

3.6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

"DETERMINACION DEL DAÑO GENETICO Y CELULAR QUE PRODUCE LA CARGA PARASITARIA POR CISTICERCOS DE *Taenia solium* EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE CERDO".

295232

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

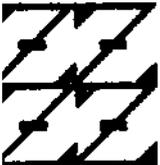
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

FRANCISCO HERRERA VIGENOR

J N A M  
FES  
ZARAGOZA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. REGINA D. MONTERO MONTOYA



LO VOMARDO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

2004



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.

ESTA  
SALIR

DE

LA

ESTA

NO

DEBE

BIBLIOTECA

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Regina D. Montero Montoya por ser tan comprensiva y "aguantadora". Por darme la oportunidad de adentrarme en el vasto campo de la investigación y compartir conmigo sus conocimientos y toda su experiencia académica y personal para fortalecer mi vocación y definir para siempre mi destino en la vida.

A mi familia Francisco, Ma. Luisa, Jesús, Luz, Tía Güera, Armando y Chacho, por su apoyo y sacrificio durante la conclusión de mis estudios y por hacerme comprender que DIOS nos provee de todo para habitar este mundo siempre con una gran sonrisa.

A Antonieta, por compartir conmigo su vida y llenar de amor mi corazón cada día.

A la familia Ortiz Cruz, por su gran apoyo económico y moral, porque sin su ayuda no hubiera podido concluir mis estudios.

A Flor y Luis, por brindarme su amistad sincera y llenar mi alma de anécdotas y buenos momentos.

A Agustín Plancarte, por su amistad y sus sabios consejos.

A mis amigos Román, Heriberto y Julio, por darme la oportunidad de tener su amistad, sus consejos y esas reuniones de fin de semana.

El presente trabajo fue dirigido por la Dra. Regina D. Montero Montoya en el Depto. de Toxicología Genética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

La asesoría técnica corrió a cargo del M.V.Z. Luis Serrano García.

El trabajo fue parcialmente apoyado por la Dra. Ma. Eugenia Gonssebatt B. a través de los proyectos PAPIIT IN 207196 y CONACyT 25377-M.

# INDICE.

## Página.

<b>D) Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>II) Fundamentación teórica</b> .....	<b>2</b>
1) Cáncer y genotoxicidad .....	2
2) Marcadores de efecto genotóxico .....	10
2.1) Aneuploidía .....	11
2.2) Cinética de proliferación celular .....	12
2.3) Micronúcleos .....	13
3) Parásitos, cáncer y genotoxicidad .....	14
4) Aspectos de la infección por <i>Taenia solium</i> .....	17
<b>III) Planteamiento del problema</b> .....	<b>22</b>
<b>IV) Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>V) Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>VI) Material y métodos</b> .....	<b>24</b>
1) Obtención de animales .....	24
2) Obtención de muestras sanguíneas .....	24
3) Cultivo de sangre entera .....	24
3.1) Cosecha .....	25
3.2) Tinción diferencial de cromosomas .....	25
4) Cultivo de células mononucleadas .....	25
4.1) Cosecha .....	26
4.2) Tinción inmunohistoquímica .....	26
5) Determinación de la cinética de proliferación y frecuencia de poliploides .....	27

6)	Determinación del índice de marcaje, frecuencia de micronúcleos y alteraciones	
	Nucleares .....	28
7)	Criterios para la evaluación de cada parámetro .....	29
<b>VII)</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>33</b>
A)	Cultivos de sangre entera .....	33
A.1)	Cinética de proliferación celular .....	33
A.2)	Frecuencia de células poliploides .....	35
B)	Cultivo de células mononucleares .....	37
B.1)	Índice de marcaje .....	37
B.2)	Frecuencia de micronúcleos .....	38
B.3)	Frecuencia de células binucleadas .....	39
B.4)	Frecuencia de protrusiones nucleares .....	40
C)	Correlación entre daño genotóxico y carga parasitaria .....	41
<b>VIII)</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>42</b>
<b>IX)</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>46</b>
<b>X)</b>	<b>Propuestas .....</b>	<b>46</b>
<b>XI)</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>47</b>
<b>XII)</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>48</b>

## **I) INTRODUCCION**

Existen estudios donde se ha demostrado que la infección con el estado larval del parásito *Taenia solium* induce daño genotóxico. Con la finalidad de abrir un poco más el área de investigación y comprobar los datos publicados se realizó el presente trabajo.

En él se trató de establecer el daño genotóxico que producen los cisticercos de *Taenia solium* en una infección natural y si éste tiene relación con la carga parasitaria; para esto se trabajó con tres grupos de cerdos: 1) grupo de cerdos con infección natural; 2) grupo de cerdos seronegativos del lugar de muestreo y, 3) grupo de cerdos seronegativos de granjas tecnificadas. Realizando cultivos de linfocitos de sangre periférica de los grupos de cerdos a 46 y 70 h y utilizando fitohemaglutinina como agente mitogénico, se determinó el índice de replicación (I.R.) y la frecuencia de células poliploides, micronúcleos (MN), células binucleadas (CB) y protrusiones nucleares (PN).

