mas susceptibles a la infección con cisticercos completos), se recuperó una gran cantidad de células aisladas y agregados celulares, sugerentes de la existencia de un mecanismo de reagrupamiento y/o proliferación probablemente en camino de formar un cisticerco completo.

3. A los 24 días de inyección se recuperaron 10 cisticercos macroscópicamente visibles, al igual que una gran cantidad de células aisladas y agregados celulares.

En las figuras 12 y 13 se muestra el aspecto de células recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 24 días de ser inoculados con células clonadas de cisticerco.

En la Tabla siguiente se observa la cantidad de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal para diferentes cantidades de células inyectadas:

No de células inyectadas por ratón	Promedio de No. de cisticercos recuperados de cavidad peritoneal \pm ds después de 30 días de inoculación.
5 a 10 (células clonadas)	8.0 \pm 2.82
4 x 10 ⁵	15.8 \pm 2.94
1.5 x 10 ⁶	120 \pm 28.28

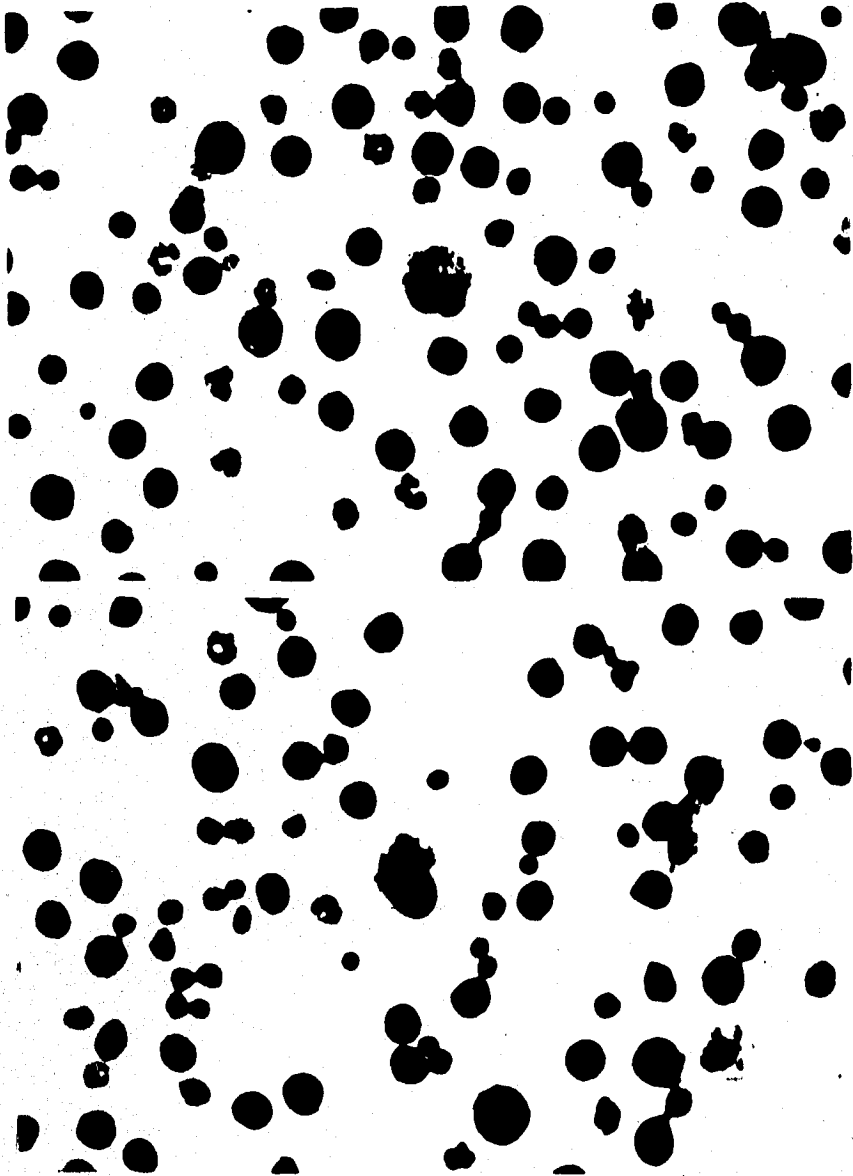


Figura 13. Aspecto de las células recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 24 días de haber sido inoculadas con las células de cisticerco clonadas. Se observan células binucleadas que aparentemente no pertenecen al hospedero ya que en la cavidad peritoneal de un ratón control no se observaron células con este aspecto. Cabe señalar que a los 24 días ya se habían encontrado cisticercos macroscópicamente visibles. Aumento 80 x.

a.4 Cinética de formación de cisticercos a partir de células del cisticerco en ratones de cepas susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (C57BL/6J)

Con el fin de confirmar la observación realizada y documentar el proceso de multiplicación celular y reconstitución de cisticercos se realizó una cinética de crecimiento de células *in vivo* en ratones previamente definidos como susceptibles y resistentes a la infección parasitaria experimental, con las células de cisticerco cultivadas durante 7 días *in vitro*.

En ratones BALB/cAnN se inocularon 4×10^5 células resuspendidas en 0.5 ml de medio RPMI 1640 complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon) al 10 % por cada ratón. Se sacrificaron los animales a los 1, 3, 5, 7, 15 y 30 días después de la inyección de células respectivamente y se procedió al conteo de la carga parasitaria. En ratones hembras C57BL/6J se inocularon con 4×10^5 células resuspendidas en 0.5 ml de medio RPMI 1640 complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon 10%). Se sacrificaron los animales a los 10, 15 y 30 días respectivamente y se procedió al conteo de la carga parasitaria (Tabla VII, Fig 14).

Como puede observarse (Tabla VII, Fig 14) en los ratones susceptibles, durante los primeros 5 días no se recuperaron cisticercos, sin embargo al día 7, se observaron los primeros cisticercos macroscópicamente identificables, a los 30 días de infección recuperamos un promedio de 15.8 cisticercos por ratón. En los ratones resistentes no se observaron cisticercos macroscópicamente identificables en ninguno de los tiempos evaluados, pero a los 15 días después de la inyección de las células se detectó la presencia de agregados celulares compatibles con imágenes de cisticercos en formación.

BALB/cAnN		C57BL/6J	
Días posteriores a la inoculación con 4×10^5 células parasitarias.	Número de cisticercos recuperados por ratón.	Días posteriores a la inoculación con 4×10^5 células parasitarias	Número de cisticercos recuperados por ratón.
1	0,0,0,0,0	10	0,0,0,0,0
3	0,0,0,0,0	15	0,0,0,0,0
5	0,0,0,0,0	30	0,0,0,0,0
7	0,0,0,2,3		
15	7,5,5,7,6		
30	20,15,15,12,17		

Tabla VII. Número de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN y ratones C57BL/6J después de diferentes días de inoculación con 4×10^5 células parasitarias por ratón. El número de animales utilizados fue de 5 ratones.

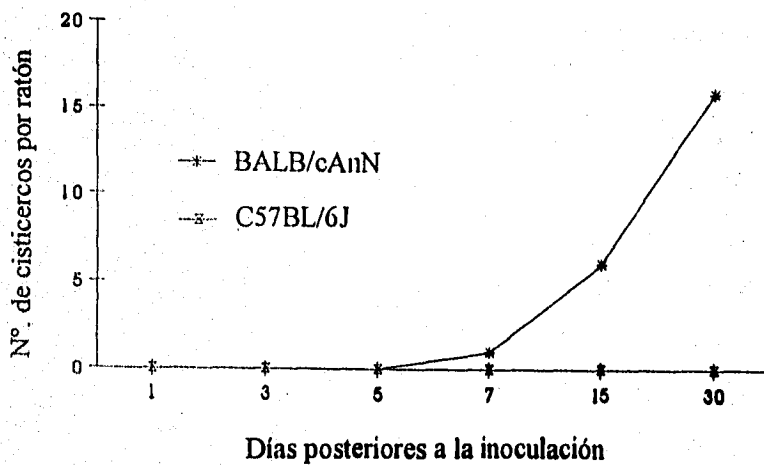


Figura 14. Cinética de formación de cisticercos después de inyectar ratones BALB/cAnN y C57BL/6J con 4×10^5 células parasitarias por ratón.

En la figura 15 se muestra el aspecto de las células de cisticercos de *T. crassiceps*, recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J a los 30 días de inyección. En ambas cepas se puede apreciar la formación de agregados celulares de diferentes tamaños, así como células aisladas.

