



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO GENOTOXICO DE ONCOSFERAS DE
Taenia solium EN LINFOCITOS DE CERDOS
INMUNES Y NO INMUNES”

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
FLOR MARIA MARTINEZ ROMERO

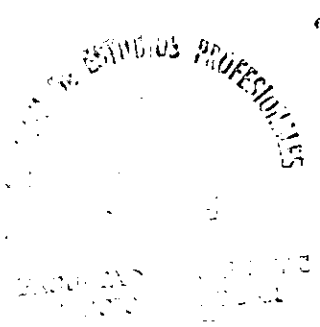


FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

MEXICO, D. F.

ASESOR DE TESIS: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

2000





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

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios de Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Efecto genotóxico de oncosferas de *Taenia solium* en Linfocitos de cerdos
inmunes y no inmunes"

realizado por: Flor Maria Martinez Romero

Con número de cuenta 9354999-2, **pasante de la carrera de** Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

A t e n t a m e n t e

Director de tesis
Propietario

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

M. en C. Agustín Plancarte Crespo

Suplente

Dra. Patricia Ramos Morales

Suplente

Dr. Guillermo Salgado Maldonado

FACULTAD DE CIENCIAS
Consejo Departamental de Biología U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA**

ABREVIATURAS

NC	Neurocisticercosis
MN	Micronúcleos
BN	Células binucleadas
PHA	Fitohemaglutinina
PN	Protrusiones nucleares
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IM	Índice mitótico
IMc	Índice de marcaje
BrdU	5-Bromo-2'-desoxiuridina
RPMI 1640	Medio de cultivo con rojo de Fenol
No. bandas	Número de bandas
Frec. Poli 1	Frecuencia de células poliploides en primera división
Frec. Poli 2	Frecuencia de células poliploides en segunda división
Frec. Poli 3	Frecuencia de células poliploides en tercera división
Ag. Inmuno.	Agente inmunógeno
Carga par.	Carga parasitaria
VW2-1-T.s	Antígeno B recombinante de <i>T. solium</i>
TCA-2-MBP	Proteína recombinante de <i>T. cracisseps</i>
ARO-T.o	Antígeno recombinante de oncosferas de <i>T. ovis</i>
ONC. T.s	Oncosferas de <i>T. solium</i>
AIF	Adyuvante incompleto de Freund

Este Trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Regina Dorinda Montero Montoya.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Regina Dorinda Montero Montoya por sus enseñanzas, sugerencias e interés mostrado durante el desarrollo de este trabajo.

A mis padres
Por su apoyo y comprensión

A mi hermana María del Carmen
Por sus sabios consejos y por su apoyo incondicional

A mis hermanas
Por estar siempre conmigo en los momentos difíciles

A Francisco Herrera
Porque juntos emprendimos este proyecto que además de dejarnos una satisfacción personal nos dejó una maravillosa amistad.

A Luis Serrano
Por enseñarme todas las metodologías y por su invaluable ayuda en el manejo de los animales.

A Agustín Plancarte por compartir su amistad conmigo y por sus sabios consejos

A mis compañeros de Laboratorio
Paty Guzmán, Patricia Ramírez, Martha Luna y Sra. Delfina.

A mis amigos
María Antonieta Reyes, Cecilia Hirorta, Joel Martínez, Jose Vazquez, Salomón Martínez, Julio César Carrero, Ivett Medina, Alejandra Hernandez, Erika Navarrete, Jose Juan Flores, Lazaro, Jorge Limón, Quitze López, Emilia de la Serna, Bernado Solís, María Petra Muñoz, David Barrera, Norma Galicia, Maricruz Anaya, María Eugenia Salgado, Patricia Alfaro, Yayoi Segura y Valentin Ramirez.

INDICE GENERAL	PAGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Genotoxicidad	2
Biomarcadores	
Intercambio de cromátidas hermanas	2
Aneuploidía	5
Micronúcleos y otras alteraciones nucleares	7
Protrusiones nucleares	8
Apoptosis como indicador de daño al DNA	9
Enfermedades parasitarias y su asociación con cáncer	10
Cisticercosis y cáncer	10
Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	11
Genotoxicidad causada por cisticercosis	13
Mecanismos que explican la relación con cáncer	13
Inflamación	14
Inducción de enzimas del metabolismo	15
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	15
HIPOTESIS	16
OBJETIVOS	17
DISEÑO EXPERIMENTAL	18
MATERIAL Y METODO	19
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	24

CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27
TABLAS	31
GRÁFICAS	35
LAMINAS	36
FIGURAS	39

RESUMEN

Se ha visto que la infección por el cisticerco *Taenia solium* en cerdos induce daño genotóxico en la forma de (ICH) intercambio de cromátidas hermanas en cerdos con una infección inducida. Con el propósito de ampliar el conocimiento acerca del daño genotóxico que induce el parásito en cultivos de sangre entera, el presente estudio pretende establecer si este daño es debido a la carga parasitaria o a la respuesta inmunológica en una infección inducida. Se trabajó con varios grupos de cerdos que fueron inmunizados con antígenos de *Taenia solium*; una vez inmunizados en infectados los grupos de cerdos, se les tomó muestras de sangre vía intrayugular, en forma estéril y se hicieron cultivos de 46 y 70 hrs, en medio RPMI-1640 utilizando fitohemaglutinina como agente mitogénico y bromodesoxiuridina como marcador de proliferación.

Los resultados muestran que hay daño genotóxico en forma de ICH, células poliploides, micronúcleos (MN), protrusiones nucleares (PN) y células binucleadas (BN). El daño encontrado no correlacionó con la carga parasitaria ni con la respuesta inmunológica. Pero sí con la cantidad de parásitos vivos.

EFFECTO GENOTOXICO DE ONCOSFERAS DE *Taenia solium* EN LINFOCITOS DE CERDOS INMUNES Y NO INMUNES

INTRODUCCIÓN:

Genotoxicidad

Se ha observado que algunos agentes químicos en el medio ambiente causan enfermedades agudas y crónicas. Las enfermedades crónicas son de especial interés por sus posibles efectos en el DNA ya que afectan por mayor tiempo al individuo, deteriorando su calidad de vida.

Una estrategia que pretende lograr la detención y probable prevención de algunas de estas enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, es buscar en humanos efectos tóxicos causados por la exposición a agentes xenobióticos, que puedan utilizarse como señal de alerta. Al conjunto de este tipo de efectos tóxicos se les denomina biomarcadores, y pueden ser de exposición, efecto y susceptibilidad. Los primeros miden la concentración del xenobiótico o sus metabolitos en los líquidos biológicos. Los segundos son los cambios fisiológicos, bioquímicos o genéticos que ocurren en las células o los tejidos, mientras que los biomarcadores de susceptibilidad implican una interacción especial de los xenobióticos con características genéticas particulares del individuo, o con su situación ambiental

Entre los marcadores de efecto los hay de diversos tipos: inmunotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad renal, hepática, etc. Entre ellos nos interesa la genotoxicidad, que es el daño que recibe el núcleo celular, los cromosomas o el DNA como resultado de la exposición del individuo a agentes xenobióticos. Los biomarcadores de efecto genotóxico en humanos o en mamíferos vivos más utilizados para monitoreo son: las aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas, los micronúcleos y las mutaciones en loci específicos.

Los xenobióticos, por otra parte, no sólo son sustancias químicas industriales, sino que pueden ser también agentes naturales contenidos en los alimentos que ingerimos, o bien, agentes vivos, tales como virus, bacterias, levaduras y parásitos.

BIOMARCADORES

a) Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

El intercambio de cromátidas hermanas es un fenómeno celular evidenciado en las células tratadas con análogos de bases del DNA (Perry and Wolff 1974). Diversas hipótesis se han postulado para explicar su función celular y el proceso molecular que los origina.

Taylor (1958) propuso que los ICH se producen por la recombinación de segmentos del DNA entre las dos cromátidas de un cromosoma. Comprende las dos cadenas complementarias de polinucleótidos que forman la molécula de DNA de cada cromátida y sólo se lleva a cabo entre

aquellas cadenas que muestran la misma polaridad.

Holliday (1964) propuso que una recombinación de segmentos entre cadenas sencillas de polinucleótidos con la misma polaridad probablemente forma parte de un mecanismo de reparación post-replicativo que actúa después de un rompimiento del DNA.

Para que se inicie el proceso de recombinación es suficiente que exista un extremo libre resultante de un rompimiento de una sola cadena del DNA sustituido por Bromodesoxiuridina (BrdU), que se puede aparear o unir con la secuencia complementaria de una región parcialmente desnaturalizada de la doble hélice del DNA (que no ha sido rota) correspondiente a la cromátida hermana. Este primer paso también puede llevarse a cabo presentándose dos rompimientos; para que se inicie la formación de un intercambio uno de ellos va estar dado por la cadena naciente del DNA y la separación temporal de las histonas que facilitan el proceso, durante la replicación de DNA.

La formación de intercambios podría ocurrir durante el proceso de reparación del DNA y sólo funcionaría en etapas post-replicativas, de manera similar al modelo de Holliday (1964) el cual explica los entrecruzamientos. Este modelo requiere de dos rupturas, una en la doble cadena de cada cromátida hermana y del desplazamiento del extremo libre de una de ellas hasta el punto de ruptura permitiendo la interacción de las dos moléculas de DNA (Fig. 1).

De los últimos modelos que se propusieron para explicar la formación de intercambios de cromátidas hermanas está el de Painter (1980), el cual se basa en la idea de que los ICH se presentan con más frecuencia en los sitios de unión entre grupos de replicones (Fig 2). De acuerdo con este modelo cuando el DNA es afectado por algún agente químico o físico que produce inhibición en la elongación de la cadena de polinucleótidos, dicho daño provoca retardo en la duplicación de ciertos agrupamientos de replicones. Este hecho finalmente lleva a la existencia de regiones del DNA no replicadas adyacentes a regiones replicadas en donde se originan rompimientos de doble banda por acción de la topoisomerasa II (Jannink G y cols 1996). Los ICH ocurrirían durante la replicación del DNA, de acuerdo con este modelo.

Hasta ahora no se conoce muy bien el significado biológico de los ICHs, pero lo que sí se sabe es que cuando hay un aumento de este biomarcador en las células es indicador de que en el material genético ha ocurrido una actividad de recombinación o de reparación, lo cual también puede constituir una señal de prevención de que un organismo ha estado en contacto con un agente genotóxico.



Cadenas de DNA apareadas homólogas



Intercambio de cadena sencilla entre cadena del mismo sentido



Plegamiento y rotación de las 2 cadenas en la zona de recombinación

Estructura de Holliday



Nuevo plegamiento y rotación en sentido perpendicular al 1º

La estructura inestable sufre un corte



Separación de las cadenas y recombinación de doble banda

Figura 1. Modelo propuesto por Holliday 1964

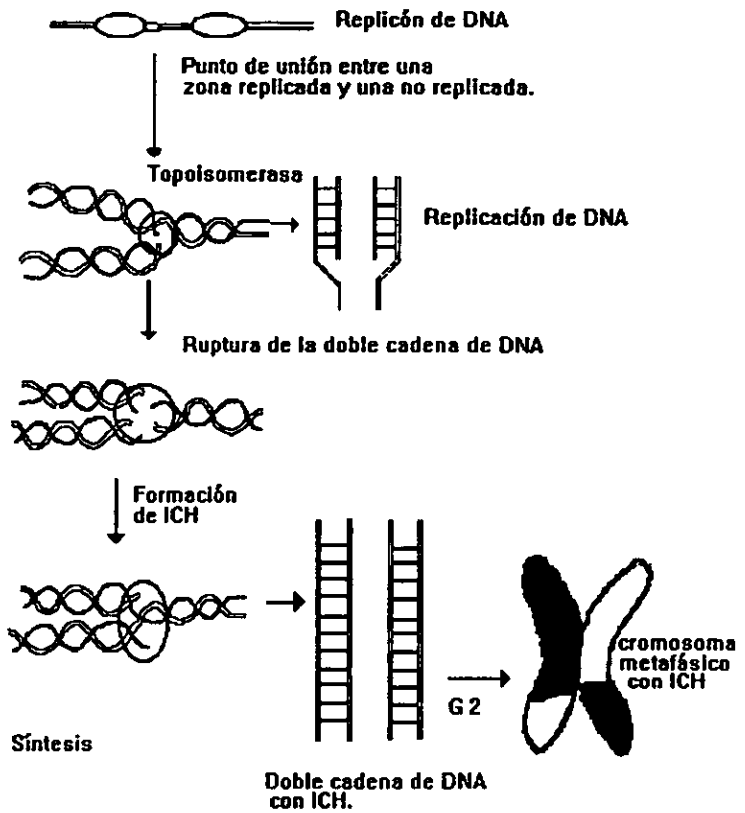


Fig 2 Intercambio de Cromátidas Hermanas propuesto por Painter 1980

b) Aneuploidía

Fenómeno en que se produce un incremento o disminución en el número de cromosomas en cada célula, lo cual puede ser entendido en términos de anomalías cromosómicas (Epstein 1986). Esto resulta de un mal funcionamiento en el ciclo celular produciendo aberraciones numéricas y estructurales: las primeras, son debidas a una mala segregación cromosómica y tienen como consecuencia que se altere el número de cromosomas que normalmente se presentan en la célula y las

segundas, son ocasionadas por errores en la reparación del DNA incluyendo deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones (Kirsch RI 1993) que pueden alterar el número de copias de uno o varios genes.