Los resultados obtenidos demuestran un claro decremento en el índice de replicación y un aumento no significativo en la frecuencia de células poliploides; además encontramos daño genotóxico en los linfocitos visto por el aumento en la frecuencia de MN, CB y PT.

No se encontró correlación entre el daño genotóxico evaluado y la carga parasitaria.

## II) FUNDAMENTACION TEORICA

### 1) CANCER Y GENOTOXICIDAD

Los seres vivos superiores constan de millones de células organizadas entre sí para desempeñar funciones especializadas. Para llevar a cabo estas funciones es necesario que tengan un suministro constante de nutrientes, así como también un óptimo equilibrio con su medio ambiente (pH, temperatura, presión osmótica, etc), con la finalidad de que aparte de cumplir con sus funciones, tengan un buen desarrollo y crecimiento.

En las últimas décadas el hombre, al ir avanzando la era industrial, ha creado millones de sustancias que, aunque le permiten realizar una serie de acciones, han roto con el equilibrio de los ecosistemas, llevando al borde de la extinción a numerosas especies animales y vegetales, por falta de nutrientes, de espacio, o por toxicidad. Estas son presiones ambientales que pueden tener efectos irreversibles, no sólo si se produce la muerte de los organismos, sino porque pueden afectar a su material genético (Fig. 1).

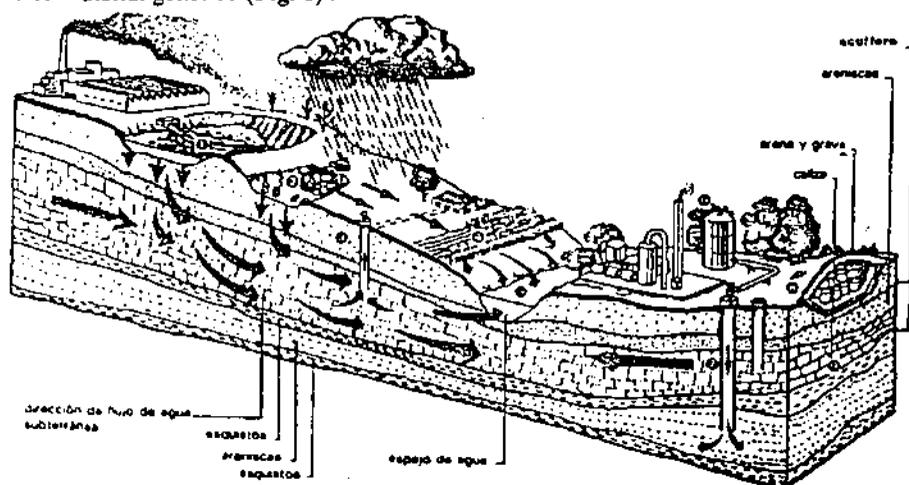


Fig. 1 Ciclo de contaminación ambiental.

Al proceso por el cual una célula sufre alteraciones a nivel genético se le denomina mutagénesis. Una mutación puede alterar de distintas maneras el DNA: puede hacer que varíen sus características físicas o químicas, su susceptibilidad a nuevas mutaciones o su capacidad de replicación o de recombinación. Las mutaciones pueden ser genómicas: cuando el cambio afecta a cromosomas enteros, bien como conjunto (poliploidía, haploidía), bien individualmente (aneuploidía); cromosómicas: cuando el cambio afecta a algún segmento cromosómico más o menos amplio; o génicas: cuando el cambio afecta a un único gen, ya sea en la zona codificadora o en la reguladora (Tabla 1). Estas pueden consistir desde el cambio de un par de bases, hasta la pérdida de un gen completo (Fuentes Arderiu et al, 1998).

MUTACION	TIPOS
PUNTUALES (MICROLESIONES).	SUSTITUCION TAUTOMERIZACION TRANSVERSION CORRIMIENTO DEPURINIZACION
CROMOSOMICAS (MACROLESIONES).	ABERRACIONES CROMOSOMICAS ROMPIMIENTOS ANEUPLOIDIAS

Tabla 1. Tipos de mutaciones.

La alteración de cromosomas ha sido ampliamente estudiada por muchos años y ha sido asociada con malignidades. Estas anomalías citogenéticas son de muchos tipos, se han asociado con la presencia de una gran variedad de agentes y se originan por diferentes mecanismos. En los mamíferos se han encontrado anomalías cromosómicas en una gran

variedad de tipos celulares. Numerosos estudios han determinado que las alteraciones citogenéticas están estrechamente relacionadas con la exposición a químicos, radiaciones ionizantes y no ionizantes y agentes biológicos, y otros estudios han demostrado que la asociación entre alteraciones citogenéticas específicas y algunas tumorigénesis es bastante estrecha (Tucker et al, 1996).