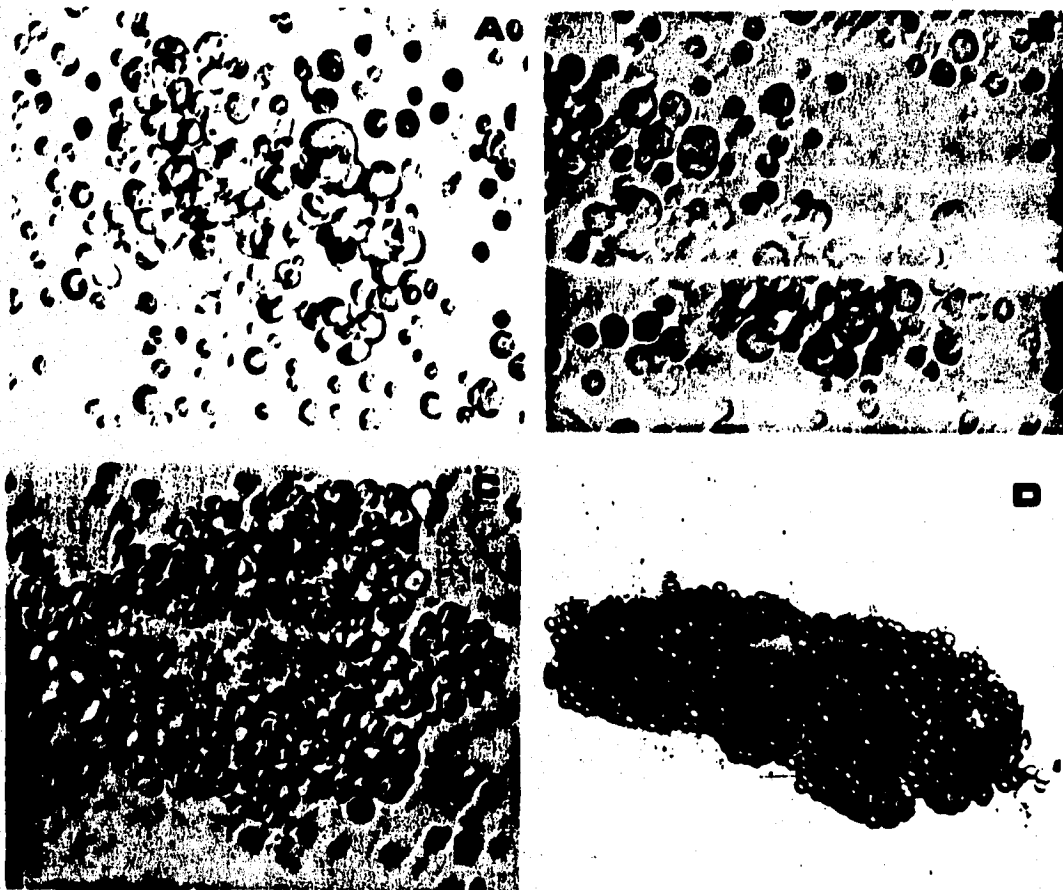


Figura 15. A, B, C.- Aspecto de las células de cisticercos de *Taenia crassiceps* recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 30 días de inyección con 4×10^5 células parasitarias. Aumento 40 x.

D.- Aspecto de las células de cisticercos de *Taenia crassiceps* recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6J a los 30 días de inyección con 4×10^5 células parasitarias. Aumento 40 x.

b. Hibridización de ADN de ratones BALB/cAnN y del cisticerco de *Taenia crassiceps*, variedad HYG y ORF

Para evaluar la presencia del oncogen c-myc en el genoma del cisticerco de *T. crassiceps* tanto de la variedad ORF como HYG se realizó una hibridización utilizando una sonda del gen c-myc de 500 pb, que comprende la región del exón 2 del gen.

La cuantificación de la concentración del plásmido pGEM2 con el gen c-myc fue de 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Una vez digerido el plásmido pGEM2 con el gen c-myc, se obtuvo la sonda c-myc, con una concentración de 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El ADN de los metacéstodos de *T. crassiceps* HYG y ORF (con una concentración de 0.302 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0.255 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente) y el ADN de ratón BALB/c (con una concentración de 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) utilizado como control, fueron digeridos con las enzimas Eco RI, PST I y Hind III respectivamente e hibridizados con la sonda c-myc. La transferencia del DNA genómico sugiere la presencia de este oncogen en el genoma de *T. crassiceps* tanto de la variedad HYG como ORF y en el ADN del ratón BALB/cAnN (Fig 16).

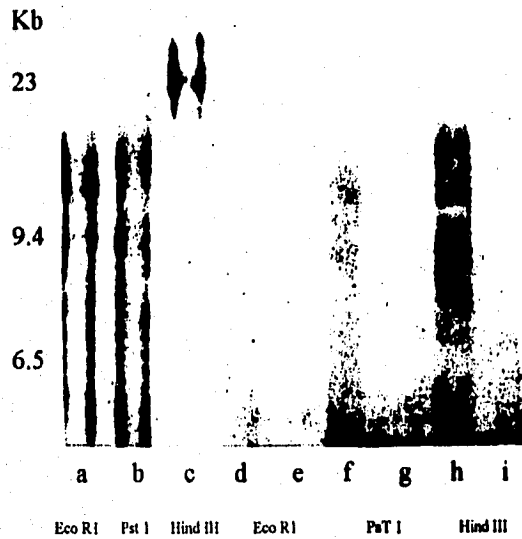


Figura 16. Hibridización de DNA de ratones BALB/cAnN (a, b, c) y del cisticerco de *Taenia crassiceps* ORF (d, f, h) e HYG (e, g, i) con la sonda c-myc, se muestra la hibridización de este oncogen en los genomas respectivos.

VI. DISCUSION

Este trabajo de tesis consistió en el diseño de un blanco sensible y apropiado para la identificación de factores inmunológicos asociados a condiciones de resistencia o susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina. Para ello, se trataron cisticercos murinos utilizando diferentes procedimientos con el fin de obtener células parasitarias que podían modificar su viabilidad o crecimiento en forma más sensible que el cisticerco completo. El tratamiento de los cisticercos por medio de un procedimiento mecánico cortándolos para reducirlos a pedazos pequeños, aunado a un tratamiento posterior (7 días) con tripsina-EDTA 1x, resultó ser el adecuado para la obtención de células *in vitro*. Se observaron mejores resultados cuando las células se cultivaban a 27 °C, que es una de las temperaturas ideales para el cultivo de células de insectos (Hink, 1979), mientras que a 37 °C los resultados fueron muy poco alentadores. Las células requieren además de la presencia del suero fetal bovino para su producción.

Las células producidas permanecieron viables en cultivo *in vitro* durante los 15 días posteriores a su obtención. Para optimizar este procedimiento se consideró la adición de diferentes sustancias reportadas como mitógenos para células de mamíferos, entre las cuales se evaluaron: Con A (1, 10, 100 µg/ml) y PMA-Ionóforo de calcio A23187 (10 nM/5 mM), ambos se han reportado como activadores de una gran variedad de tipos celulares en diferentes especies que incluyen células T y B de mamíferos (Paul, 1984 y Guilan, *et al*, 1992). El

PMA-Ionóforo de calcio se ha descrito que tienen un papel muy semejante al que realizan el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y el 1, 2-diacilglicerol (DG). Estas moléculas tienen función de segundos mensajeros intracelulares, por una parte el IP₃ participa en la movilización de calcio intracelular al incrementar la concentración citoplasmática y el DG activa a la proteína cinasa C (PKC). Ambas señales actúan sinérgicamente fosforilando diferentes proteínas celulares que regulan la función y proliferación celular, específicamente el PKC estimula la expresión de genes c-myc y c-fos, los cuales se han sugerido que participan en la transición de G₀ a G₁ en el ciclo celular (Hoshijima, *et al*, 1988). La Con A en la dosis de 1 µg/ml y el PMA-Ionóforo de calcio resultaron ser los que indujeron mejores resultados. Esto sugiere que las células parasitarias presentan en su superficie glicoproteínas capaces de ser reconocidas por Con A. La presencia de este tipo de glicoproteínas no es un hallazgo original, existen reportes de una extensa reactividad entre esta lectina y los antígenos parasitarios de los cisticercos (Vidal Tamayo, *et al*, 1990). Sin embargo, este hallazgo constituye una primera evidencia de la posibilidad de favorecer el crecimiento o mantenimiento de algunas o todas las células parasitarias por medio de la fijación a esta glicoproteína. La respuesta al PMA-Ionóforo de calcio (10 nM/5 mM) sugiere que al menos algunas de estas células parasitarias poseen mecanismos de activación compartidos con células de mamíferos.

In vitro se observó que las células parasitarias pierden viabilidad a partir de los 15 días de cultivo. Es probable que los cultivos carezcan de algunos de los componentes que le brinda el ratón que permitan su manutención por

periodos de tiempo más grandes. Entre los intentos por prolongar su supervivencia se usó la adición de líquido peritoneal de ratones parasitados y no parasitados al medio de cultivo, con la idea de que en este compartimento se encontrarán factores de crecimiento producidos por los propios cisticercos y/o el huésped. La evaluación de contenidos de la cavidad peritoneal de ratones susceptibles infectados no indicaron efectos positivos. El crecimiento *in vitro* de las células fue muy escaso y por periodos cortos. Así, probablemente existen otros componentes del hospedero que pueden ser importantes en el desarrollo de las mismas o bien que la muerte de algunas de las células durante la reproducción *in vitro* afecta el desarrollo de las células capaces de continuar agrupándose y/o dividiéndose.

En la consideración de otros posibles candidatos para optimizar los cultivos celulares, se tomó en cuenta la información previa de la relevancia de las hormonas sexuales en el crecimiento parasitario. Las hormonas sexuales tienen un papel importante tanto directo como indirecto en la regulación de la respuesta inmune y por ello probablemente participan en el control de la infección parasitaria. Se acepta generalmente (aunque hay excepciones), que los machos son más susceptibles que las hembras a las infecciones parasitarias y la susceptibilidad aumenta en varias parasitosis durante el embarazo. En algunas parasitosis como en la malaria, tripanosomiasis y toxoplasmosis, los estrógenos y progesterona se asocian a la inmunosupresión durante el embarazo (Alexander y Stimson, *et al*, 1988) pues facilitan la instalación de estas parasitosis. Mientras tanto se ha reportado que en las infecciones causadas por *T. crassiceps* las hembras son más susceptibles que los machos en un extenso

conjunto de cepas de ratones utilizadas (Sciutto, *et al*, 1991). Se usó suero de ratones hembras preñadas y no preñadas y se encontró que los cultivos se mejoraban en presencia de suero de ratones hembras preñadas. Entonces se evaluó una de las principales hormonas asociadas al embarazo, la gonadotropina (Folligon), la cual es una glicoproteína obtenida a partir de suero de yeguas preñadas. Esta sustancia puede ser substituida por la gonadotropina foliculo estimulante de la glándula pituitaria anterior tanto de hembras como de machos. El Folligon estimula el desarrollo del foliculo ovárico en hembras y la actividad espermatogénica de los machos la cual se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. Con esta hormona se obtuvieron los mejores resultados, lo que sugiere la capacidad de las células para interactuar con ella, promoviendo su proliferación y/o agregación. La identificación de receptores capaces de reconocer específicamente esta hormona sería de gran interés para profundizar en el conocimiento del componente endócrino participante en la relación huésped-parásito.