La aneuploidía puede alterar relaciones específicas, empezando con el ciclo celular, a través de posibles cambios en la concentración de enzimas, proteínas de transporte, de moléculas regulatorias y receptores de superficie, que producen efectos a nivel del desarrollo y función de los organismos (Epstein 1986). Los rearrreglos en la información genética pueden ocurrir espontáneamente o ser inducidos por un agente físico, químico o por alteraciones en los procesos de división cromosómica y segregación (Parry y cols 1996). Esto ocurre naturalmente durante el ciclo de vida y parte del desarrollo normal del organismo. Sin embargo, por el análisis de numerosas líneas tumorales de individuos, es posible inferir que las aberraciones citogenéticas se asocian con ciertos tumores. Se ha propuesto que una considerable proporción en los casos de malignidad está asociada con aneuploidía y esto es de interés porque se relaciona con la pérdida de heterocigocidad en el proceso carcinogénico (Epstein 1986).

La pérdida de la heterocigocidad en un loci específico no está restringida al cáncer de tipo familiar, ya que ha podido establecerse sistemáticamente en loci específicos de 11 diferentes cromosomas: 1p,2,3p,5p,10,11p,11q,13q,17p,18q,22 (Murray and Hunt 1993). Se considera que el evento genético producido por la pérdida de un cromosoma provee un determinante crítico en el desarrollo de tumores malignos. Esto es cierto también en el caso de p53, un gen supresor de tumor caracterizado por un estricto control, en donde la pérdida o inactivación de este gen resulta en una deficiencia en el control del ciclo celular (Murray and Hunt 1993).

La exposición a sustancias químicas puede producir un incremento en aneuploidía en poblaciones humanas, induciendo aberraciones numéricas en células somáticas y en células germinales. Se proponen cuatro mecanismos por los cuales ocurre la aneuploidía (Ford y cols 1988; Dellarco y cols 1985):

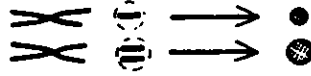
- 1) Anormalidades en el huso mitótico por alteración de los microtúbulos.
- 2) Descondensación del centrómero que lleva a rezago cromosómico en la anafase.
- 3) Alteración en la membrana celular dañando el transporte de iones y enzimas necesarias para la división.
- 4) Alteración en el cinetocoro, que evita que el cromosoma se una al huso mitótico y queda rezagado.

Ambos fenómenos, cáncer y aneuploidía, causan alteración en la regulación celular y aberraciones cromosómicas; Las técnicas de bandeo y el pintado de cromosomas son algunas pruebas que nos pueden ayudar para confirmar o descartar si existe asociación entre cáncer y aneuploidía.

de técnicas de bandeo o de pintado de cromosomas. El cáncer es resultado de una disrupción en la cascada de señales celulares que constituyen los controles normales de proliferación, y que resultan de acumulación de mutaciones en genes específicos, las cuales cambian la cantidad o actividad del producto proteínico (Weinberg A R 1996).

Origen de Micronúcleos

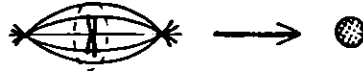
1. Fragmento acéntrico Micronúcleo



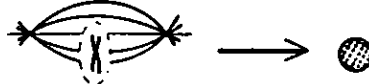
2. Cromosomas multicéntricos



3. Daño al cinetocoro



4. Daño al huso



Figuras que parecen micronúcleos

5. Apoptosis



6. Protrusiones nucleares

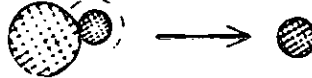


Figura 3 Modelo de micronúcleos propuesto por Müller y Streffer 1994

c) Micronúcleos y otras alteraciones nucleares

Los micronúcleos (MN) se originan durante la mitosis y pueden observarse desde la interfase temprana. Müller y Streffer (1994) proponen 4 diferentes mecanismos para la formación de MN (Figura 3) que involucran clastogenicidad o rompimiento del DNA, y/o aneuploidia.

1.-Fragmentos acéntricos. Son fragmentos que al carecer de un centrómero y su cinetocoro no pueden unirse a las fibras del huso mitótico, lo que impide que se integren al núcleo principal y forman MN. Estos fragmentos se originan por clastogenicidad

2.-Cromosomas multicéntricos. Son cromosomas conectados en varios puntos con las fibras del huso, que se desplazan hacia polos opuestos, lo que impide el movimiento de las cromátidas hacia el núcleo principal, resultando en que quedan fuera de él. Estos cromosomas se originaron por rompimientos y

reunión de fragmentos.

3.- Daño al cinetocoro. El cinetocoro es requerido para que las cromátidas se unan a las fibras del huso y así puedan guiarse a los polos opuestos de las células hijas. Cuando el cinetocoro sufre un daño, la cromátida no puede integrarse dentro de su correspondiente núcleo. Este es un daño de tipo aneuploidogénico.

4.- Daño al aparato mitótico. El daño en el aparato mitótico impide que se lleve a cabo la distribución normal de los cromosomas hacia los nuevos núcleos. Estudios realizados con colcemid y colchicina demuestran que los MN generados contienen uno o más cinetocoros lo que sugiere que contienen cromosomas completos. Esto también es un daño aneuploidogénico.

La evaluación de la frecuencia de MN es una herramienta ampliamente utilizada en estudios de genotoxicidad para cuantificar la exposición a xenobióticos y a radiación *in vitro* o *in vivo*. Los MN pueden observarse en gran variedad de tipos celulares y por ello existen muchas variaciones en el ensayo. Comparado con otras pruebas citogenéticas, la evaluación de la frecuencia de MN ofrece varias ventajas: es muy rápida, fácil y se puede combinar con otras metodologías para estudiar daño en el DNA y no requiere de células en metafase, aunque para observarlos se requiere, de acuerdo con los mecanismos de formación presupuestos, que las células se dividan, pero no necesariamente en el cultivo. Las células más frecuentemente analizadas son las del sistema hematopoyético como los linfocitos de sangre periférica y los eritrocitos. Estas células son de fácil obtención en humanos y animales de laboratorio. En años recientes, el uso de células de descamación de mucosas ha cobrado auge en los estudios de monitoreo.

Protrusiones nucleares

Cuando se analizan las frecuencias de MN frecuentemente se observa otra alteración nuclear que Tolbert y cols. (1992) llamaron "Broken-eggs", los cuales se observan como protrusiones de cromatina fuera del núcleo.

La forma de estas protrusiones es esférica y son muy semejantes en apariencia a los MN con la diferencia de que es material unido al núcleo. Se ha especulado si estas formaciones posteriormente dan lugar a la formación de MN y existe sólo un estudio que sugiere que sí, en donde las células de fibroblastos expuestas a radiación presentan pequeños botones de cromatina que después son separados (Wendt 1959). Se ha dicho que el mecanismo de formación de estos MN sería diferente de los que se han aceptado, y fueron mencionados en el apartado anterior, principalmente porque no requeriría la división de las células para que se formaran. No obstante, estas estructuras se observan en células que se dividieron y podrían ser el resultado de una incompleta integración de ese material en el núcleo. Si posteriormente son separadas por acción de endonucleasas y como resultado se forma el MN, el mecanismo no estaría completamente desligado de la proliferación. Además de que se han observado en células marcadas al momento de la división, se incrementa su frecuencia en presencia de agentes clastogénicos y de agentes aneuploidogénicos, lo cual apoya más la propuesta de que se forman como resultado de una acción genotóxica y que están en relación con la formación de MN (Montero y cols 1997).

Apoptosis como indicador de daño al DNA

La muerte celular fisiológica o apoptosis es esencial para el desarrollo apropiado y función de los organismos multicelulares pues las células dañadas o el exceso de células pueden alterar la homeostasis de un tejido en su desarrollo y maduración (Tomei y Cope 1994).

Fases de la apoptosis (Mastrangelo AJ y Betenbaugh JM 1998).

- 1) **Iniciación:** Cuando la célula se expone a una variedad de agentes químicos, físicos y biológicos que dañan sus macromoléculas y estimulan una serie de mensajes.
- 2) **Señalamiento:** Incluye una serie de mecanismos celulares que alteran la morfología del núcleo, citoplasma, organelos y membrana plasmática.
- 3) **Efecto:** Hay rompimiento en el potencial de membrana mitocondrial y activación de endonucleasas y otros cambios fisiológicos que marcan el comienzo de la fase de degradación.
- 4) **Degradación:** Completa destrucción del DNA y macromoléculas originando cambios que llevan a una inestabilidad de la lámina nuclear, desorganización del citoesqueleto y por último, destrucción del cuerpo celular.

La apoptosis se inicia en respuesta a diversas señales extracelulares o intracelulares, de acuerdo con la circunstancia de que se trate. Para los estudios de genotoxicidad, es de particular interés el proceso apoptótico que se produce como resultado de una lesión en el material genético, debida a cambios físicos, químicos, tóxicos y daño anóxico que causa diferentes patologías y la muerte celular. Muchos agentes antineoplásicos y farmacológicos inducen la apoptosis (Rudin y cols 1997). El daño que producen al DNA pudiera ser la causa de la activación de este proceso, por lo que se considera que la apoptosis podría tomarse como un biomarcador de genotoxicidad celular. Las alteraciones en la función de apoptosis, ya sea que se incremente su frecuencia en un tejido, o que no ocurra, se relacionan notablemente con la patogénesis de muchas enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas, SIDA, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Entre algunas de las enfermedades que se asocian con apoptosis se encuentran el virus de Epstein-Barr el cual está relacionado con mononucleosis (Rudin y cols 1997). La enfermedad de Alzheimer en la que se puede iniciar una apoptosis neuronal en respuesta a la acumulación de proteínas mutantes, y Parkinson; en este último, el incremento en una apoptosis neuronal, contribuye a varios desordenes neurodegenerativos incluyendo atrofia muscular espinal. (Craig BT 1995). Los virus tienen mecanismos que retardan el camino a la apoptosis para continuar su sobrevivencia, similarmente la manipulación de la apoptosis a través de mecanismos farmacológicos e intervención genética significa nuevas terapias y oportunidades para muchas de estas enfermedades.

Muchos de los factores que conducen a la apoptosis están directamente involucrados con la traducción de señales apoptóticas identificadas durante la operación normal de la célula; entre ellos se incluyen la limitación de nutrientes, acumulación de toxinas, infecciones virales, oxígeno reactivo y estrés hidrodinámico (Mastrangelo A.J. and Betenbaugh J M 1998).