Para que se lleve a cabo una mutación es necesario la presencia de un mutágeno (Farber, 1987) o de ciertas condiciones que la promuevan, como algunos estados fisiológicos de la célula. Estas lesiones al DNA pueden variar dependiendo de la cantidad de pares de bases afectadas. Entre las lesiones más importantes podemos distinguir: 1) Deleción, que es la escisión y pérdida de un segmento de DNA; 2) Duplicación, que es la duplicación de un segmento de DNA; 3) Amplificación que es la multiplicación en tándem de secuencias de DNA; 4) Translocación, que es el cambio de ubicación de un segmento de DNA; 5) Inversión, que es el cambio de 180° en la orientación de un segmento de DNA; y 6) Inserción, que es la introducción de una secuencia de DNA dentro de un gen. Al ocurrir una alteración, en respuesta la célula puede reparar el daño o en caso contrario, este daño queda como una mutación que pasará a generaciones posteriores y puede provocar en las células incapacidad para cumplir sus funciones y estar en armonía con las demás. Aparentemente, el tipo o la intensidad del daño determinará cuál será el futuro de esta célula.

Si el daño en el DNA es muy severo, puede activarse su programa de muerte ó apoptosis. La apoptosis es una cascada de eventos controlados por genes, enzimas y señales bioquímicas internas. Durante el fenómeno de la apoptosis ocurren rompimientos en la doble hebra del DNA nuclear, produciendo fragmentos múltiples de aproximadamente 185 pares de bases, considerando esto como característica principal del evento. Se tienen indicios de que este

rompimiento aparentemente involucra algunos tipos de endonucleasas como la DNAsa I y DNAsa II y probablemente la nucleasa NUC-18. Otros estudios han revelado la existencia de cambios bioquímicos que correlacionan con la inducción de la cascada de eventos apoptóticos en diferentes tipos celulares. Estos son: 1)reflujo de  $Ca^{2+}$  dentro de las células, 2) inducción de transglutaminasa con catalizadores para la formación de enlaces cruzados entre la  $\epsilon$  (  $\gamma$ -glutamil ) lisina y proteínas celulares, 3) disfunción de microtúbulos y reorganización de citoesqueleto, 4) inducción de la expresión de la calmodulina, 5) pérdida de la asimetría de los fosfolípidos membranales, 6) activación del receptor de superficie Fas/Apo 1, 7) activación de la proteína quinasa-C y 8) inducción de una esfingomielinasa neutral. La apoptosis puede ser estimulada u ocasionada por un gran número de agentes o eventos que incluso se desarrollan durante la diferenciación de los tejidos. Entre los más importantes tenemos: 1) deficiencia de factores de crecimiento y hormonas requeridas para la sobrevivencia celular, 2) exposición celular a TGF- $\beta$ , factor de necrosis tumoral y glucocorticoides y 3) exposición a agentes que dañan el DNA como los antineoplásicos, toxinas ó factores ambientales (Martín et al, 1994; Vaux et al, 1993; Collins et al, 1993).

Es muy común que se presente en plantas, insectos, hongos y vertebrados. Durante este proceso la célula sufre una serie de cambios, entre los más importantes tenemos la pérdida de volumen cromatínico, la condensación de los organelos citoplasmáticos y la distorsión y alteración de la membrana celular, llevando esto a la formación de cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados (Fig. 2) (Duke et al ,1996; Cohen, 1993; Seamus et al, 1994, Mastrangelo et al, 1998).