También se evaluó la adición de estradiol al medio de cultivo, ya que esta hormona también participa en la susceptibilidad a la parasitosis. Se utilizaron diversas concentraciones y se encontró que la concentración de 1 µg/ml también favorecía la presencia de cúmulos celulares (Tabla VI) pues produjo una frecuencia mediana de cúmulos celulares en el medio de cultivo y alrededor de los cisticercos cortados. Aunque la respuesta a estradiol no fue tan favorable como la respuesta a gonadotropina, resultaría interesante evaluar los mecanismos de interacción entre esta hormona y las células parasitarias. Cabe señalar que se ha observado que en cultivos *in vitro* de cisticercos de *T.*

crassiceps las hormonas sexuales como el 17 β -estradiol, la testosterona y la progesterona no afecta la reproducción y crecimiento de los mismos (Huerta, *et al*, 1992).

Estos resultados constituyen la primera documentación de que los cisticercos pueden disgregarse hasta células viables en cultivos de hasta 15 días de duración y señalan algunos factores que podrían favorecer su crecimiento, reproducción y/o agregación *in vitro*.

Al considerar que el cisticercos de *T. crassiceps* crece naturalmente en ratón y que experimentalmente se ha demostrado que hasta un cisticercos inyectado intraperitonealmente puede dar lugar a decenas de cisticercos después de un mes de inyección (Freeman, *et al*, 1962) se evaluó la capacidad de crecimiento de las células producidas *in vivo*, inyectándolas en su huésped natural. Para ello, se inyectaron aproximadamente 4×10^5 y 1.5×10^6 células (resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo) en la cavidad peritoneal de los ratones. Sorprendentemente 30 días después se recuperaron 15 y 20 cisticercos en promedio respectivamente, por ratón inyectado. Ante este resultado se repitió el experimento controlando la posibilidad de que en la inyección no se incluyeran cisticercos completos o fragmentos. Con este fin y a partir de un cultivo celular de 7 días, se aislaron células individuales, en el supuesto de que algunas de estas células aisladas podían incluir a las probables células capaces de proliferar y/o agruparse y no incluir cisticercos pequeños o fragmentos. Se mantuvieron *in vitro* durante 48 horas con el fin de reproducir un conjunto de células provenientes de seis células aisladas, que tuvieran así mayores probabilidades de establecerse en el ratón. Los resultados fueron satisfactorios:

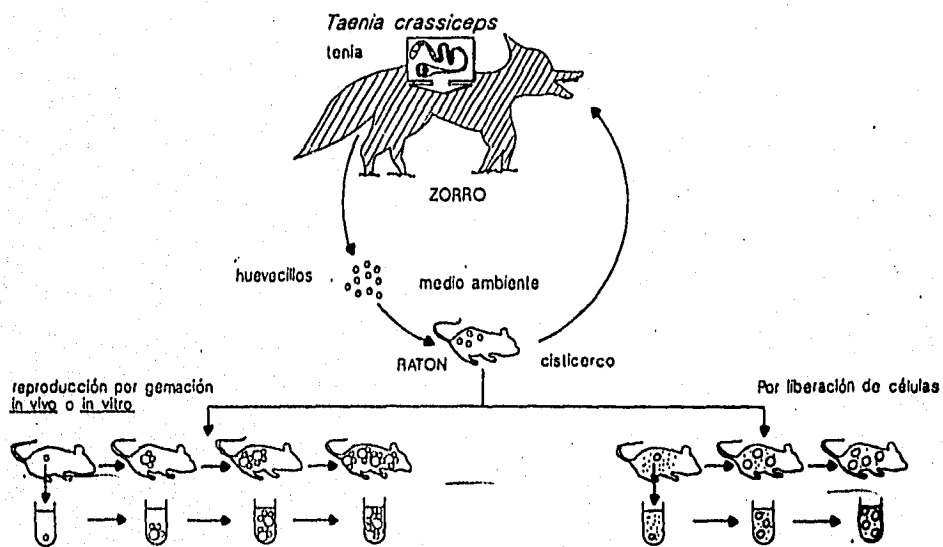


Figura 17. Propuesta de un nuevo modelo del ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

1. De las 360 células parasitarias aisladas (60 pozos de placa de cultivo con 6 células parasitarias en cada uno) solo el 5 % del total fueron capaces de proliferar.

2. A los 18 días después de haberlas inoculado en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN susceptibles (cepa y sexo reportados como los más susceptibles a la infección con cisticercos completos), se recuperó una gran cantidad de células aisladas y agregados celulares, sugerentes de la existencia de un mecanismo de reagrupamiento y/o proliferación probablemente en camino de formar un cisticerco completo.

3. A los 24 días de inyección se recuperaron 10 cisticercos macroscópicamente visibles, al igual que una gran cantidad de células aisladas y agregados celulares.

Este resultado señala que en el cisticerco existen células capaces de proliferar y/o agruparse y especializarse para formar un cisticerco completo *in vivo* y permite proponer una forma adicional de reproducción del parásito por medio de la liberación de estas células. Así, se propone una nueva versión del ciclo de vida de *T. crassiceps* como se puede observar en la figura 17.

Parece probable que se pudiera intentar cultivos más prolongados a partir de estas células aisladas, estos experimentos se encuentran en proceso.

Cabe señalar que entre las 4×10^5 y 1.5×10^6 células inyectadas por cada ratón, es muy probable que sólo algunas de ellas presenten la capacidad para regenerar nuevos cisticercos. Mientras tanto cuando se utilizan células clonadas se seleccionan aquellas con capacidad de crecer *in vitro* y si bien se inoculan una cantidad tan pequeña como 5-10 células por ratón, es probable que todas

ellas puedan continuar dividiéndose y especializándose para formar un cisticerco.

A fin de confirmar esta propuesta queda por identificar si existen células parasitarias en el contenido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con cisticercos completos, estos estudios se encuentran en proceso.

Tomando en cuenta la relevancia biológica que podría tener esta observación se procedió a realizar un estudio cinético después de la inyección de las células parasitarias. Se observó la capacidad de formación de cisticercos a partir de células en animales de diferente composición génica, determinada con base en información previamente reportada por nuestro grupo de investigación (Dra Edda Sciutto, IIB, UNAM), en la que se señalan diferencias importantes de susceptibilidad en distintas cepas de ratones. Con este propósito, fueron inoculados ratones previamente identificados como resistentes (C57BL/6J) y susceptibles (BALB/cAnN) (ante un desafío con diez cisticercos por ratón), con 4×10^5 células parasitarias por ratón. La cinética de crecimiento realizada en estos ratones permitió observar que en animales susceptibles (BALB/cAnN) los primeros cisticercos aparecen siete días después de la inyección de las células, mientras que en los ratones definidos previamente como resistentes (C57BL/6J) a la cisticercosis no se recuperaron cisticercos macroscópicamente observables, sin embargo se observaron células aisladas de gran tamaño y agrupamiento de cúmulos celulares, lo cual indicó la posible formación de cisticercos. Esto señala que la diferencia de susceptibilidad podría deberse a mecanismos diferenciales o de distinta eficiencia entre resistentes y susceptibles que se ejercen en el control del

crecimiento parasitario a través de la liberación de células. Entre ellos podrían figurar el control a través de anticuerpos fijadores de complemento específicos contra antígenos tempranamente expresados por las células parasitarias e importantes para su división así como el tipo de respuesta celular asociada a la presencia de estas células en el peritoneo. Estos diferentes mecanismos posibles pueden ahora estudiarse cuidadosamente utilizando las células parasitarias como blancos.

Llamó la atención la poca variabilidad en el número de cisticercos recuperados de cada ratón inyectado con células, respecto a las diferencias observadas en el número de cisticercos recuperados cuando los ratones son infectados con 10 cisticercos (Tabla III). Estas diferencias podrían ser debidas a la existencia de más de un fenómeno de reproducción cuando se desafían los ratones con cisticercos. En este tipo de desafío se analizó un fenómeno de reproducción más complejo que podría incluir: el crecimiento de fragmentos de cisticercos producidos por el pasaje de los mismos a través de la aguja de inyección (Bunge, 1991), la reproducción por gemación de los cisticercos que se establezcan, la liberación de células capaces de transformarse en cisticercos y el proceso de muerte de cada una de las partes mencionadas, que probablemente tenga lugar como resultado de su enfrentamiento con el huésped o como parte de un proceso natural.

Los resultados obtenidos permiten también proponer un nuevo modelo experimental con el fin de identificar mecanismos inmunológicos asociados a resistencia. Así, con base en trabajos anteriores, se sabe que la respuesta inmune participa en el control de la parasitosis, mientras la vacunación con

distintos antígenos parasitarios incrementa la resistencia del huésped (Sciutto, *et al*, 1990), la infección induce una depresión inmunológica en los ratones la cual parece favorecer el crecimiento y reproducción del cisticerco. A pesar de poder inducir por vacunación una respuesta inmune protectora, aún no se han encontrado diferencias en mecanismos inmunológicos asociados a estas condiciones de resistencia ni a condiciones de susceptibilidad. Es probable que la dificultad en encontrarlos se deba al menos en parte al blanco al que está dirigido el mecanismo inmunológico en estudio. Así, el cisticerco resulta un blanco macroscópico complejo con capacidad para evadir y recuperarse de los daños ocasionados por la respuesta inmune. El contar con este nuevo modelo experimental basado en la formación de cisticercos a partir de células parasitarias, parece factible evaluar la identificación de diversos componentes inmunológicos que participan en el control del crecimiento parasitario. Además la producción de células parasitarias probablemente permitirá conocer más acerca de la biología celular y molecular del cisticerco de *T. crassiceps* y con ello también acceder a ahondar en el conocimiento de la cisticercosis por *T. solium*. El hallazgo de que unas células puedan generar un cisticerco completo resulta además de un gran interés biológico tanto en el estudio de este parásito como para emplearlo como un modelo de diferenciación.