En una respuesta inmunológica, la apoptosis de linfocitos ocurre como un mecanismo de control para evitar la proliferación excesiva o indefinida de las células participantes en la respuesta contra los antígenos extraños. Sería de esperar que en un organismo infectado, la frecuencia de apoptosis en linfocitos fuera diferente a la que se encontraría en organismos sanos.

Enfermedades parasitarias y su asociación con cáncer

Muchas de las enfermedades parasitarias que se asocian con cáncer son debidas a la presencia de helmintos como es el caso de *Schistosoma* del que se conocen 11 especies, de las que únicamente tres presentan una clara asociación con cáncer. Las especies son: *Schistosoma hematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum*; su distribución geográfica es muy amplia, encontrándose en regiones tropicales y subtropicales de Africa, América del Sur, el Caribe, este del Mediterráneo y este de Asia. *S. japonicum* es endémico de tres países como son China, Filipinas e Indonesia. La manifestación patológica más común para los tres casos es fibrosis, como consecuencia de la respuesta inmunológica del huésped (WHO/IARC 1994).

Estudios epidemiológicos realizados en humanos para estas tres especies revelaron que *S. haematobium* está relacionado con cáncer de vejiga, además de que los pacientes afectados por esta infección muestran una frecuencia elevada de micronúcleos (MN) en células de descamación del epitelio de vejiga (Rosin y cols 1994 b). Cuando se hicieron experimentos en ratón, rata, hamster y primates no humanos se indujeron hiperplasias, pero pocos tumores (WHO/IARC 1994). *S. mansoni* se asocia con linfoma folicular, y *S. japonicum* está asociado con cáncer colo-rectal. Se estima que un factor de riesgo de cáncer por estos parásitos, es la presencia de huevos en el tejido del huésped (Ishii y cols 1994). Otros tremátodos son de gran importancia porque en estudios epidemiológicos se ha mostrado que presentan asociación con cáncer. Entre ellos se encuentran *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* y *Clonorchis sinensis* cuya distribución es muy amplia encontrándose en China, Japón, República de Corea, Laos, Tailandia, Vietnam, Ucrania y parte del este de Europa. La infección por estos tres parásitos se ha asociado con colangiocarcinoma y carcinoma hepatocelular. Estudios con animales demostraron que una infección con *O. viverrini* produjo colangiocarcinoma y nódulo hepatocelular, en tanto que una infección con *O. felineus* produjo lesiones colangiocelulares, incluyendo inflamación periductal, fibrosis y ocasionalmente metaplasias. Recientes estudios demuestran que algunas sustancias del tejido glandular infectado con este parásito son causas de efectos degenerativos y genotóxicos en animales experimentales, lo que probablemente tenga efectos mutagénicos y carcinogénicos (Iiyinskikh y cols 1997). *C. sinensis* se asoció débilmente con la presencia de colangiocarcinoma en gato y en perro, pero en asociación con la exposición a aflatoxina B1 en hamsters indujo colangiocarcinoma, parecido a lo que sucede en una infección en humano (WHO/IARC 1994). En una enfermedad crónica, sobre todo en casos de opistorchiosis, el peso del hígado llega a ser el doble de lo normal. Otras alteraciones que se han observado incluyen la presencia de linfocitos, monocitos, eosinófilos y células plasmáticas, dilatación de los ductos biliares e hiperplasias. *O. viverrini* está muy fuertemente asociado con colangiocarcinoma en tanto que *O. felineus* se asocia con colangiocarcinoma y carcinoma hepatocelular en hamster sirio. Otros parásitos helmintos, también podrían relacionarse con riesgo de cáncer.

CISTICERCOSIS

Cisticercosis y cáncer

La neurocisticercosis en el hombre es la forma más severa de infección por cisticercos, ya que el parásito se aloja en el sistema nervioso central causando una gran variedad de síntomas y alteraciones. Pero además, la neurocisticercosis puede asociarse con una variedad de enfermedades como neoplasias malignas, tuberculosis, glomerulonefritis, diabetes mellitus, etc. (Villagrán JV y

Olvera R 1989). Se considera que la neurocisticercosis podría ser un factor de riesgo de cáncer, porque en estudios sobre el estadio larval de *Taenia taeniaeformis* se vio que causa fibrosarcomas en ratas (Hans 1995), y en un estudio con pacientes con neurocisticercosis se encontró que el 16.8% de los enfermos presentaban astrocitosis gliosa. Entre éstos, el glioblastoma multiforme fue el tipo de tumor más frecuente y se encontró asociación entre la localización de éste y las lesiones por el parásito (Del Brutto y cols 1997).

Ciclo de vida de *Taenia solium*

La cisticercosis es una parasitosis causada por la forma larvaria del céstodo *Taenia solium*. La infección se presenta cuando el huésped humano y/o cerdo ingiere huevos de este céstodo, los cuales pierden su embrióforo en el aparato digestivo, penetran a la circulación y se distribuyen en diversos órganos y tejidos desarrollándose en cisticercos (Silverman, 1954; Yoshino, 1933).

La cisticercosis es una de las enfermedades con mayor prevalencia en América Latina, África y Asia (Sarti 1997). Podría considerarse como un indicador de bienestar social ya que la prevalencia de esta parasitosis está determinada por malos hábitos de higiene, fecalismo al aire libre, deficiencias en la infraestructura sanitaria, ignorancia, pobreza y la comercialización clandestina de la carne infectada.

Cuando un ser humano ingiere carne de cerdo mal cocida con cisticercos viables, los parásitos evaginan en su aparato digestivo, se fijan a la pared intestinal donde se transforman hasta convertirse en adulto, y así desarrollan la taeniosis. El portador de la taenia adulta desaloja huevos diariamente, con capacidad infectiva, junto con las heces fecales. Si éstas permanecen en el ambiente, el ciclo continúa cuando el hospedero intermediario, normalmente el cerdo, es infectado al ingerir los huevos que arroja el humano. El humano puede infectarse de la misma manera si consume comida contaminada con los huevos de *Taenia*. (Figura 4) Para que esto ocurra hace falta que la comida se contamine con heces fecales, lo cual ocurre en nuestro país con mucha frecuencia.

Los cisticercos se desarrollan principalmente en el encéfalo o en el músculo. Llama la atención que la mayoría de los estudios realizados en América Latina señalan frecuencias mucho mayores de neurocisticercosis en humano, aunque también se han comunicado casos de cisticercos en músculo y tejido graso subcutáneo (Flisser y cols 1997). Por el contrario, en los países asiáticos se informan más casos de cisticercosis muscular. Un trabajo realizado con 2188 casos de cisticercosis en América Latina reveló que los cisticercos también se alojan en otros órganos como: médula espinal, ojos y sus anexos, tejido subcutáneo, músculo, corazón, y otros (Flisser y cols 1982) (cuadro 1). En otro estudio en México, se analizaron 63 pacientes y la localización de los cisticercos fue más amplia, encontrándose en casi todos los órganos (Villagrán y Olvera 1989) (cuadro 2). En cerdo, la localización más frecuente es músculo, tanto liso como estriado (cuadro 3) (Plancarte y cols 1999)

Cuadro 1. Localización de los parásitos en 2188 casos de cisticercosis en América Latina

Localización	Número	%
Encéfalo	1719	66.9
Médula espinal	72	2.8
Ojos y anexos	362	14.0
Tejido subcutáneo	159	6.1
Músculo	79	3.0
Corazón	31	1.2
Otros	124	4.8
Generalizado	23	0.8

Epidemiología de la cisticercosis humana en América Latina. (Flisser y cols 1982).

Cuadro2. Localización del parásito en 63 casos de cisticercosis en México

Localización	Número	%
Corazón	20	31.7
Pulmones	8	12.7
Músculos esqueléticos	6	9.5
Mesenterio	4	6.3
Páncreas	3	4.7
Intestino delgado	3	4.7
Epiplón	2	3.1
Peritoneo	2	3.1
Bazo	2	3.1
Tiroides	2	3.1
Higado	2	3.1
Lengua	2	3.1
Ganglios linfáticos	2	3.1
Diafragma	1	1.6
Aorta lumbar	1	1.6
Piel	1	1.6

Localización	Número	%
Grasa retroocular	1	1.6
Pleura parietal	1	1.6

Cuadro tomado del libro de Cisticercosis Porcina (Flisser y cols 1989)

Cuadro3 Distribución de cisticerco de *Taenia solium* en músculo de cerdo

Localización	Número	%
Lengua	71	1.5
Corazón	31	4.4
Maseteros	29	35.6
Region lumbar y costal	652	1.7
Miembro anterior	383	30.3
Miembro posterior	555	26.5

Cuadro tomado del artículo de (Plancarte y cols 1999)

Genotoxicidad causada por cisticercosis

En estudios previos con cerdos parasitados con *T. solium* en forma natural, se encontró daño cromosómico en la forma de rompimientos múltiples, así como incremento en la frecuencia de células poliploides (Flisser y cols 1990). En pacientes que sufren NC se encontró también daño cromosómico estructural, así como aumento en la frecuencia de mutación en el locus *hprt*, indicando que la infección crónica es capaz de causar elevación en estos biomarcadores (Montero y cols 1994). En un estudio en cerdos en los que se indujo la infección se encontró una asociación aparente entre el incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y la respuesta humoral contra los parásitos (Herrera y cols 1994). En el mismo estudio también se encontró un incremento en la cinética de proliferación celular en correlación con el aumento en el intercambio de cromátidas hermanas. De estos resultados no queda claro si el daño genotóxico encontrado se debe a la cronicidad de la infección, a la respuesta inflamatoria o inmunológica, o si se debe a factores relacionados con el parásito.

Mecanismos que explican la relación de genotoxicidad con cáncer

Aunque los estudios sugieren una asociación entre las infecciones con tremátodos y céstodos, y diversos tipos de cáncer, aún no se han establecido los mecanismos que explican el proceso, aunque hay diversas propuestas.

Localización	Número	%
Grasa retroocular	1	1.6
Pleura parietal	1	1.6

Cuadro tomado del libro de Cisticercosis Porcina (Flisser y cols 1989)

Cuadro3 Distribución de cisticerco de *Taenia solium* en músculo de cerdo

Localización	Número	%
Lengua	71	1.5
Corazón	31	4.4
Maseteros	29	35.6
Region lumbar y costal	652	1.7
Miembro anterior	383	30.3
Miembro posterior	555	26.5

Cuadro tomado del artículo de (Plancarte y cols 1999)

Genotoxicidad causada por cisticercosis

En estudios previos con cerdos parasitados con *T. solium* en forma natural, se encontró daño cromosómico en la forma de rompimientos múltiples, así como incremento en la frecuencia de células poliploides (Flisser y cols 1990). En pacientes que sufren NC se encontró también daño cromosómico estructural, así como aumento en la frecuencia de mutación en el locus *hprt*, indicando que la infección crónica es capaz de causar elevación en estos biomarcadores (Montero y cols 1994). En un estudio en cerdos en los que se indujo la infección se encontró una asociación aparente entre el incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y la respuesta humoral contra los parásitos (Herrera y cols 1994). En el mismo estudio también se encontró un incremento en la cinética de proliferación celular en correlación con el aumento en el intercambio de cromátidas hermanas. De estos resultados no queda claro si el daño genotóxico encontrado se debe a la cronicidad de la infección, a la respuesta inflamatoria o inmunológica, o si se debe a factores relacionados con el parásito.

Mecanismos que explican la relación de genotoxicidad con cáncer

Aunque los estudios sugieren una asociación entre las infecciones con tremátodos y céstodos, y diversos tipos de cáncer, aún no se han establecido los mecanismos que explican el proceso, aunque hay diversas propuestas.

Inflamación

La respuesta inflamatoria fisiológica consiste de complejas interacciones celulares que comprenden al sistema inmune y células inflamatorias, las cuales son mediadas por un grupo de proteínas llamadas citocinas. Las citocinas generalmente funcionan como mensajeros intercelulares que estimulan actividades biológicas particulares por estimulación a receptores específicos de la célula (Kuby J 1994). Por lo general la inducción de citocinas ocurre en respuesta a un daño celular y están presentes en la inflamación y la respuesta inmune, además de que se asocian con el crecimiento y la reparación (John y cols 1992). Se sabe que las alteraciones en el funcionamiento de las citocinas provocan disturbios en la proliferación celular, incluso que pueden producir daño genético, pero no está claro si estos efectos son debidos a la acción de las citocinas o al efecto sinérgico entre ellas. Lo que se ha observado es que incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en células tratadas con IL-2, lo que sugiere un daño al DNA por oxidación (Lazutka JR 1996). Los mecanismos de esta acción genotóxica son desconocidos, y se cree que tienen que ver con los radicales libres de oxígeno y N_2 y la intervención de enzimas tales como la topoisomerasa II.

Durante el ciclo celular la célula puede sufrir daño en algunas de sus proteínas que regulan el ciclo, produciendo una proliferación anormal, transformando las células e inhibiendo su programa de muerte celular (Murray y Hunt 1993). En los procesos que acompañan a la inflamación en respuesta a la infección por parásitos es factible encontrar que la proliferación celular se ve afectada, induciendo un incremento en la frecuencia de mutaciones espontáneas como resultado del proceso de replicación celular en el cual los procesos oxidativos y la activación metabólica juegan un papel muy importante (Gentile JM and Gentile JG 1994).

La inflamación crónica se considera un factor de riesgo para el cáncer. Se conoce que los radicales libres de oxígeno generan daño en el tejido induciendo efectos genotóxicos como rompimientos en el DNA, ICH y mutación, además de que promueven la transformación neoplásica y contribuyen al desarrollo de cáncer. (Rosin y cols 1994 a). Otros investigadores sugirieron la posibilidad de que el daño es producido por la oxidación de nanoenzimas de la membrana celular que lleva a la liberación de productos de peroxidación como aldehídos, epóxidos, y otros componentes que causan daño al DNA (Gordon and Weitzman 1988).

La infección por parásitos induce inflamación crónica e irritación en asociación con un incremento en cáncer, como es el caso de Schistosomiasis, en donde se encontró un incremento en la frecuencia de MN que estaba en relación con la respuesta inflamatoria, además de que se presentaban alteraciones en el cromosoma 11 en humanos (Rosin y cols 1994 b). Esta inflamación puede incrementar el daño genético a través de la formación de nitrosaminas, por la bioactivación y/o a través del daño en la estimulación de la proliferación celular (Ohshima y Bartsch 1994). Se sugiere que la reacción inflamatoria inducida por el parásito causa que las células del hospedero muten y proliferen más, alterando el desarrollo normal de las células (Warren y cols 1995).

Se conoce que el óxido nítrico (NO) tienen varias funciones metabólicas en las cuales interviene, pero a menudo induce citotoxicidad y efectos mutagénicos en exceso, ya que la reacción que induce daño al DNA causando rompimientos cromosómicos y mutaciones puntuales por desaminación (Jones y cols 1991; Hollstein y cols 1991).

Inducción de enzimas de metabolismo

Un mecanismo alternativo que se ha propuesto en relación con la iniciación y/o promoción de un proceso cancerígeno debido a la infección por parásitos en hígado, es que son capaces de inducir la actividad de enzimas del citocromo P450 que participan en el metabolismo de agentes tóxicos ambientales, haciendo así más susceptible al individuo parasitado a la acción de esos contaminantes ambientales (Kirby y cols 1994; Montero y cols 1999). Debido a que estas enzimas están presentes en todos los tejidos del organismo, su activación podría ocurrir en otros órganos donde se alojen parásitos.

Mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica

El cisticercos ha desarrollado mecanismos que evaden las respuestas inflamatoria e inmunológica para permanecer en su hospedero. La enfermedad más común que produce el cisticercos en el hombre es la neurocisticercosis, que nos muestra algunas manifestaciones como meningitis crónica o hidrocefalia, etc. Las oncosferas cuando invaden al hospedero intermediario son susceptibles a los anticuerpos y la vía del complemento (Mitchell y cols 1977). Sin embargo al tiempo en que el hospedero ha generado sus anticuerpos contra la oncosfera, frecuentemente ya se ha formado el cisticercos y ha comenzado a transformarse para poder ser más resistente. Se ha observado que el fluido vesicular de *T. saginata* contiene proteínas fisicoquímica y antigénicamente similares a la del plasma del hospedero, esto sugiere que las proteínas del parásito no son detectadas por el sistema inmune del hospedero (Machnicka y cols 1986). También el cisticercos posee determinantes antigénicos asociados con las inmunoglobulinas del hospedero incluyendo IgG1 y IgG 2 pero no IgM, lo cual deja el camino libre para el parásito (Clinton y cols 1997). Se sabe que la infección está asociada con la depresión del sistema inmune y esto se ha visto en cerdos infectados con huevos de *T. solium* en donde parece haber una correlación inversa entre la inmunodepresión de linfocitos T y el número de larvas implantadas, es decir, conforme aumenta el número de cisticercos en un cerdo parasitado, menor el número de linfocitos T (Molinari y cols 1987). Algunos autores han sugerido que el parásito emplea cuatro caminos distintos de evasión para sobrevivir por períodos prolongados en el ser humano (Correa y cols 1989):

- 1) La secreción de un antígeno que no tiene funciones metabólicas o estructurales vitales para el parásito, pero que es muy inmunogénico, el antígeno B, que captura la mayor parte de los anticuerpos lejos de la superficie parasitaria.
- 2) El enmascaramiento con inmunoglobulinas, posiblemente a través de receptores para el fragmento Fc, que impide la llegada de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos parasitarios presentes en la superficie.
- 3) La inducción de supresión de la respuesta inmune celular (o establecimiento en individuos de por sí suprimidos).
- 4) El alojamiento en sitios donde la respuesta inmunológica normal no está activada como por ejemplo, el cerebro y el ojo (Correa y cols 1989).

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El daño al material genético o genotoxicidad está considerado como un riesgo para la salud.

La genotoxicidad es producida por factores ambientales en donde están comprendidos agentes químicos, físicos y biológicos tales como virus, bacterias, levaduras y parásitos.

La contribución de las enfermedades parasitarias en la producción de este daño en poblaciones de países en desarrollo como el nuestro, es un tema poco estudiado, pero que consideramos relevante por el impacto socioeconómico que puede ser significativo, por incidir por la contaminación ambiental, asociado con la pobreza y la ignorancia.

Se ha demostrado que algunas de las enfermedades parasitarias se relacionan con daño genotóxico. La esquistosomiasis produce una elevación de micronúcleos en la mucosa de la vejiga de pacientes y en células sanguíneas de animales de laboratorio infectados con este parásito, característica muy relacionada con el desarrollo de cáncer.

De particular interés para nosotros es la infección por larvas de *Taenia solium* que producen en el hombre y cerdo la cisticercosis. La prevalencia de esta enfermedad está determinada por varios factores en los que se encuentra la deficiencia en la estructura sanitaria, falta de agua potable, niveles socioeconómicos y culturales bajos en las zonas endémicas y finalmente la comercialización clandestina de la carne del cerdo con cisticercosis.

La NC puede asociarse con gliomas cerebrales y otras enfermedades como: neoplasias malignas, tuberculosis, glomerulonefritis, diabetes mellitus, etc. Se ha encontrado que la infección natural en cerdos y en humanos produce daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica (Flisser y cols 1990; Montero R y cols 1994)

En cerdos infectados experimentalmente se encontró una asociación entre el incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y la respuesta humoral contra los parásitos. De estos estudios no queda claro si el daño genotóxico encontrado se debe a la respuesta inflamatoria crónica, o a factores relacionados con el parásito (Herrera y cols 1994).

Para confirmar los resultados previamente observados en los cerdos mencionados se utilizó una muestra mayor de animales utilizados en un proyecto de vacunación contra *T.solium*

En cerdos infectados se evaluaron diversos parámetros de genotoxicidad que indican diferentes tipos de daño, como son micronúcleos y otras anomalías nucleares, células poliploides, células binucleadas y el intercambio de cromátidas hermanas y se correlacionaron con la respuesta inmunológica específica, la carga parasitaria y la viabilidad de los parásitos al momento del sacrificio.

HIPOTESIS:

El daño genotóxico encontrado en linfocitos de cerdos infectados por cisticercos de *Taenia solium*, depende de la carga parasitaria y de la respuesta inmunológica del huésped.

OBJETIVOS:

Determinar si existe correlación entre el daño genotóxico y la respuesta inmune.

Determinar si existe correlación entre el daño genotóxico y la carga parasitaria.

HIPOTESIS:

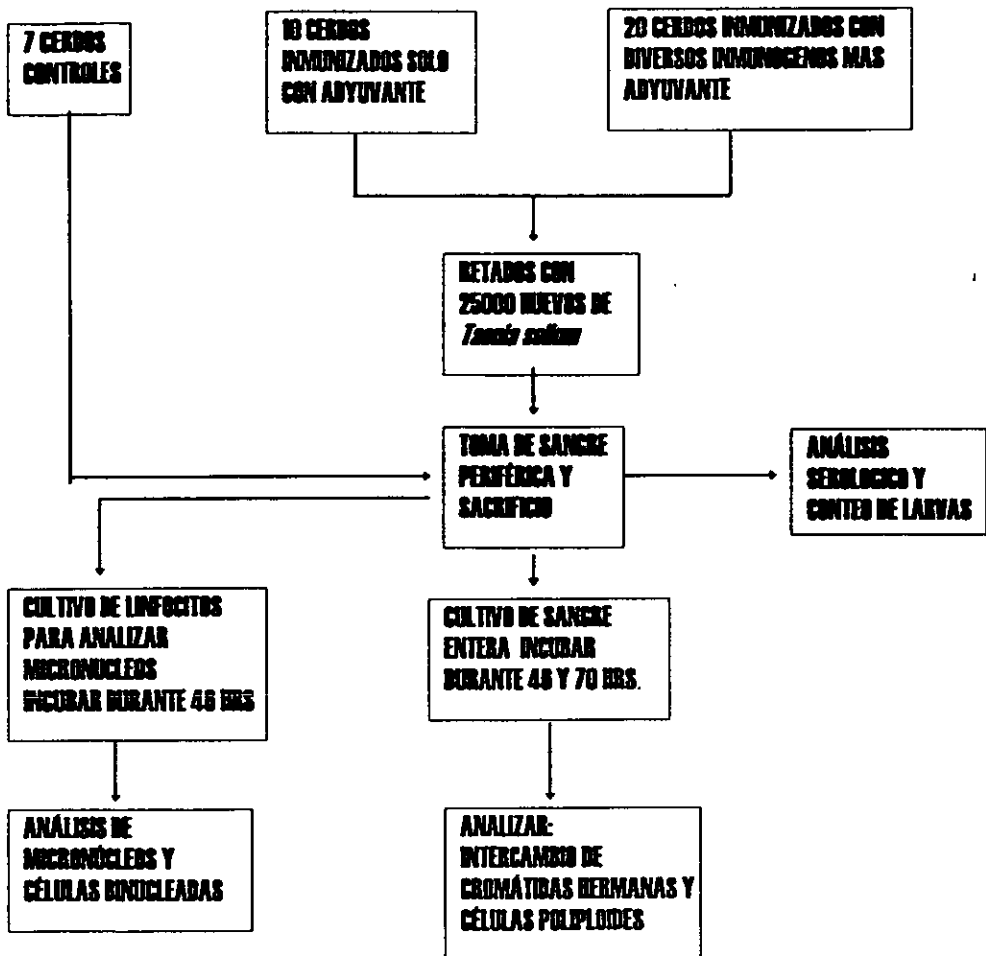
El daño genotóxico encontrado en linfocitos de cerdos infectados por cisticercos de *Taenia solium*, depende de la carga parasitaria y de la respuesta inmunológica del huésped.

OBJETIVOS:

Determinar si existe correlación entre el daño genotóxico y la respuesta inmune.

Determinar si existe correlación entre el daño genotóxico y la carga parasitaria.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tratamiento.