El disponer de células parasitarias abre también la posibilidad de modificar genéticamente el cisticerco, al menos en alguna de sus células, posibilidad que a la fecha no ha sido factible con el cisticerco completo. Para comenzar a evaluar la posibilidad de inducir inmortalización celular a través de modificación génica se consideró la incorporación en las células del parásito de

genes que participan en la proliferación celular como es el caso del gen c-myc. Las secuencias homólogas de oncogenes en el ADN de vertebrados se encuentran muy conservadas en *Drosophila melanogaster* (Shilo y Weinberg, 1981) y en varias especies de *Entamoeba* (Leyva, et al, 1993). La identificación de secuencias homólogas de oncogenes de vertebrados en invertebrados demuestra un alto grado de conservación de estos genes en una gran diversidad de especies, en vertebrados se ha reportado que el proto-oncogene c-myc participa en procesos de proliferación y diferenciación celular (Marcu, et al, 1992) y se ha propuesto que este pueda intervenir en la regulación de otros genes celulares. Así, c-myc puede jugar un papel importante en lo que se refiere al metabolismo de metazoarios, como es el caso de *T. crassiceps*. Para que este oncogen se incorpore eficientemente al genoma del cisticerco en un alto número de copias simulando un estado del gen activado se buscó si se encontraba presente en el genoma de *T. crassiceps*. La hibridización realizada, utilizando una sonda específica de c-myc, sugirió la presencia de este oncogene en el genoma de *T. crassiceps*. Sin embargo, falta por descartar que se trate de contaminación con material génico del huésped. Esta posibilidad se descartará identificando las clonas correspondientes en una biblioteca de cDNA de *T. crassiceps* producida en nuestro laboratorio (Manoutcharian, et al, 1995).

De confirmarse este hallazgo, el oncogene c-myc sería un gen de interés para poder utilizarlo directamente para modificar el genoma del cisticerco o como un gen acarreador para modificar genéticamente el cisticerco. La relevancia biológica de c-myc en la vida de este parásito queda por evaluar.

VII. CONCLUSIONES

Es posible obtener células parasitarias individuales a partir de cisticercos completos de *Taenia crassiceps*.

Se encontró que las condiciones óptimas de mantenimiento *in vitro* son en medio RPMI 1640 complementado y adicionado con gonadotropina purificada a partir de suero de yegua preñada (Folligon) al 10%, a una temperatura de 27° C.

Las células son capaces de mantenerse viables *in vitro* durante los 15 días después de su obtención.

Las células parasitarias son capaces de proliferar y/o agregarse para formar un cisticerco completo *in vivo*, en la cavidad peritoneal de ratones susceptibles (BALB/cAnN) a la parasitosis por *Taenia crassiceps*.

Las células parasitarias son capaces de mantenerse *in vivo* en la cavidad peritoneal de ratones de cepas susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (C57BL/6J) a la parasitosis por *Taenia crassiceps*.

La sonda c-myc identificó la presencia de secuencias homólogas en el genoma del cisticerco de *Taenia crassiceps* tanto en la variedad HYG como en la ORF y en el genoma de ratones de la cepa BALB/cAnN, utilizados como controles, lo cual sugiere la presencia de este gen en su genoma.

VIII. APENDICES

APENDICE I: CULTIVOS CELULARES

a. cultivo de células de vertebrados

Establecimiento de células en cultivo

En los últimos diez años el desarrollo de cultivos celulares provenientes de células animales se han encaminado al mejor desarrollo de técnicas que permitan una mejor mantención y control de la proliferación y diferenciación de una gran cantidad de tipos de células.

Durante mucho tiempo solamente era posible cultivar masas de tejidos; de tal forma dichos cultivos de tejidos, se podían multiplicar indefinidamente si la contaminación debida a bacterias, hongos, etc. era controlada. Si bien se trataba de crear cultivos provenientes de células disociadas, este hecho era bastante infrecuente, hasta que pequeñas cantidades de enzimas proteolíticas como por ejemplo la tripsina fueron utilizadas para disociar dichos tejidos, en células individuales. Una vez logrado el proceso de disociación se obtuvieron células primarias, estas se mantenían en buen estado cuando eran cultivadas en altas concentraciones, esto debido a que las células difundían nutrientes vitales hacia afuera de la célula, realizándose así una alimentación recíproca entre ellas. Otra de las alternativas utilizadas para incrementar la eficiencia en el crecimiento de las células consistió en colocarlas sobre una capa de nutrientes,

las cuales eran células esterilizadas por procesos de exposición a rayos X. Ninguna de estas células nutrientes tenían la capacidad de multiplicarse, pero se encontraban en un estado metabólicamente activo, permitiéndoles liberar una gran cantidad de nutrientes para que las células primarias en cultivo pudieran mantenerse, una vez logrado el proceso de establecimiento las células son llamadas células secundarias.

Es conocido el hecho de que generalmente las células no tienen una multiplicación infinita y que pueden dividirse un número de veces finitas antes de morir, por ejemplo las células provenientes de tejidos de pollo se pueden multiplicar de 20 a 40 veces antes de morir; cultivos de piel humana usualmente se dividen no más de 50 a 100 veces antes de morir, además si contamos con el hecho de que las células de piel o fibroblastos provenientes de individuos viejos tienen tiempos de vida más cortos. Afortunadamente, no todas las células provenientes de cultivos animales mueren, ya que algunas de ellas pasan el periodo llamado "crítico" y adquieren la habilidad de multiplicarse indefinidamente. A estas células que tienen la capacidad de crecer indefinidamente, se les refiere frecuentemente como inmortales (Watson, 1987), existe un número considerable de líneas celulares que han sido derivadas de tumores. La posesión de un fenotipo cancerígeno a menudo permite una más fácil adaptación de las condiciones de un cultivo celular. Esta propiedad puede deberse a que tanto las células cancerígenas, como las células normales, pueden adaptarse permanentemente en cultivos debido a un incremento en el número de cromosomas, frecuentemente cerca del doble del número diploide normal, un ejemplo son las líneas celulares cancerígenas HeLa

las cuales tienen alrededor de 70 a 80 cromosomas, comparado con un número normal que es de 46 cromosomas por célula (Watson, 1987). Aparentemente, la posesión de un número extra de cromosomas (aneuploidia) favorece el crecimiento de células en cultivo. El repentino cambio en las propiedades de crecimiento, que tienen las células normales con respecto a una célula cancerígena, se le conoce como transformación celular; espontáneamente estos fenómenos ocurren raramente, generalmente la transformación ocurre con mucha mayor frecuencia después de una infección con virus tumorigénico o después de la exposición a carcinógenos químicos o a una fuente de radiación. Independientemente de su origen las células transformadas a menudo tienen el potencial o la capacidad de crecer dentro de tumores, estas usualmente poseen ciertas características adicionales como son; a. tener formas redondas, b. crecer a altas densidades de células, c. a menudo están bajo la restricción de crecer bajo superficies sólidas, y d. son exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales se refiere, particularmente con respecto a los sueros.

La mayoría, pero no todas las células crecen mejor cuando se adhieren a superficies sólidas; raramente y sólo algunas líneas celulares pueden crecer y multiplicarse en suspensión, estas últimas generalmente, producen un mayor número de células, que cuando se les restringe a crecer en superficies sólidas. Recientemente, ha sido posible aumentar el crecimiento de las células que sólo podían crecer cuando se encontraban adheridas a superficies sólidas, esto se ha logrado gracias a la utilización de esferas microacarreadoras. Estas esferas permiten una gran área de contacto para que las células se adhieran dentro de una pequeña cantidad de volumen de medio de cultivo; esta nueva técnica

permite una alta concentración de células que se dividen de una forma similar a un cultivo en suspensión.

Requerimientos nutricionales

Una fuente de caracterización de cultivos celulares es por medio del control de los requerimientos nutricionales experimentales. En un principio, las células provenientes de tejidos eran incubadas en la presencia de soluciones básicas compuestas por sales, las cuales se encontraban complementadas generalmente con una gran variedad de fluidos biológicos dentro de los que se incluían al suero, linfa, plasma, fluidos amnióticos, fluido espinal, leche, extracto de embriones, etc. Se logró un gran avance en el conocimiento de los medio de cultivo cuando se lograron establecer las condiciones para el desarrollo de células *in vitro*, ya que fueron desarrollados medios basales, constituidos con la cantidad exacta de sales, aminoácidos, azúcares, vitaminas, precursores de ácidos nucleicos y otros componentes como los sueros fetales, tanto de becerros, como de bovinos. Con respecto a estos últimos, existen una gran cantidad de componentes potencialmente activos presentes en el suero, los cuales ayudan al desarrollo de cultivos de células de animales (Barnes, 1987), algunos de ellos son:

a. Vitaminas, las cuales incluyen al ácido ascórbico, retinol, ácido retinoico y calciferol.

b. Lipoproteínas, como son las lipoproteínas de alta densidad (HDL), de baja densidad (LDL), y la de muy baja densidad (VLDL).

c. Hormonas, como son las pancreáticas (insulina, somatostatina, glucagón), factores de crecimiento peptídicos, hormonas esteroidales (glucocorticoides, estrógenos, andrógenos y progesterona), hormonas pituitarias (adrenocorticotropina, hormona del crecimiento, hormona folículo estimulante, hormona luteinizante y gonadotropina), hormonas de la tiroides y paratiroides, y productos leucocitarios (interferon, factores de necrosis tumoral e interleucinas).