En este trabajo se estudiaron 37 cerdos de dos meses de edad que se encontraban libres de parásitos al inicio del experimento.

N°de cerdos	Grupos
	Adyuvantes
5	Adyuvante incompleto de Freund (AIF)
5	Glutation-S-Tranferasa + Saponina
2	Alumbre
	Antígenos
5	Oncosferas <i>T.solium</i> (Onc. - T.s.)
5	Antígenos recombinantes de oncosferas de <i>T.ovis</i> , unidos a GST (ARC - T.o.)
5	Proteína recombinante de cisticerco de <i>T.cracisseps</i> (TCA-2-MBP)
3	Antígeno B recombinante de cisticerco de <i>T. solium</i> (T.s.)

Se hicieron 2 inmunizaciones con los antígenos mencionados en un intervalo de 15 días. Tres semanas después de la última inmunización, los cerdos fueron retados con 25 000 huevos vía oral. Se tomaron muestras de sangre periférica en forma aseptiva. Los cerdos fueron sacrificados para contar los cisticercos.

Con las muestras de sangre se llevó a cabo la siembra de cultivo de linfocitos para evaluar los parámetros de genotoxicidad. El proceso de siembra se realiza en una área estéril. Al mismo tiempo se tomaron muestras de sangre para la evaluación inmunológica, que se realizó en la facultad de Medicina.

Cultivos de sangre entera

Cada cultivo consistió en: una mezcla de: 1 ml de sangre diluida con RPMI 1640 (Gibco) (1:1), 5.5 ml de RPMI 1640, 0.2 ml de fitohemaglutinina (Gibco), 20% de suero fetal bovino, 0.3ml de BrdU (Sigma) 32µM. Por cada animal se utilizaron 4 cultivos con incubaciones de 46 horas y 4 cultivos de 70 horas a 37°C.

Para cosechar todos los cultivos el procedimiento fue el siguiente: dos horas antes de cosechar se les

agregó Colcemid (Sigma) 0.2 ml. Se centrifugó a 1500 r.p.m./10min, se eliminó el sobrenadante y se agregó KCl 0.075M que previamente estaba a 37°C. Se centrifugó a 1500 r.p.m/10 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón con metanol-ácido acético 3:1, y se repitió este procedimiento 3 veces hasta que el paquete celular quedó blanco.

Preparación de laminillas de cultivos de sangre entera y tinción con fluorescencia más Giemsa
Se utilizaron portaobjetos para colocar el material resuspendido que se obtuvo de la cosecha, éstos previamente deben estar sumergidos en alcohol y en refrigeración. Se dejó escurrir el exceso de alcohol y se agregaron 3 gotas del material resuspendido, desde una distancia aproximada de 1.5 mts, para lograr que los cromosomas queden bien separados. Se dejaron secar completamente antes de teñir de acuerdo con el método de Perry y Wolff (1974). Las preparaciones se sumergieron en Hoechst 33258 durante 30 min en obscuridad., se lavaron con agua de la llave, se secaron y expusieron a la luz UV por 2 horas, las laminillas permanecieron cubiertas durante este tiempo con buffer de fosfatos 0.06 M a pH 6.8 Después estas preparaciones se tiñeron con Giemsa (Sigma) al 4% en buffer de fosfatos, durante 5 minutos, se secaron y montaron con Entellan (Merck) Se utilizaron para evaluar ICH en cultivos de 70hrs y células hiperplóides en cultivos de 46hrs.

Cultivos de células mononucleadas

Las células mononucleadas de la sangre entera se separaron por medio de un gradiente de fycoll (Nycodenz). Se depositó la sangre entera sobre fycoll (1:1) y se centrifugó a 1600 r.p.m. durante 30 min. Posteriormente se recuperó la capa de células mononucleadas con una pipeta y se resuspendió en RPMI 1640 para ser centrifugada a 1200 r.p.m. durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y resuspendió el botón en 2 ml de RPMI 1640. Se tomó una muestra de 20 µl del material celular resuspendido que se adicionó a 1 ml de azul tripano (Sigma) diluido en RPMI 1640 (1:10), para contar los linfocitos con un hemocitómetro y sembrar por cultivo 1.5×10^6 células. Cada cultivo constó de 2.2 ml de medio RPMI 1640, 0.2 ml de fitohemaglutinina, 0.6 ml de suero autólogo, y 24 hrs después se le agregó 12µl de BrdU [20.3µM] (Sigma). Se incubaron los cultivos durante 46 hrs. Al término del tiempo de incubación se centrifugaron a 1500 r.p.m/10min y se les agregó KCL 0.075M que estuvo a 37°C; se centrifugaron inmediatamente los cultivos y se hicieron 3 lavados con metanol-ácido acético.

Elaboración de laminillas de cultivos de células mononucleadas y tinción inmunohistoquímica.
Se utilizó el método descrito por Montero y cols (1997) Para teñir los núcleos de linfocitos que incorporaron BrdU en el DNA, que consiste en: tomar un portaobjetos limpio y seco, agregar una gota de la suspensión celular en el centro. La tinción inmunohistoquímica en estas preparaciones consiste en desnaturalizar el DNA con formamida (Sigma) al 40% a 80°C por 15 minutos, se hacen 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno; se incuban estas preparaciones con el primer anticuerpo, monoclonal anti-BrdU (1:50) (Becton Dickinson) por 2 horas, en una cámara húmeda; se lavan 3 veces con PBS 5 minutos cada uno, después se incuban con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón con peroxidasa conjugada (1:100) (Sigma) por 30 minutos en una cámara húmeda, se hace el lavado 3 veces con PBS 5 minutos cada uno. Se incuba con H₂O₂ (Baker) (0.3µl/ml) con DAB (Sigma) preparado en fresco (0.5mg/ml) en PBS, pH7.5. Se obtiene un precipitado café y se hace una contratinción con Giemsa. Una vez realizado esto las laminillas se secan al aire, y se montan en

Entellan para evaluar MN y células binucleadas, así como figuras apoptóticas.

Evaluación.

La evaluación de los parámetros de genotoxicidad se hizo en un microscopio de campo claro, utilizando los aumentos de 20x y 100x en los objetivos y 10x en los oculares. De esta manera, para evaluar ICH se localizaron 25 metafases en 2da división y se evaluaron los intercambios de acuerdo con los criterios establecidos: un intercambio terminal se cuenta como 1, y los intercambios intermedios se contaron como 2 (Lámina 1)

Para la evaluación de poliploides se localizaron 100 células en metafase consecutivas y se evaluó cuántas de ellas tenían mayor número de cromosomas (38 es el normal en cerdos) y en qué división estaban (Lámina 1).

El índice mitótico se evaluó como el número de metafases encontradas por 1000 células contadas.

Para evaluar MN se emplearon 4000 células linfoides con tinción inmunquímica (café) por cerdo. Se buscaron micronúcleos, células en la fase terminal de la apoptosis, algunas atipias como presencia de células binucleadas y protusiones nucleares y se evaluó también el índice de marcaje como el número de células café encontradas por cada 2000 células evaluadas (Lámina 2).

Evaluación de la respuesta inmunológica

El análisis inmunológico se llevó a cabo con la técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) para determinar el reconocimiento de bandas correspondientes a glicoproteínas que indican la presencia de cisticercosis.

Este método emplea como antígeno a un enriquecido glicoproteico de cisticercos de *T.solium* el cual es separado por electroforesis y transferida a hojas de nitrocelulosa donde se realiza el ensayo inmunoenzimático con los sueros problema.

El ensayo inmunoenzimático consiste en hacer una electroforesis de un preparado que contiene un total de siete antígenos, que son considerados específicos contra *T.solium* GP50, GP42, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13 diferenciados por su peso molecular (el número por 1000). La GP se refiere a la categoría de glicoproteína. La inmunodominancia entre estos siete antígenos es variable, siendo la GP50, 42 y 24 los más reconocidos por el suero de los pacientes con neurocisticercosis, 90; 87; 85% respectivamente y las GP 21, 18, 14 y 13 en menor proporción (Tsang y cols 1989). En la actualidad esta técnica es muy utilizada para detectar cerdos parasitados con cisticercos y diagnosticar pacientes con neurocisticercosis.

Análisis coproparasitológico

Este análisis se efectuó en los cerdos controles, para descartar que tuvieran algún tipo de parásito. Se utilizó la técnica de flotación que consiste en colar de 10 a 12 ml de la suspensión fecal en agua destilada a través de una gasa o tela cielo húmeda y se deposita en un tubo de centrifuga de 15 ml. Se centrifuga a 2000 r.p.m., se deshecha el sobrenadante y se resuspende el boton con solución salina al 0.85%, se repite este procedimiento hasta que el sobrenadante quede trasparente. Después a esta suspensión fecal se le agrega una solución salina hasta completar 15 ml, se coloca en un portaobjetos

y se deja reposar por 10 min. Una vez realizado esto se observan aproximadamente 25 campos para detectar presencia de parásitos (Aluja y cols 1987).

Como determinar la viabilidad

La viabilidad de los cisticercos se determinó considerando cisticercos vivos aquellos que presentaban un fluido transparente conteniendo un escólex visible, mientras que los cisticercos no viables se observan calcificados y con consistencia dura.

Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de nuestro estudio de genotoxicidad se emplearon las siguientes pruebas estadísticas: *t* de Student, la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis y correlación lineal. Se aplicó la prueba estadística de "la caja" el cual nos indica si estos rangos pertenecen o no a los datos establecidos dentro de las frecuencias. Se basa en tomar los cuartiles 1 y 3 para saber si están dentro de la variación interna y externa.

RESULTADOS:

Cuando determinamos la frecuencia de ICHs en el cultivo de linfocitos en cerdos infectados se encontró un valor promedio de 1.59 ± 0.48 ICH/célula mientras que para los controles de 1.33 ± 0.17 (Tabla 1). con una $p < 0.05$ (Gráfica 1).

Las células poliploides que se dividieron una, dos y tres veces en el cultivo mostraron valores de frecuencia de 0.23, 0.06 y 0.04 % respectivamente en cerdos infectados, mientras que los valores de los controles fueron, 0.03, 0.03 y 0.00 %. Estos valores son diferentes con un valor de $p < 0.05$ (Gráfica 2). También observamos células binucleadas, con una frecuencia de 1.04 ‰ en cerdos infectados, y de cero para los controles (Tabla 3).

Dado que la frecuencia de células poliploides está incrementada en aquellos cerdos infectados se buscó si existía una correlación lineal con carga parasitaria, viabilidad y número de bandas antigénicas, sin éxito (Tabla 2). Se encontró correlación entre el número de células binucleadas y los parámetros mencionados anteriormente.

Los micronúcleos mostraron frecuencias de 2.12 ‰ en el grupos infectados y un valor de 0.27 ‰ para el grupo control. Las protrusiones nucleares tuvieron frecuencias de 2.00 ‰ en los cerdos infectados, mientras que los controles presentaron valores de 0.58 ‰ (Tabla 3). Se investigó si las PN y los MN presentaban una correlación lineal con el número de bandas antigénicas, carga parasitaria y viabilidad y no se encontró.

El empleo de la prueba estadística de t de Student aplicada para MN y PN mostró ser significativa con un valor de $p < 0.05$, entre cerdos sanos y cerdos infectados y al aplicar la prueba de varianza de Kruskal Wallis se encontró un valor de $p = 0.002$ (Gráfica 3) también significativo.

Al separar los grupos infectados por agente de inmunización observamos que las células binucleadas no presentaban una correlación lineal con carga parasitaria, número de bandas antigénicas y viabilidad. Pero cuando analizamos los MN observamos que presentan una correlación lineal positiva con la viabilidad de los cisticercos encontrados siendo significativa con un valor de $p < 0.05$ y un valor de $r = 0.81$ (Gráfica 4).

En cuanto a las células en apoptosis se encontró un valor de frecuencia de 18.97 ± 9.84 en el grupo control y un valor de 15.75 ± 8.49 para el grupo infectado, no encontrando diferencias significativas entre los grupos.