Los requerimientos de suero son casi universales para todas las líneas celulares de vertebrados, estos juegan uno o varios papeles en la regulación de la multiplicación *in vivo*. *In vitro* la densidad final de las células obtenida es frecuentemente una función de la concentración del suero; por tal motivo este es de suma importancia en cuanto a su contribución nutricional. Existen también medios basales los cuales se encuentran libres de la presencia de sueros fetales, estos utilizan una combinación de distintos tipos de nutrientes los cuales pueden suplir en alguna medida la presencia de suero, por ejemplo la adición de distintos tipos de hormonas, enzimas extracelulares y factores de unión a proteínas, permiten el desarrollo de líneas celulares derivadas de células de Leydig, células de ovario granulosas, células de próstata, etc. (Barnes, 1987); generalmente estas células tienen una respuesta específica a factores endócrinos, y también tienen la habilidad de crecer en un medio libre de suero, esta habilidad nos sugiere que existe una complicada interrelación entre la acción de varios de los factores anteriormente mencionados, dentro de los cuales el sinergismo es bastante común, las consecuencias de este sinergismo pueden ser positivas o negativas, dependiendo frecuentemente del

tipo de célula y del protocolo de investigación. Quizas una de las mejores contribuciones que ha tenido el uso de medios basales exentos de sueros es en la biología celular ya que en esta se aprovechan las técnicas para separar y propagar células que no pueden crecer normalmente en medios que contienen suero, un ejemplo de esto es el cultivo de células mamarias epiteliales de humano y el cultivo de células de tiroides de rata (Allegra, 1978 y Hammond, 1984).

Igualmente importante es la regulación exacta del pH del medio en el cual las células van a desarrollarse, este puede variar de una línea celular a otra, aún cuando la mayoría de las células normales crecen mejor a un pH alrededor de 7.6 (Watson, 1987).

b. cultivo de células de invertebrados

Existen aproximadamente 70 líneas celulares provenientes de diferentes especies de invertebrados, muchas de ellas son derivadas de insectos, pero diversas líneas han sido obtenidas a partir de ácaros y caracoles. Estas líneas fueron desarrolladas a partir de cultivos primarios de embriones, ovarios, macerados de larvas, pupas y adultos. (Hink, 1979).

Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares de invertebrados crecen más rápidamente en un rango de temperatura entre los 25°C y 30 °C, generalmente se acepta que una temperatura de 28°C es la adecuada para el cultivo y desarrollo de todas las células de invertebrados (Hink, 1979). Como se sabe muchas de las líneas

celulares de vertebrado crecen en una atmósfera de 5% de CO₂ de aire, a diferencia de las células de invertebrados que son capaces de crecer en condiciones atmosféricas normales.

Las células pueden mantenerse en frascos o botellas de cultivo teniendo aproximadamente 5 ml de medio de cultivo por cada 25 cm² de superficie de crecimiento, los subcultivos se realizan traspasando una alícuota de células a un nuevo frasco que contiene medio fresco. Las células de invertebrados al igual que muchas otras células deben ser subcultivadas en la fase exponencial de crecimiento o justo antes de que las células entren en su estadio estacionario; para poder determinar el momento en el cual deben ser subcultivadas se debe realizar una curva de crecimiento.

Muchas de las líneas celulares de insectos pueden crecer tanto adheridas a superficies sólidas o bien pueden encontrarse sueltas en el medio de cultivo, en este sentido es recomendable agitarlas levemente antes de proceder a subcultivarlas con el fin de obtener una suspensión homogénea de células. Las células que tienen la capacidad de fijarse pueden ser despegadas de las superficies, ya sea por medio de un procedimiento mecánico (raspando las paredes del frasco de cultivo o simplemente pipeteando el medio de cultivo sobre la capa de células) (Hink, 1979).

Si las células se dañan con alguno de los procedimientos anteriormente descritos, pueden utilizarse enzimas, como la tripsina la cual es una de las más comúnmente utilizadas, a una concentración de 0.1 a 0.2%, las células junto con la tripsina son incubadas durante 2 a 5 minutos, dependiendo de la línea celular de que se trate, agitando suavemente para así poder lograr una adecuada

separación de células; para detener la acción de la tripsina se sugiere añadir suero fetal bovino inactivado.

Medios de cultivo para células de invertebrados

Los medio de cultivo de las células de invertebrados difieren de los de células de vertebrados en que estos tienen diferencia en balance de iones, tienen elevadas concentraciones de aminoácidos, generalmente sus amortiguadores son de fosfatos más que de bicarbonatos, el pH usualmente es menor y la presión osmótica es más elevada. No existe un medio de cultivo definido para el cultivo de las células de invertebrados, todos los medios basales pueden ser complementados con una gran cantidad de componentes naturales, como lo son el suero fetal novino (FBS) en concentraciones de 5 a 20%, el cual se utiliza inactivado (56°C por 30 minutos), otros componentes complejos como lo son la lactoalbúmina, los aminoácidos y el hidrolizado de levadura.

Los antibióticos generalmente utilizados son la penicilina G en una concentración de 100 U/ml y la estreptomina en una concentración de 100 µg/ml.

Por ejemplo las células de mosquito generalmente tienen la capacidad de crecer en el medio de Mitsuhashi, el cual está constituido entre otras cosas de un medio basal formado por sales de fosfatos y cloruros, azúcares, penicilina, estreptomina, FBS, e hidrolizado de lactoalbúmina; pero también se han adaptado a crecer en un medio desarrollado para cultivos de células de

vertebrados como lo es el medio Eagle, con un 1% de aminoácidos no esenciales, 10% de FBS y 1% de hidrolizado de lactoalbúmina.

Las células aisladas a partir de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, también están adaptadas a un medio de cultivo para células de invertebrados como lo es el Dulbecco modificado, el cual se encuentra complementado con 10% de FBS, 0.5% de hidrolizado de lactoalbúmina y aminoácidos no esenciales.

c. cultivo de células de parásitos

La manipulación *in vitro* de células de parásitos, tienen un gran potencial y hasta la fecha se han realizado grandes esfuerzos a fin de poder establecer líneas continuas a partir de diferentes especies de parásitos, ya que muchos de ellos son causantes de importantes enfermedades humanas. Debido a la gran complejidad que representa el cultivo de células continuas, estos han sido poco realizados, y generalmente cuando se trata de cultivo de parásitos *in vitro*, estos se encuentran encaminados a establecer en cultivos a los parásitos en su forma larvaria o adulta. Con respecto a lo anterior existen múltiples reportes acerca del cultivo de cestodos (Taylor, Baker, 1987), que incluyen al género *Taenia sp*, dentro de las cuales se incluyen por ejemplo:

Taenia pisiformis, la cual ha sido cultivada *in vitro* obteniendo metacéstodos a partir oncosferas (Voge, 1978), y más recientemente cultivos de cisticercos a formas adultas (Osuna y Mascaro, 1982).

Taenia taeniformis ha sido mantenida *in vitro*, con el propósito de determinar la naturaleza de las sustancias que se liberan al medio de cultivo,

dentro de las que se encuentran, factores de crecimiento que estimulan el desarrollo de células gástricas de rata y de perro, e inhiben la producción de testosterona de las células de Leydig.

En el año de 1982 Morales y Canedo intentaron cultivar *in vitro* metacístodos de *Taenia solium* con el propósito de obtener el parásito en su forma adulta. El medio de cultivo utilizado fue, un medio mínimo esencial, el cual estaba complementado con glucosa, penicilina, estreptomycinina y gentamicina. Los cisticercos fueron seleccionados a partir de músculo de pierna de cerdo; la incubación se llevo a cabo a 37°C, en presencia de 5% de CO₂. El crecimiento máximo obtenido fue de 39 mm de longitud en 31 días, después del cual ya no hubo crecimiento.

Cisticercos racemosos de *T. solium*, obtenidos a partir de pacientes neurocisticercosos, fueron cultivados en medio RPMI-1640, complementado con el 10% de FBS por Bruckner en 1979, los cuales se mantuvieron por periodos de hasta 3 meses observandose un rearrreglo de la vesícula del cisticerco, llenándose esta nuevamente de fluido vesicular.

Los recientes avances en la parasitología molecular han permitido desarrollar líneas celulares provenientes de parásitos, tal es el caso de los cultivos de *Schistosoma mansoni*, basandose en técnicas de cultivo ya desarrolladas con anterioridad (Weller y Wheeldon, 1982; Newport y Weller, 1982; Clemens y Basch, 1989; Blair, *et al*, 1991), Hobbs y colaboradores establecieron protocolos para la obtención y mantenimiento de células a partir de formas juveniles de *S. mansoni*, permitiéndoles mantener a los cultivos por periodos de 6 meses o más, estos cultivos presentaban las características y

propiedades del organismo a partir del cual fueron originados, las células aisladas fueron de una gran variedad teniendo células en flama, células con formas alargadas las cuales tienen un fino flagelo, células en racimos, células con formas poligonales y células germinales, estas últimas con características que hacen fácil su identificación ya que presentan un gran núcleo y su citoplasma es rico en mitocondrias y ribosomas. Los cultivos a partir de *S. mansoni* son uno de los primeros reportes que se tienen en cuanto al desarrollo de cultivos celulares a partir de parásitos, de ahí su importancia y trascendencia en el conocimiento de la biología y fisiología de los parásitos.

Finalmente el poder contar con cultivos de células de parásitos por periodos de tiempo largos, provee de un sistema potencial en el cual se podrían realizar y evaluar numerosas manipulaciones *in vitro* como por ejemplo ensayos bioquímicos, inmunológicos, farmacológicos, biología molecular, como es la introducción de ADN exógeno seguido de una transfección, permitiéndonos esto conocer y ahondar más sobre la biología celular de los parásitos.

APENDICE II: ONCOGEN C-MYC

Los oncogenes virales son derivados de genes normales del hospedero que se encuentran involucrados en la proliferación celular, a estos últimos se les ha llamado proto-oncogenes (Roitt, 1991) o genes celulares. Existen genes específicos (oncogenes) que intervienen en fenómenos de neoplasia, tumores y proliferación celular (Watson, *et al*, 1987). Algunos genes celulares normales o proto-oncogenes (que sus productos colaboran en el funcionamiento normal de la célula) tienen el potencial de convertirse en oncogenes. Los oncogenes fueron aislados de genomas de ARN de virus tumorales, llamados virus transformantes agudos, los cuales transforman eficientemente células en cultivo y en animales. Estos virus son distintos a los virus transformantes lentos, los cuales no presentan oncogenes, son comunes en la naturaleza, pero no transforman células en cultivo y ocasionalmente causan tumores *in vivo*. Las células de los vertebrados normales contienen copias similares, aunque no idénticas, de los oncogenes que llevan los retrovirus agudos. Los oncogenes virales surgen como consecuencia de recombinaciones genéticas entre retrovirus lentos y oncogenes celulares (Kelly, 1986) que se encuentran en el genoma de animales vertebrados (Bishop, 1981). Los oncogenes celulares se encuentran presentes en especies muy separadas filogenéticamente, lo cual implica la gran importancia de su función en el metabolismo celular, así como los oncogenes virales están generalmente restringidos a una sola cepa de retrovirus que es aislada de una especie en particular, por lo que los retrovirus

preexistentes asimilan los proto-oncogenes por recombinación (Bishop, 1981). Muchas proteínas provenientes de los oncogenes pueden ser agrupadas en clases funcionales en base a sus efectos en el metabolismo celular. El término usado para oncogenes "nucleares" o "citoplasmáticos" en vez de referirse a la localización del gen, el término más bien se refiere al sitio de acción de los productos genómicos. Cuando el oncogen nuclear o citoplasmático se encuentra en el ADN de virus tumorales, es un oncogen viral, si el oncogen nuclear o citoplasmático se encuentra en un proto-oncogen, es un oncogen celular. Los oncogenes citoplasmáticos son generalmente débiles para la immortalización de células y fuertes en su habilidad para asegurar la promoción independiente de fibroblastos. Se ha encontrado que los oncogenes nucleares presentan una colaboración efectiva con oncogenes citoplasmáticos en transformaciones malignas de células normales. Hay sugerencias de que las actividades de los oncogenes nucleares y celulares son complementarias más que aditivas (Weinberg, 1985).

El gen *c-myc* es un miembro de una familia de genes, pero es el único miembro que se encuentra en el genoma de un retrovirus (Watson, *et al*, 1987). El gen *c-myc* se encuentra involucrado tanto en la proliferación como en la diferenciación de células eucariotas (Leyva, *et al*, 1993) y junto con los genes *c-jun* y *c-fos* codifican proteínas que son requeridas para iniciar la cascada de los eventos de inducción genética que llevan a la célula de fase G1 a fase S. Expresión constitutiva de estos genes pueden iniciar un ciclo celular continuo. La expresión del gen *c-myc* se encuentra apagada en células diferenciadas y retiradas del ciclo proliferativo y la expresión continua de *c-myc* se encuentra

fuertemente implicada en transformación celular (Hunter, 1991). Así, se sabe que el proto-oncogen *c-myc* se encuentra implicado en la proliferación celular, diferenciación y neoplasia, pero el mecanismo de la función a nivel molecular aún se desconoce. Por ello se ha tratado de describir la estructura de las proteínas Myc. En la región del carboxilo terminal se ha descubierto una región básica (b), un cierre de leucina (LZ) que consiste en 20 a 30 residuos anfipáticos α -hélice y un motivo hélice-asa-hélice (H-L-H). El dominio H-L-H consiste en dos sucesivas α hélices anfipáticas y juxtapuestas. Proteínas que contienen ambos dominios muestran en numerosos casos secuencias específicas de unión al ADN, regulando funciones tales como la duplicación, recombinación y transcripción (Landschulz, *et al*, 1988; Marcu, 1992). Las proteínas que incluyen una región bH-L-H son más de 60 en vertebrados, plantas, insectos y levaduras y muchas exhiben localización nuclear, unión a secuencias específicas a ADN y función de regulación de la transcripción (Blackwood y Eisenman, 1991). Las proteínas del cierre de leucina poseen una hélice estrecha de aminoácidos ácidos llamadas región básica (BR) (Marcu, 1992). Este cierre de leucina además de interactuar con un sitio específico al ADN, puede formar dímeros con diferentes polipéptidos que contienen este motivo (Landschulz, *et al*, 1988). Los dominios anfipáticos LZ o H-L-H son directamente requeridos para el juxtaposición estable de las dos regiones básicas (superficie de contacto) que facilitan la formación de un complejo proteínico homo o heterodímero con una secuencia específica de ADN. La familia de oncoproteínas Myc poseen una arquitectura quimérica (BR) H-L-H (LZ) (Marcu, 1992). Myc, las proteínas nucleares Jun y Fos y proteínas con

unión específica al ADN, muestran secuencias similares de los dominios de unión al ADN (Landschulz, *et al*, 1988).

No solamente se han identificado los sitios de unión de las proteínas al ADN, sino también proteínas acompañantes de las proteínas Myc, como sería la llamada Max (proteína "X asociada a myc") en el humano. Tanto Myc como Max forman un heterodímero estable que requieren los motivos H-L-H y ZL de cada proteína para unirse de manera eficiente. El complejo Myc-Max se une al ADN de manera secuencia-específica, con lo que regula funciones biológicas (Blackwood y Eisenman, 1991; Marcu, 1992). Cuando se forma el heterodímero Myc-Max, la célula se encontrará en proliferación celular, mientras que si se forma el heterodímero Max-Max se lleva a cabo el descanso o diferenciación celular. En el ratón, la proteína homóloga a Max es Myn, la formación del dímero estable Myc-Myn reconoce el sitio de unión al DNA con mayor afinidad que la proteína por si sola, lo cual es necesario para la acción de Myc *in vivo* (Prendergast, *et al*, 1991; Marcu, 1992).

La familia de genes myc tienen tres miembros bien definidos: c-myc, N-myc y L-myc, los cuales presentan las mismas características en la estructura y organización de los tres exones y los transcritos son muy similares. El primer exón de c-myc no es conservado, pero posee funciones regulatorias. El gen c-myc codifica para dos polipéptidos (Myc-1 y Myc-2) de 453 y 439 aminoácidos con un peso molecular de 68,000 y 65,000 respectivamente. Los polipéptidos Myc-1 y Myc-2 solamente difieren su amino terminal por 14 aminoácidos. Myc-1 es la proteína ligeramente más grande, su sitio de

iniciación es en el codón CUG cerca del extremo 3' terminal del primer exón del gen. El resto del primer exón es una secuencia muy larga no codificadora, la cual se encuentra muy conservada entre los genes myc humanos y murinos y presenta múltiples funciones regulatorias. La proteína más pequeña y abundante denominada Myc-2 comienza en el codón de iniciación AUG en el segundo exón y se extiende hasta el exón 3 (Marcu, 1992). Ambas proteínas difieren de tamaño por 14 o 15 aminoácidos N-terminales y la proteína Myc-1 puede regular negativamente la función de la proteína chica (Hann, *et al*, 1988). Existen evidencias de una tercera proteína Myc HEX1 codificada por el primer exón humano (Marcu, 1992). El tercer exón es posiblemente requerido para la actividad de unión de la proteína c-Myc al ADN (Sarid, *et al*, 1987). El gen c-myc presenta dos promotores principales (P1 y P2), en donde P2 es el promotor principal (75 al 90% del ARNs) mientras que P1 genera del 10 al 25 % de ellos. Existe un tercer promotor único en el gen humano, P0 el cual genera el 5%. Humanos, ratones y ratas contienen en el gen c-myc otro promotor menor, P3 que genera 5% (Marcu, 1992).

La proteína c-Myc presenta localización nuclear, capacidad de unión al ADN y una amplia distribución en diferentes tejidos y tipos celulares (Persson y Leder, 1984; Stone, *et al*, 1987; Eisenman, *et al*, 1985; Keath, *et al*, 1984; Schmid, *et al*, 1989) y por si sola es suficiente para la inducción de re-entrada al ciclo celular. Además se encuentra implicada en la inducción del programa de muerte celular (apoptosis), mientras que el gen supresor de tumores p53 es un regulador negativo que arresta a las células en la fase G1, así la expresión desregulada de c-myc y la pérdida de la función del tipo silvestre de la proteína

p53 se ha encontrado en muchos tipos de tumores (Hermeking y Eick, 1994). Otro regulador de la transcripción de c-myc *in vitro* es una proteína de unión al ADN llamada PUF, la cual se ha encontrado que tiene un 99% de homología al gen nm23-H2 humano que se ha descrito como un regulador negativo potente de la metástasis potencial de tumores, lo que sugiere que nm23-H2 tendría un papel directo en la activación y regulación a nivel transcripcional de la expresión del gen c-myc humano *in vitro*, lo cual es una nueva hipótesis para relacionar la sobre-expresión de c-myc y la metástasis de tumores (Postel, *et al*, 1993). La proteína con dedos de zinc Yin Yan-1 (YY1) es una proteína de unión al ADN que regula la transcripción de varios genes, pues dependiendo en el contexto en que se encuentre puede activar, reprimir o iniciar la transcripción, incluyendo a los oncogenes c-fos y c-myc. Por otro lado, YY1 forma un heterodímero con Myc, en donde este último funciona como un represor de YY1 activado (Shrivastava, *et al*, 1993).