Para descartar la posibilidad de que los cerdos controles estuvieran parasitados, se les aplicó el análisis coproparasitoscópico y se determinó que un cerdo control estaba parasitado con huevos del nemátodo *Globocephalus sp.* Este cerdo mostró frecuencia de cero para células poliploides, PN, BN así como en la frecuencia de ICHs. Sólo la frecuencia de MN mostró un valor moderadamente elevado, de 2.12 ‰ (Tabla 3) no se pudo determinar la carga parasitaria ni el tiempo de infección. Al aplicar la prueba de "la caja" (Ostle and Malone 1988) resultó que este valor queda fuera de los valores de control y se puede considerar como un valor atípico.

Entre los cerdos infectados, se encontraron 2 valores sospechosamente elevados, uno en la frecuencia de MN, y otro en la frecuencia de PN. Al aplicar la prueba estadística de "la caja" se encontró que pueden ser consideradas "outlier".

DISCUSION:

Las enfermedades parasitarias consisten en complejas interacciones entre dos organismos, que pueden durar toda una vida y tener consecuencias biológicas de acuerdo con diversas condiciones como el sitio en el que se aloja el parásito (órgano o tejido), el número de parásitos y la respuesta a la infección.

Los efectos genotóxicos producidos por la cisticercosis por *T. solium* ha sido estudiada en huéspedes naturales (cerdos y humano). Estos estudios han revelado que son capaces de producir daño en linfocitos de sangre periférica (Montero y cols 1997; Flisser y cols 1990)

En el presente trabajo la infección por huevos de *T. solium* causó un incremento en la frecuencia de ICH. En el trabajo realizado por Herrera y cols. (1994) en infecciones experimentales, se observó una frecuencia elevada de ICH relacionada con un incremento en la respuesta de linfocitos T estimulados con Fitohemaglutinina (PHA), lo cual se consideró relacionado con una respuesta inmunológica causada por la infección. En ese estudio se hizo un seguimiento para cada uno de los cerdos de manera individual y la frecuencia de ICHs se elevó a partir de la sexta semana a la novena semana en dos cerdos que presentaron la infección. En la 13ª semana se encontró una ligera disminución, pero como fueron sacrificados no se confirmó si la disminución continuaría. También en la semana 13ª disminuyó la proliferación de linfocitos.

En nuestro estudio observamos un aumento significativo en la frecuencia de ICHs aún después de la 11ª semana; desde la inoculación esta elevación tiende a aumentar con el tiempo de infección como lo sugieren los resultados de Herrera F (comunicación personal) quien encontró una frecuencia de ICHs significativamente mayor en cerdos con infección natural, mayor de un año. La frecuencia de ICH no mostró relación con otros parámetros, como la carga parasitaria o la respuesta inmunológica. Los datos se analizaron por grupos de inmunización.

La frecuencia de linfocitos hiperploides se encontró elevada con respecto a controles sanos, estos datos confirman lo observado por Flisser y cols. (1990) en cerdos con infección natural en donde se aprecia este incremento. Otro daño por aneuploidía, las células binucleadas, mostraron una frecuencia elevada con respecto a los controles sanos, de 1.13%. En el trabajo de Herrera F (comunicación personal) se encontró una frecuencia 7 veces mayor, lo cual sugiere que el tiempo de infección es un factor determinante en la inducción de este tipo de daño, que parece acumularse en las células para manifestarse al tiempo de la proliferación de las mismas. Dado que las células poliploides y las células binucleadas pueden resultar de mecanismos diferentes durante la mitosis o la citocinesis, se postula que el agente que produce este tipo de alteración puede actuar a nivel de microfilamentos o de microtúbulos.

Al analizar las frecuencias de MN y PN observamos un incremento muy claro para cada uno de estos marcadores en los grupos infectados, lo que también fue observado en una infección natural (Herrera F comunicación personal).

Se ha observado que la infección por parásitos produce un incremento en MN y que incluso se asocia con cáncer como es el caso de la *Schistosomiasis* y *Opistorchiosis* (WHO/IAR 1994). En el presente estudio encontramos un aumento en la frecuencia de MN, que podrían originarse por eventos de clastogenicidad debidos a factores producidos por la inflamación, o de eventos de aneuploidía cuya fuente no conocemos, pero que se manifiesta además en el incremento de células poliploides y de

células binucleadas. El hecho de haber encontrado una correlación entre la frecuencia de MN y la viabilidad de los cisticercos nos sugiere que el parásito vivo es causante de los daños observados. Esto tiene sentido en dos formas: el parásito vivo induce una respuesta inflamatoria que causa clastogenicidad, que nosotros medimos como un incremento en ICHs, MN y PN o bien, el parásito vivo produce una secreción o una excreción que causa aneuploidía, la cual medimos como incremento de células poliploides, binucleadas, con MN y PN. La determinación de cuál de estas posibilidades es cierta, depende de nuevos estudios.

En uno de los cerdos de nuestro grupo control observamos una frecuencia elevada de MN; este cerdo resultó positivo en nuestro estudio coproparasitológico, habiendo encontrado huevos del nemátodo *Globocephalus sp.* Este parásito se alimenta de la sangre que succiona; hasta ahora no se conocen manifestaciones clínicas aparentes de la infección, lo que sí se sabe es que este parásito no es muy común en cerdos y regularmente su carga parasitaria es muy baja. Se conocen lesiones como nódulos y esofagostomiasis, pero estas no son muy densas. El análisis que se hizo no permitió establecer la carga parasitaria ni el tiempo de infección, y no existen reportes de genotoxicidad por este parásito. Lo único que podemos decir es que solo un cerdo en el grupo control estaba infectado con este parásito y fue el único que mostró una frecuencia de MN diferente de cero. De acuerdo con la prueba estadística de "la caja" (ostle and Malone 1988) este individuo muestra una frecuencia atípica para los controles, por lo que se puede considerar "outlier", es decir que no pertenece a la distribución.

Una de nuestras interrogantes fue conocer si el proceso apoptótico aumentaba en los cultivos experimentales ya que la apoptosis de linfocitos ocurre como un mecanismo de control de la respuesta inmunológica para evitar la proliferación excesiva de las células que participan en la respuesta contra los antígenos extraños. Esperábamos entonces encontrar una diferencia entre cerdos infectados y sanos, sin embargo los resultados fueron muy elevados comparados con los datos de Herrera F (comunicación personal) quien encontró una frecuencia de cero en los cerdos sanos y de 0.25 % en dos cerdos infectados, y fueron iguales entre el grupo de cerdos controles y el grupo de infectados de este estudio. Pensamos que las frecuencias elevadas de figuras apoptóticas (12 a 30% en ambos grupos) pueden deberse a la manipulación que se hizo de las muestras al separar las células mononucleadas, y a las condiciones en que se sembraron los cultivos en los que la viabilidad iba de 80% al 100%. El porcentaje de células "no viables" contenido en estas muestras se reflejó probablemente en la alta frecuencia de figuras apoptóticas, por lo que lo consideramos como un artefacto técnico.

CONCLUSIONES

- 1.- La infección por cisticercos en cerdos causa daño en el DNA que se puede medir como: ICH, MN, PN, hiperploidia, poliploidia y células binucleadas.
- 2.- La frecuencia de MN encontrada está en relación con la cantidad de parásitos vivos.
- 3.- El tipo de daño encontrado podría estar relacionado con la clastogenicidad, pero la alta frecuencia de hiperploidia y células binucleadas indican que un mecanismo importante de genotoxicidad causada por esta infección tiene que ver con aneuploidia.
- 4.- No se encontró relación entre la carga parasitaria y el daño genotóxico.
- 5.- No se encontró relación entre la respuesta inmunológica y el daño genotóxico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aluja A, Escobar F, Escobedo F, Flisser A, Lacleste P, Larralde C, Madrazo I, Velázquez V y K Willms (1987). Cisticercosis una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de Cultura Económica, pp 98-99.
2. Clinton AW , Robinson F y R Kuhn (1997). *Taenia solium* Cysticercosis: Host- Parasite Interactions and the Immune Response. *Chemistry immunology* 65: 209-223.
3. Correa D, Tovar A, Espinoza B, Plancarte A y A Flisser (1989). Cisticercosis Humana: relación inmunológica huésped-parásito. In: Flisser A and Malagón F (eds): Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. CONACYT y Ed. Limusa-Noriega. Pp 31-43.
4. Craig BT (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
5. Dellarco VL, Mavoumin KH y Tice RR (1985). Aneuploidy: Etiology and Mechanisms. Plenum Press New York Pp 134-145.
6. Del Bruto HO, Castillo RP, Mena XI y Amada MD (1997). Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. *Arch. Neurol* 54:1125-1128.
7. Epstein J Charles (1986). The consequences of chromosome imbalance principles, mechanism, and models . Cambridge University Press Pp 84-90.
8. Flisser A, Willmsk, Lacleste JP y C Larralde (1982). CISTICERCOSIS: Present State of Knowledge and Perspectives. In: Schenone H, Villarroel F, Rojas A y Ramírez R. (eds) Epidemiology of Human Cysticercosis in Latin American. Academic Press. Pp 25-39.
9. Flisser A, Madrazo I y Delgado E (1997). Cisticercosis Humana. Manuel Moderno, México, Pp176.
10. Flisser A, Gonzales D, Plancarte A, Ostrosky P, Montero R, Stephano A y Correa D (1990). Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunologica and cytogenetic studies. *Parasitology Research*, 76:640-642.
11. Flisser A y F Malagón (1989) Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa Pp 102.
12. Ford HJ, Schulttz JC y TA Correll (1988). Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hiploidy. *Am. J. Hum. Gene.* 43:733-740.
13. Gordon LI y SA Weitzman (1988). The respiratory burst and carcinogenesis, In: A.J. Sbarra and R.R Satrus (Eds). The respiratory burst and its physiological significance, Plenum., New York, Pp 277-298.

14. Gentile JM y JG Gentile (1994). Implication for the involvement of the immune system in parasite-associated cancer. *Mutat Res* 305:315-230.
15. Herrera A, Santiago P, Rojas G, Salazar P, Tato P, Molinari JL., Schiffmann D y P Ostrosky (1994). Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestodo. *Mutat Res* 305: 223-228.
16. Hans MA (1995). Fibrosarcomas in two rats arising from hepatic cystic of *Cysticercus fasciolaris*. *Vet. Parasitol* 32:441-444.
17. Holliday R (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* 282-304.
18. Hollstein MD, Sidransky, D, Vogelstein B, y CC Harris (1991). p53 Mutations in human cancers, *Science* 235:49-53.
19. Ishii A, Matsuoka H, Aji T, Ohta N, Aromoto S, Wataya Y y Hayatsu H (1994). Parasite infection and cancer: with especial emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. *Mutat Res* 305:273-281
20. Ilynskikh EN, Logvinov. VS, Rodicheva NS, Lepekhin AV y NN Ilynskikh (1997). Mutagenic and carcinogenic properties of one of the trematodes *Opisthorchis felineus*. *Journal of BUON* 4:367-372.
21. Jones PA, Buckley BE, Henderson BE, Ross RK y MC. Pike (1991). From gene to carcinogen: A rapidly evolving field in molecular epidemiology, *Cancer Res* 51:3617-3620.
22. John IG, Goldstein I, y R Snyderman (1992). Inflammation basic principles and clinical correlates. Raven press New York Pp.174
23. Jannink. G, Duplantier B, y JL Sikorav (1996). Force on chromosomal DNA during anaphase. *Biophysical journal* 71:451-465.
24. Kirby GM, Pelkonen P, Vatanaspt V, Camus AM, Will CP y M Lang (1994). Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in males hamster liver. *Molecular carcinogenesis* 11:81-89.
25. Kirsch RI (1993). The causes and consequences of chromosomal aberration. Boca raton Crc Press Pp 554
26. Kuby J (1994). Immunology. United States of America Press New York Pp 297-320.
27. Lazutka JR (1996). Genetic toxicity of cytokines. *Mutat Res* 361: 95-105.
28. Mastrangelo AJ y JM Betenbaugh (1998). Overcoming apoptosis: new methods for improvig protein-expression systems. *Reviews Trends biotechnol* 16 (2) 88-95.

29. Machnicka B y J Grzybowski (1986). Host serum proteins in *Taenia saginata* metacestode fluid. *Vet Parasitol* 89:49-54
30. Mitchell GL, Goding JW y MD Rickard (1977). Studies on immune response to larval cestodes in mice increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyroid mice to *Taenia taeniaeformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Austr J Esp Biol. Med Sci* 55: 165-186.
31. Molinari, JL, Tato P, y Y Valles (1987). Inmunodepresión de linfocitos T en cerdos, modulada por *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Lat-amer. Microbiol* 29: 293-300.
32. Montero R, Gentile JG, Frederick L, MacMacniss J, Murphy T, Silvia G, Blankespoor H, and MJ Gentile (1999). Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis* 14:101-104.
33. Montero R, Flisser A, Madrazo Y, Cuevas C y P Ostrosky (1994). Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. *Mutat Res* 305:181-188.
34. Montero R, Serrano L, y P Ostrosky (1997). In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: The use of BrdU as a proliferation marker. *Mutat Res* 39:135-141.
35. Murray A and T Hunt (1993). The cell cycle. Oxford University. Press. NY Pp 153-154
36. Müller U V and Streffer C (1994) Micronucleus Assays en: Obe G (eds) *Advances in mutagenesis research* 5 Berlin, Heidelberg. NewYork Singer-Verleg Pp. 1-32.
37. Ohshima H y Bartsch H (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305: 253-264.
38. Ostle B and Malone LC (1988). *Statistics in research*. Press University State/AMES Pp. 65-66
39. Painter RB (1980). A replication model for sister chromatid exchange. *Mutat Res* 70:237-341
40. Plancarte A, Flisser A y WM Lightowler (1999). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using nature and recombinant oncosphere antigens. *International Journal Parasitology* 29: 643-647
41. Perry P y S Wolff (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (Londs)* 251:156-158.
42. Parry M.J, Parry M, Bourer R, Doherty A, Ellard S, Odonovan J, Hoebee B, Stoppelaar MJ y RG Mohn (1996). The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutat Res* 355:11-46.
43. Rosin PM, Wagida A. y JA Ward (1994 a). Inflammation chromosomal instability, and cancer: the Schistosomiasis model. *Cancer Reserarch (Suppl.)* 54, April 1,1929-1933
44. Rosin PM, El Don Zaki SS y AA. Wagida (1994 b). Involvement of inflammatory reactions and

- elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat. Res.* 305:283-292.
45. Rudin MC, Craig B y MD Thompson (1997). Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.* 48:267-281.
 46. Sarti E (1997). La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud pública de México* 39: 225-231.
 47. Silverman PH (1954). Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia solium*. The morphology and development of taenid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. *Annals of tropical medicine and parasitology* 48:356-366.
 48. Taylor H J (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetic* 43:515-529.
 49. Tolbert PE, Shy CM y JW Allen (1992). Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 27: 69-77.
 50. Tomei LD y FO Cope (1994). Apoptosis II The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America Pp 1-5.
 51. Tsang V, Brand JA y A Boyer (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoproteins antigens for diagnosis human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Inf Dis* 159:50-59.
 52. Villagrán JV y R Olvera (1989). La cisticercosis en el material de autopsia del hospital General de México. pp 97-107. In: Flisser A y Malagón Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.
 53. Yoshino K (1933). Studies on the post embryonal developments of *Taenia solium* *J. Med ASS Formosa* 32:166-169.
 54. Warren W, Biggs PJ, el-Baz M, Ghoneim MA, Stratton MR y S. Vennitt (1995). Mutation in the p53 gene in schistosomal bladder cancer: a study of 92 tumours from Egyptian patients and comparison between mutational spectra from schistosomal and no-schistosomal urothelial tumours. *Carcinogenesis* 16:1181-1189.
 55. Wendt E (1959). Lebendbeobachtungen an bestrahlten Interphasekernen. *Z. Zellforsch* 49:677-689.
 56. Weinberg AR (1996). How cancer arises. *Scientific american*. Sep Pp 62-70.
 57. WHO/ IARC (1994). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol.61 Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*,. IARC, Lyon, France

Tablas

Tabla. 1 Frecuencia de células poliploides, e intercambio de cromátidas hermanas.

Cerdo N°	F.p.1as	F.p.2das	F.p.3as	ICH	Carga par.	Viabilidad	No. de bandas.
14	0.25	0.25	0.00	2.52	378	0.00	2
22	0.00	0.00	0.00	2.24	605	7.14	5
15	0.00	0.00	0.00	2.12	17	0.00	0
19	0.47	0.00	0.47	2.04	377	0.00	6
2	0.00	0.69	0.00	2.04	121	39.67	6
11	0.53	0.00	0.00	1.96	176	0.00	N.D.
4	1.84	0.00	0.00	1.92	330	100.00	0
12	0.00	0.00	0.00	1.80	16	100.00	N.D.
9	0.00	0.48	0.00	1.78	25	100.00	N.D.
25	0.00	0.00	0.00	1.76	27	3.70	3
23	0.44	0.00	0.00	1.66	0	11.40	6
5	1.42	0.00	0.00	1.65	323	56.66	0
20	0.00	0.00	0.00	1.61	83	98.47	6
1	0.00	0.00	0.00	1.58	50	6.00	1
24	0.00	0.00	0.00	1.54	147	1.36	4
8	0.00	0.00	0.00	1.50	14	97.05	4
6	0.00	0.00	0.00	1.50	237	76.60	4
3	0.00	0.00	0.00	1.45	327	66.36	0
18	0.49	0.24	0.00	1.40	37	92.86	4
17	0.00	0.00	0.00	1.32	20	56.14	4
13	0.00	0.00	0.00	1.28	72	0.00	2
26	0.23	0.00	0.00	1.24	14	85.19	0
16	0.00	0.00	0.25	1.20	57	14.29	0
21	0.00	0.00	0.00	1.12	51	64.71	5
7	0.00	0.00	0.00	1.09	154	0.00	4
10	0.27	0.00	0.27	0.00	38	100.00	N.D.
PROMEDIO	0.23	0.06	0.04	1.59	142.15	45.29	3.00
DESV.EST.	0.45	0.17	0.11	0.48	157.33	42.19	2.29
Controles							
C2	0.00	0.00	0.00	1.60	0	0	0
C5	0.00	0.00	0.00	1.58	0	0	0
C8	0.24	0.00	0.00	1.33	0	0	0
C4	0.00	0.00	0.00	1.31	0	0	0
C7	0.00	0.25	0.00	1.24	0	0	0
C6	0.00	0.00	0.00	1.23	0	0	0
C3	0.00	0.00	0.00	1.20	0	0	0
C1	0.00	0.00	0.00	1.18	0	0	0
PROMEDIO	0.03	0.03	0.00	1.33	0	0	0
DESV.EST.	0.08	0.09	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00

ICH intercambio de cromátidas hermanas; F.p. 1as, 2das y 3as, frecuencia de células poliploides en primera, segunda y tercera división; N.D., no determinado; Carga par., carga parasitaria de cisticercos de *Taenia solium*; No. bandas., número de bandas antigénicas reconocidas por el método de Tsang (1989)

Tabla 2. Promedios de frecuencias de células poliploides y de ICHs en cultivos de linfocitos de sangre entera agrupados por agente inmunógeno.

Ag.inmuno.	F.p.1as	F.p.2das	F.p.3as	ICH	Carga para.	No. banda.	Viabilidad
AIF	0.46	0.17	0.00	1.75	169.25	3.25	53.01
	0.92	0.35	0.00	0.28	118.93	3.20	39.01
SAPONINA	0.00	0.00	0.00	1.36	211.33	4.00	51.8
	0.00	0.00	0.00	0.23	179.88	0.00	48.85
ALUMBRE	0.95	0.12	0.00	1.53	168.5	2.00	74.76
	0.66	0.17	0.00	0.18	218.5	2.83	25.6
VW2-1-T.s.	0.16	0.00	0.16	1.58	153.67	5.67	54.39
	0.27	0.00	0.27	0.44	150.96	0.58	50.04
TCA-2-MBP	0.13	0.00	0.00	1.69	262.2	3.60	21.76
	0.20	0.00	0.00	0.37	229.79	2.30	35.66
ARO-T.o.	0.05	0.05	0.05	1.69	39.4	1.60	14.09
	0.11	0.11	0.11	0.60	25.13	1.67	24.31
ONC-T.s.	0.20	0.12	0.07	1.39	17.25	N.D.	59.5
	0.25	0.24	0.13	0.93	12.58	N.D.	49.27
CONTROLES	0.03	0.03	0.00	1.33			
	0.08	0.09	0.00	0.17			

Número en negritas, promedio; desviación estándar en blancas; AG. Inmuno., agente inmunógeno; ICH intercambio de cromátidas hermanas; F.p. 1as, 2das, y 3as., frecuencia de células poliploides en primera, en segunda y en tercera división; Carga par., carga parasitaria; No. bandas., número de bandas antigénicas reconocidas; N.D., no determinado; VW2-1-T.s., antígeno B recombinante de *T. solium*; TCA-2-MBP., proteína recombinante de cisticerco de *T. crassiceps*; ARO-T.o., antígeno recombinante de oncosferas de *T. ovis*; ONC-T.s., oncosferas de *Taenia solium*

Tabla 3. Frecuencia de anomalías nucleares por animal individual

Cerdos	I.Mc	Frec.MN	Frec. PN	Frec. BN	Carga par.	Viabilidad	No. de bandas
INFECTADOS							
I24	0.31	0.00	3.81	3.05	147	1.36	4
I15	0.34	0.00	0.87	1.34	17	0.00	0
I8	0.42	0.49	0.00	0.99	377	71.60	4
I23	0.47	0.50	2.48	0.00	605	11.4	6
I28	0.47	0.52	3.11	1.04	378	85.19	0
I12	0.42	0.57	0.00	1.14	16	100.00	N.D.
I3	0.41	0.58	1.75	1.17	330	66.36	0
I11	0.36	0.67	1.34	0.00	0	0.00	N.D.
I7	0.35	0.69	2.75	2.07	20	0.00	4
I21	0.52	0.95	1.42	0.47	51	64.71	5
I17	0.42	1.14	1.14	0.57	57	56.14	4
I13	0.42	1.15	1.73	0.00	72	0.00	2
I16	0.41	1.18	0.59	0.59	14	14.29	0
I20	0.35	1.38	2.07	0.00	327	98.47	6
I4	0.46	1.55	1.03	0.00	176	100.00	N.D.
I19	0.34	1.91	0.64	0.00	83	0.00	6
I25	0.36	2.00	0.67	0.00	27	3.70	3
I22	0.40	2.30	1.15	0.00	154	7.14	5
I5	0.47	2.46	0.49	0.49	323	56.66	0
I1	0.47	2.59	11.92	4.66	50	6.00	1
I18	0.33	2.77	3.47	0.69	14	92.86	4
I14	0.36	3.93	0.65	0.65	37	0.00	2
I9	0.42	4.03	2.31	1.73	25	100.00	N.D.
I10	0.42	5.74	5.17	1.72	38	100.00	N.D.
I8	0.42	5.77	1.15	0.58	237	97.05	4
I2	0.37	10.23	0.60	4.21	121	39.67	6
PROMEDIO	0.40	2.12	2.00	1.04	142.15	45.29	3.00
DESV.EST.	0.05	2.29	2.38	1.26	157.33	42.19	2.29
CONTROLES							
C1	0.40	0.00	0.00	0	0	0	
C3	0.51	0.00	0.46	0	0	0	
C4	0.60	0.00	0.00	0	0	0	
C5	0.31	0.00	2.34	0	0	0	
C6	0.51	0.00	0.46	0	0	0	
C7	0.37	0.00	0.00	0	0	0	
C8	0.40	0.00	0.00	0	0	0	
C2	0.34	*2.12	1.41	0	0	0	
PROMEDIO	0.43	0.27	0.58	0.00	0.00	0.00	
DESV.EST.	0.10	0.75	0.86	0.00	0.00	0.00	

Mc, índice de marcaje; Frec.MN, frecuencia de micronúcleos; Frec. PN, frecuencia de protrusiones nucleares; Frec. BN, frecuencia de células binucleadas; Carga par, carga parasitaria; N.D., no determinado; No.bandas, número de bandas antigénicas reconocidas.