Se han encontrado secuencias homólogas a c-myc en diferentes especies de invertebrados como el parásito protozoario *Entamoeba* (Leyva, *et al*, 1993), en *Drosophila* (Bishop, 1983; Shilo y Weinberg, 1981) y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Bishop, 1983), por lo que la proteína Myc se encuentra conservada evolutivamente. También la fosfoproteína nuclear Myc-2 se expresa temprano en el desarrollo (Persson y Leder, 1984), se produce a niveles bajos en células normales (Eisenman, *et al*, 1985), tiene una vida media corta y una actividad de unión no específica al ADN (Blackwood y Eisenman, 1991). El proto-oncogen celular myc es el homólogo al gen transformante del retrovirus agudo en aves MC29 (Corcoran, *et al*, 1984; Shilo y Weinberg,

1981; Dalla, *et al*, 1982; Vennstrom, *et al*, 1982) y juega un papel crítico en la génesis de linfoides B malignos en aves y mamíferos por un mecanismo de translocación cromosomal. Las alteraciones próximas o en el gen c-myc pueden ser por translocaciones cromosomales con el loci de inmunoglobulina, inserción retroviral producida por la inserción de un promotor retroviral fuerte en la vecindad de c-myc y por amplificación del ADN (Kelly, 1986; Persson y Leder, 1984; Keath, *et al*, 1984; Corcoran, *et al*, 1984). Las células que han sufrido una amplificación del ADN o que contienen una translocación cromosomal que involucran al gen c-myc, tienen niveles incrementados de la proteína Myc-2 (p65K^{cmyc}) comparado con células normales (Persson y Leder, 1984). Uno de los mecanismos más estudiados que conciernen a la desregulación de la expresión de c-myc es la provocada por translocación cromosomal, lo cual es muy común en plasmocitomas murinos y en el linfoma humano de Burkitt (Corcoran, *et al*, 1984) en el cual las translocaciones no ocurren al azar. El alelo myc (ubicado en el cromosoma 8) es translocado recíprocamente con un fragmento del loci de la cadena pesada o de la cadena ligera de inmunoglobulina, hacia arriba del primer exón del gen c-myc (Weinberg, 1985; Rabbitts, *et al*, 1983). Solo el alelo myc translocado se expresa en esta malignidad, mientras que el alelo normal permanece transcripcionalmente silencioso (por exclusión alélica), así las señales normales de autoregulación pueden perderse en el alelo translocado. Se ha propuesto que éste mecanismo de translocaciones no azarosas es debido a que el locus c-myc puede servir como sustrato para la maquinaria de recombinación específica de las células linfoides normalmente responsable de los reareglos de locus para la

cadena pesada de inmunoglobulina, durante la ontogenia de las células B. Esta re-organización genética rara vez priva al gen de su regulación normal de la transcripción (Promotor/enhancer) y las repone con secuencias de genes de inmunoglobulina (Weinberg, 1985). En el linfoma de Burkitt's, si se compara la secuencia de nucleótidos del gen murino normal de c-myc con el translocado, se muestra una secuencia completa idéntica, excepto en la posición 235, en donde hay diferentes nucleótidos. El significado de ésta sola diferencia se desconoce. La falta de diferencias soporta la idea de que el producto del gen c-myc es cualitativamente normal en los plasmocitomas. Los cambios cuantitativos en la expresión de c-myc pueden ser de la ruptura de las secuencias reguladoras y del promotor como resultado de la translocación o de la translocación de regiones con gran actividad transcripcional, lo cual implica una regulación a nivel transcripcional del control de la expresión de c-myc. También puede ser que la translocación del alelo c-myc en el linfoma de Burkitt's lo haga más susceptible a mutaciones somáticas próximas al gen de inmunoglobulina (Lawrence, *et al*, 1984). La translocación rara vez quita el exón inicial del gen, pero si esto sucede, el ARN mensajero resultante se encontrará reestructurado (Weinberg, 1985). También se propone que sería interesante saber como actúan los genes RAG1 y RAG2 (propuestos como genes activadores de la recombinación) para el ensamblaje del gen de la cadena variable de inmunoglobulina y que papel juegan en los reareglos de c-myc (Marcu, 1992). Por otra parte puede suceder que el gen c-myc se encuentre desregulado por la acción de un retrovirus el cual se integra muy próximo a

éste, dando un segmento de promotor-enhancer el cual anula la regulación normal (Weinberg, 1985).

El gen *c-myc* se encuentra en la categoría de los oncogenes inmortalizadores como *Ela*, *p53* y la proteína grande del virus del simio 40 (SV40), los cuales pueden transformar parcialmente células primarias en cultivo pero no inducen un fenotipo tumorigénico. Una expresión anormal de *myc* puede alterar la regulación de genes celulares, lo cual implica que la célula sea más susceptible a la transformación hacia un fenotipo maligno. La acción de otro oncogen o la pérdida de un gen supresor tumoral puede promover o acelerar la tumorigénesis. Se han descubierto genes supresores tumorales, como el gen de la susceptibilidad al retinoblastoma (*pRB*) lo cual sugiere la presencia de mecanismos relacionados a estos genes supresores (Marcu, 1992). Existen evidencias de que la expresión de *RB* actúa en *G1* y previene la progresión del ciclo celular y se encuentra regulada su función por *TGF-B*. *RB* puede actuar por unión y secuestro de los factores de transcripción necesarios para la progresión de *G1* a *S* y reprimir de esta forma la inducción del gen *c-myc* (Hunter, 1991). De esta manera se ha propuesto que los productos de estos genes supresores pueden interactuar directa o indirectamente con genes celulares normales involucrados en el crecimiento y/o proliferación. Los genes supresores podrían regular la actividad de estos genes asociados a resistencia. La pérdida de la función de estos genes supresores tumorales propuestos a través de una gran deleción o algunas otras mutaciones pueden perturbar la autoregulación normal de estos genes asociados al ciclo celular, como *c-myc*, llevándolos a una expresión inapropiada o a una posible progresión tumoral

(Marcu, 1992). El oncogen c-myc no produce un foco de formación en los primeros pases en las células de FR3T3 (10 generaciones) pero puede dar lugar a fenotipo tumorigénico en pases tardíos (60 generaciones), lo cual indica que es necesario un segundo evento, el cual ocurre en cultivos prolongados *in vitro* (Marcu, 1992). La cooperación de c-myc con otros oncogenes es consistente con la idea de que c-myc solo no causa malignidad, pero es el primer paso para la progresión a un estado maligno, además estudios han indicado una regulación potencial de la proteína Myc a otros genes, la sobreexpresión y/o la expresión desregulada de c-myc se encuentran correlacionados con una expresión baja de una gran variedad de diferentes genes celulares (Marcu, 1992). El gen c-myc junto con el oncogen Ela son los únicos ejemplos de oncogenes que codifican proteínas nucleares, las cuales pueden tener por un lado, un papel potencial en la transcripción y postranscripción de otros genes celulares y en la duplicación del ADN, pues los polipéptidos Myc tienen un efecto significativo en el crecimiento y diferenciación de una gran variedad de diversos tipos de células y si se expresan inapropiadamente, la proteína normal puede contribuir a la neoplasia (Marcu, 1992) y por el otro, como agentes de immortalización celular (Weinberg, 1985). Además presentan una asociación a componentes nucleares estructurales, idea que se refuerza al observar proteínas Myc redistribuidas durante la mitosis, al mismo tiempo que otros componentes estructurales nucleares también se dispersan (Eisenman, *et al*, 1985) durante la fase S (Marcu, 1992) y presentan una gran importancia en los linfocitos y otras células para el paso del estado de reposo Go al ciclo celular (Roitt, 1991). Una expresión elevada de c-myc se encuentra asociado con una amplia variedad de

enfermedades malignas de diferentes tipos celulares. Tanto el mensajero como la proteína específica del gen c-myc tienen un promedio de vida relativamente corto (Kelly, 1986).

Los oncogenes celulares (ej. myc, jun, fos) son rápidamente inducidos cuando las células en reposo son tratadas con mitógenos (Hunter, 1991). La forma en que myc induce el establecimiento de líneas celulares de fibroblasto ha sido muy estudiado, se ha demostrado la activación de c-myc en respuesta al factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y otras sustancias que mimetizan los efectos del PDGF en fibroblastos incluidos en el suero (el factor de crecimiento fibroblástico y el promotor de tumores 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetato o TPA). La inducción de c-myc por una estimulación mitogénica no es única en células fibroblásticas (Marcu, 1992). En otros trabajos se ha amplificado la expresión de c-myc en sublíneas celulares de BALB/c-3T3 por la adición de PDGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o insulina en el medio de cultivo (Armelin, *et al*, 1984). Niveles abundantes de ARNm c-myc puede reemplazar los requerimientos de PDGF al medio de cultivo mediante la respuesta de crecimiento de la célula. Las células que expresan c-myc y c-myb pueden crecer en medio de cultivo libre de suero en ausencia de factores de crecimiento exógenos (Armelin, *et al*, 1984; Hunter, 1991). El ARN mensajero (ARNm) de c-myc también se puede inducir por agentes que inician la primera fase de la respuesta proliferativa en linfocitos (Concanavalina A y lipopolisacáridos, mitógenos específicos para células B o mitógenos linfocitario), además los niveles de ARNm de c-myc se encuentran modulados en células primarias por factores de crecimiento como EGF e interleucina 2

(IL-2) (Kelly, 1986). La pérdida en la expresión de c-myc ocurre en las células que se encuentran en estados terminales de diferenciación. Alternativamente, decrementos importantes en la síntesis de ADN puede estar asociada con un supresión de c-myc.