*Ver discusión.

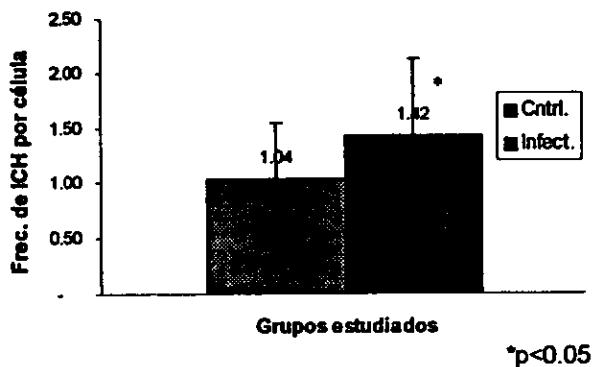
Tabla 4. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de anomalías nucleares agrupados por agente inmunógeno.

Ag. inmun.	Carga par.	Viabilidad	No.bandas	I.Mc	Frec. MN	Frec. PN	Frec BN
AIF	169.25	48.56	3.25	0.43	3.73	3.82	2.51
	118.93	47.63	3.2	0.05	4.41	5.42	2.28
ONC-T.s.	17.75	66.67	N.D.	0.41	2.75	2.21	1.15
	15.97	57.74	N.D.	0.03	2.56	2.19	0.81
ALUMBRE	168.5	74.76	2.00	0.40	2.62	1.98	0.59
	218.5	25.60	2.83	0.10	0.22	2.11	0.14
SAPONINA	211.33	56.22	4.00	0.40	2.32	1.30	1.21
	179.88	50.33	0.00	0.04	2.99	1.38	0.77
ARO-T.o.	39.4	4.76	1.60	0.39	1.48	0.96	0.63
	25.13	8.25	1.67	0.04	1.46	0.49	0.48
VW2-1-T.s	153.67	54.39	5.67	0.40	1.41	1.38	0.16
	150.98	50.04	0.58	0.1	0.48	0.72	0.27
TCA-2-MBP	262.2	32.01	3.60	0.40	1.06	2.24	0.82
	229.79	46.09	2.30	0.07	1.02	1.32	1.33
CONTROLES	0.00	0.00	0.00	0.43	0.27	0.58	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.10	0.75	0.86	0.00

Los números en negritas son promedios; desviación estándar en blancas; Ag.inmun., agente inmunógeno; No.bandas, número de bandas antigénicas reconocidas; Carga par., carga parasitaria; I.Mc, índice de marcaje; Frec. MN, frecuencia de micronúcleos; Frec.BN, frecuencia de células binucleadas; Frec.PN, frecuencia de protrusiones nucleares; N.D., no determinado, VW2-1-T.s., antígeno B recombinante de *T. solium*; TCA-2-MBP, proteína recombinante de cisticerco de *T. crassiceps*; ARO-T.o., antígeno recombinante de oncosferas de *T. ovis*; ONC-T.s., oncosferas de *T. solium*. Adyuvantes: saponina; AIF, adyuvante incompleto de Freund, alumbre.

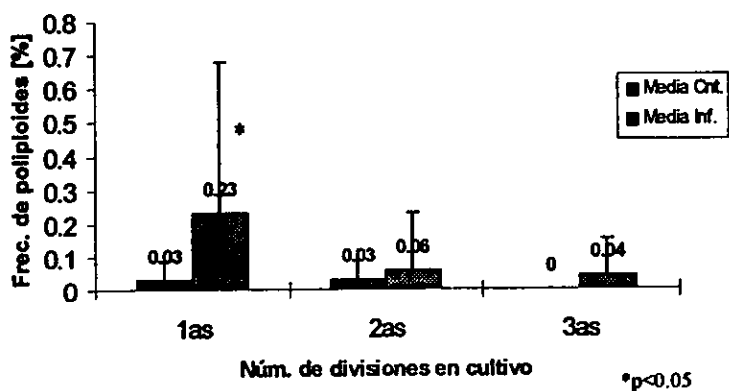
Gráficas

Frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas

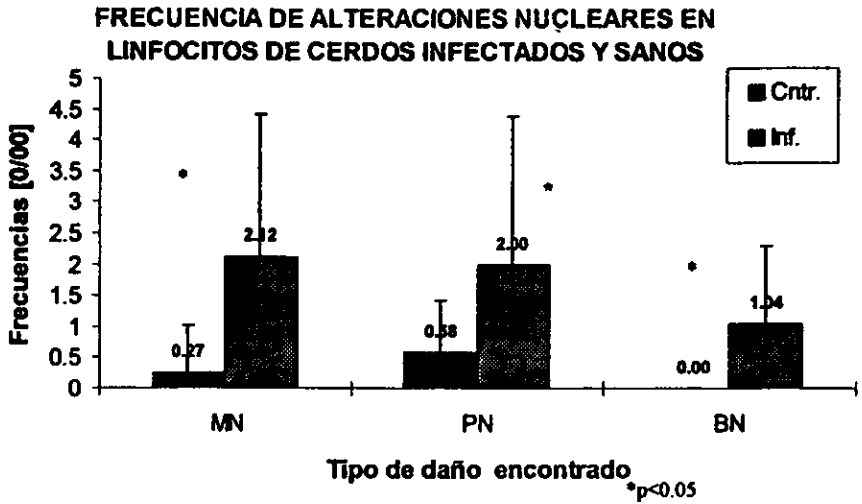


Gráfica 1. Frecuencia promedio de intercambio de cromátidas hermanas por célula.

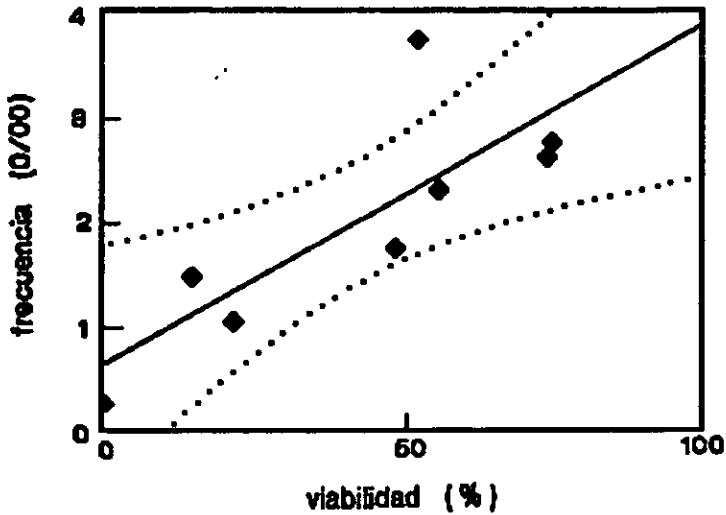
FRECUENCIA DE LINFOCITOS POLIPLÓIDES EN CERDOS INFECTADOS Y SANOS



Gráfica 2. Frecuencia promedio de células poliploides que se dividieron una dos y tres veces en el cultivo.



Grafica 3. Frecuencia promedio de alteraciones nucleares MN micronúcleos; PN protusiones nucleares y BN células binucleadas



Grafica 4.- Correlación lineal entre la viabilidad de la carga parasitaria y la frecuencia de micronúcleos

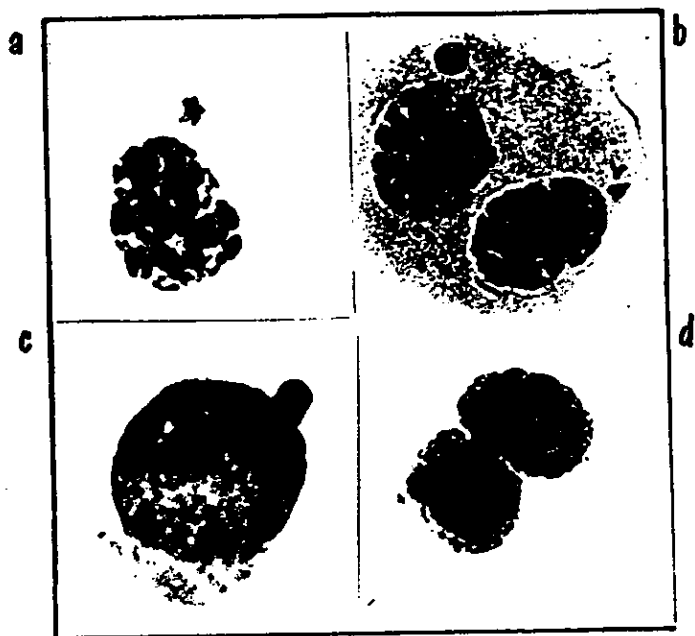


Lámina 2.-Algunas protrusiones nucleares observadas como: a micronúcleos, b células binucleadas con micronúcleo. c protrusiones nucleares y d célula binucleada

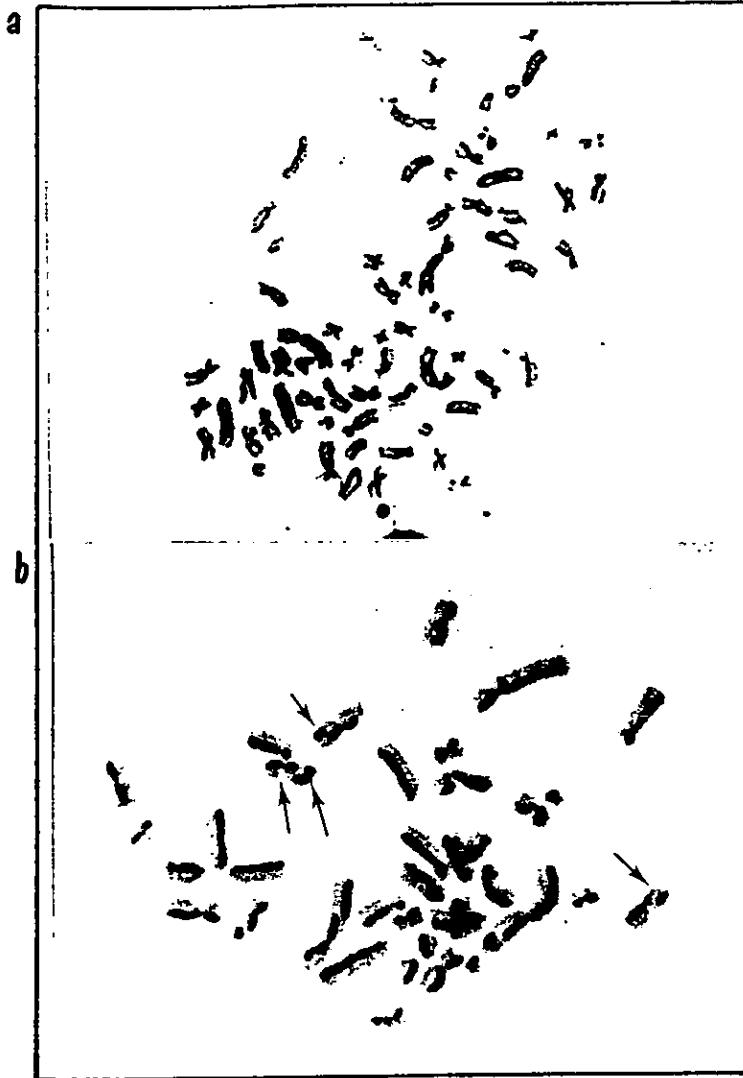


Lámina 1.- a célula hiperploide, con 68 cromosomas, b intercambio de cromátidas hermanas en 2^{da} división.