IX. REFERENCIAS

Alexander, J., Stimson, W.H. (1988). Sex hormones and course of parasitic infection. *Parasitology Today*, **4**: 189-193.

Aluja, A., Escobar, A.; Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J., Larralde, C., Madrazo, F., Velázquez, V., Willms, K. (1986). Cisticercosis. Fondo de Cultura Económica. México D.F.

Allegra, J.C y Lippman M.E. (1978). Growth of human breast cancer cell line in serum-free hormone-supplemented medium. *Cancer Res.* **38**: 3823-3829.

Armelin, A., Armelin, M.C.S., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B.H., Sfiles, C.D. (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived grow factor. *Nature*, **310**: 655-660.

Balasubramaniam., KanaKa., Ramamurhi. (1971). Cerebral cysticercosis in India. *Int. Surg.* **56**: 172.

Barnes, D. (1987). Serum-Free Animal cell culture. *Biotechniques*. vol. **5**(6): 534-541.

Bayne, C.J., Menino, S.J., Hobbs, D.J., Barnes, D.W. (1994). In vitro cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*. **80**: 29-35.

Bird, A., Heinz, J., Kintkworth, G. (1962). Convulsive disorder in Bantú mine workers. *Epilepsia*. **3**: 1975.

Bishop J.M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. *Annual Reviews of Biochemistry*. **52**: 301-354.

Blair, K.L; Day, T.A; Lewis, M.C; Bennett, J.L; Pax, R.A. (1991). Studies on muscle cells isolated from *Schistosoma mansoni*: a Ca^{2+} dependent K^+ channel. *Parasitology*. **102**: 251-258.

Bruckner, D.A. (1979). In vitro growth of racemose cysticercus of *Taenia solium* from human brain. *Journal of Parasitology* **65**, 450.

Clemens, L.E y Basch, P. F. (1989 a). *Schistosoma mansoni*: Insulin independence. *Experimental Parasitology*. **68**: 223-229.

Clemens, L.E y Basch, P. F. (1989 b). *Schistosoma mansoni*: Effect of transferrin and growth factors on development schistosomulae in vitro. *Journal of parasitology*. **75**: 417-421.

Coker-Vann, M.R., Subianto, D.B., Brown, P.C., Diwan, A.R., Desowitz, R., Garruto, R.M., Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C. (1981). ELISA antibodies to cysticercus of *Taenia solium* in human populations in New Guinea, Oceania, and Southeast Asia. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Hygiene*. **12**: 499.

Corcoran, C.M., Adam, J.M., Ashley, R.D., Cory, S. (1984). Murine T lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion. *Cell*. **37**: 113-122.

Dorais, F. J. and Esch G. W. (1969). Growth rate date of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology* **29**: 395.

Drexler, H.G., Gignac, S.M., Pettit, G.R., Hoffbrand, A.V. (1990). Synergistic action of calcium ionophore A 23187 and protein Kinase C activator bryostatin 1 on human B cell activation and proliferation. *European Journal of immunology*. **20** : 119-127.

Eisenman, R.N., Tachibana, C.Y., Abram, H.D., Hann, S.R. (1985). v-myc and c-myc- encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Molecular and cellular Biology*. **Jan**: 114-126.

Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltran, F. (1982). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. 700 pp.

Fragoso, G., *et al*; (1995). Manuscrito enviado para su publicación.

Freeman, R.S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder,1800), (Rudolphi,1810). *Canadian Journal of Zoology*. 40: 969-990.

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

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

Gajdusek, D.C. (1978). Introduction of *Taenia solium* in to west New Guinea with a note on an epidemic of burns from cysticercus epilepsy in the Ekari people of the Wissel Lakes area. *Papua New Guinea Medicine Journal*. 21: 329.

Gemmel, S.F., Lawson, R.J. (1982). Ovin Cysticercosis: An epidemiological model for the cysticercosis. 1. The free-living egg phase. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, N.Y. 87-98.

Grossman, C. (1985). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrinology Review*. 5(3): 435-454.

Hammond, S; Ham, R; Stampfer, M. (1984). Serum-free growth of human mammary epithelial cells: Rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 5435-5439.

Hink, F.W. (1979). Cell lines from invertebrates. *Methods in Enzimology*. 58: 450-481.

Hobbs, D.J., Fryer, S.E., Duimstra, J.R., Hedstrom, O.R., Brodie, A.E., Collodi, P.A., Menino, J.S., Bayne, C.J., Barnes, D.W. (1993). Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. *Journal Parasitology* 79 (6): 913-921.

Hoshijima, M., Kawahara, Y., Takai, Y., (1988). Negative actions of protein kinase C in the regulation of cell proliferation. *Gunma Symposia on Endocrinology*. 25: 51-68.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Huerta, L., Terrazas, I., Sciutto, E., Larralde, C. (1992). Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal Parasitology*. 78(3): 471-476.

Kelly, K.(1986). The regulation and expresion of c-myc in normal and malignant cells. *Annual Review of Immunology*.4: 317-338.

Klein, J. (1990). Immunology. Blackwell Scientific Publications. 508.

Laclette, J.P., Merchant, M.T., Willms, K., Cañedo, L. (1981). Paracrystalline Bundles of large tubules, induced *in vitro* by mebendazole in *Cysticercus cellulosae*. *Parasitology* 83: 513-518.

Larralde, C., Sciutto, E., Huerta, L., Terrazas, I., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Lomeli, C., Tapia, R.M., Montoya, M.L., Diaz., Govezensky, T. (1989). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 57(2): 131-134.

Larralde, C., Montoya, M., Sciutto, E., Diaz, M., Govezenky, T., Coltorti, E. (1989). Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40 (3):282-290.

Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutierrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Sepúlveda, J. (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México*. **34**: 197-210.

Leyva, L., Gariglio, P., Rangel, L.M., Valdez, J., Ayala, P., Orozco, E. (1993). Expression of sequences related to c-myc in Entamoeba. *Parasitology Research*. **79**: 153-159.

Liu Lin, G., Ellsaesser, C. F., Clem, W.L., Miller, N.W., (1992). Phorbol ester/calcium ionophore activate fish leukocytes and induce long-term cultures. *Developmental and Comparative Immunology*. **16**: 153-163.

Manoutcharian, K., Larralde, C., Aluja, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Govezensky, T., Baca, M., Siutto, E. (1995). Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis. In: *Vaccine 95*. Cold Spring Harbor.

Marcu, K.B., Bossone, S.A., Patel, A. (1992). myc function and regulation. *Annual Review of biochemistry*. **61**: 809-860.

Morales, E y Canedo, L. (1982). *In vitro* study of the early transition of *Taenia solium* from metacestode to adult. In Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltran, F. eds.), pp 495-498. Academic Press, New York.

Newport, G.R y Weller, T.H. (1982). Deposition and maturation off eggs of *Schistosoma mansoni* in vitro: importance of fatty acids in serum-free media. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **31**: 349-357.

Old, R.W., Primrose, S.B. (1984). Principios de manipulación genética. Acribia, España. 375 pp.

Osuna-Carrillo, A; y Mascaró-Lazcano, M.C. (1982). The *in vitro* cultivation of *Taenia pisiformis* to sexually mature adults. *Zeitschrift für parasitenkunde*. **67**: 67-71.

Persson, H., Henninghausen, L., Taub, R., Degradó, W., Leder, P. (1984). Antibodies to human c-myc oncogene product: evidence of an evolutionarily conserved protein induced during cell proliferation. *Science*. **225**: 687-693.

QIAGEN genomic DNA for cell culture DNA kits.

Ramos-Kuri, M., Montoya, M.R., Padilla, A., Govezenky, T., Diaz, M., Sciutto, E., Sotelo, J., Larralde, C. (1992). Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* **49**: 633-636.

Reddington, J.J., Stewart, G.L., Kramar, W.G., Kramar, M. (1981). The effects of host sex and hormones on *Trichinella spiralis* in the mouse. *Journal of parasitology.* **67**: 548-555.

Roitt, I. (1991). Essential immunology. 7th ed. Blackwell Scientific publications. 188-190.

Schuurus, A.H., Verheul, H.A. (1990). Effects of gender and sex steroids on the immune response. *Journal of steroids Biochemistry.* **35** (2): 157-172.

Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G., Larralde, C. (1990). Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology.* **12**: 687-696.

Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research.* **77**: 243-246.

Shilo, B., Weinberg, R. (1981). DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**(11): 6789-6792.

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

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Molecular Biology.* **98**: 503- 517.

Taylor, A., Baker, J. (1987). *In vitro* methods for parasite cultivation. Academic Press U.K.

Trunch, A., Albert, F., Golstein, P., Schmitt-Verhulst (1985). Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature.* **313**: 318-320.

Voge, M. (1978). Cestoda. in; *Methods of cultivating parasites in vitro* (A.E.R. Taylor and J. R. Baker, eds) pp 193-225. Academic Press, London.

Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W. (1987). *Molecular Biology of the gene.* Benjamin Cummings. U.S.A. vol. II: 1163 pp.

Weinberg, R.A. (1985). The action of oncogenes in cytoplasm and nucleus. *Science*. **230**: 770-776.

Weller, T. H., Wheeldon, S. K. (1982). The cultivation in vitro of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*. **31** (2): 335-34.