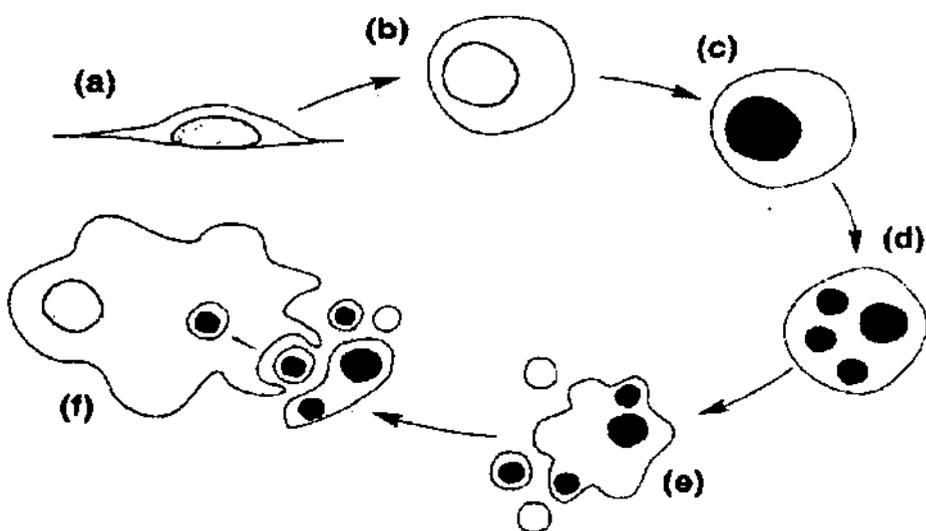


Fig. 2. Apoptosis. a) Célula normal, b) Fragmentación del DNA dentro del núcleo, c) Condensación del DNA, d) Masas discretas de cromatina condensada dentro de la célula, e) Fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, f) Reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por macrófagos para ser fagocitados.

La otra posibilidad, cuando una célula es dañada, es que se transforme en cancerosa. La carcinogénesis es un proceso muy complejo que implica múltiples pasos en los que participan diversos eventos mutacionales capaces de alterar progresivamente la regulación de la proliferación celular hasta alcanzar el caos de la neoplasia invasora y metastásica (Cohen et al, 1990). La importancia de los proto-oncogenes y de los genes supresores de tumores en el control del ciclo celular se ha empezado a entender sólo recientemente, pero se ha encontrado que la alteración de su regulación o de sus funciones es de gran relevancia para el desarrollo del cáncer. Los genes supresores de tumores se clasifican en dos clases: clase I y clase II. Los genes de la clase I se encuentran mutados o no se encuentran en los tumores debido a eventos de delección o a pérdidas cromosómicas, como es el caso de los genes Rb y p53. Los genes de clase II no se ven alterados a nivel del DNA, sino que la alteración se observa en el fenotipo por cambios en los

niveles de expresión, por ejemplo tenemos a la proteína maspin, integrinas alfa-6, RAR-beta y Mac 25 (Zhang et al, 1998). El origen de las alteraciones se piensa que está en la exposición a agentes xenobióticos, los cuales pueden ser físicos, químicos o biológicos (radiaciones, metales pesados, virus, sustancias químicas, etc.) que están presentes en el ambiente, en el trabajo, en el hogar, en los alimentos, en los medicamentos, etc (Fig. 3).

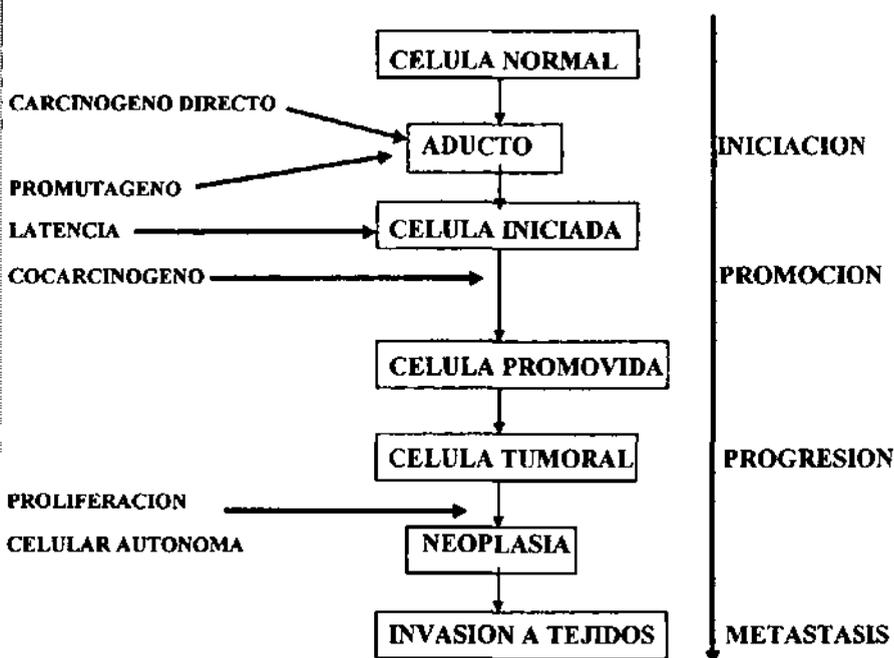


Fig. 3 Carcinogénesis.

Un agente xenobiótico puede ser el iniciador del proceso carcinogénico durante el cual la célula sufre una serie de transformaciones hasta convertirse en una célula con capacidad de proliferación "infinita", originando neoplasias locales o invadiendo el organismo por completo

mediante metástasis. Los agentes xenobióticos podrían actuar también en cada paso de esa transformación (Perera et al, 1993).

En 1985 se detectaron más de 7.6 millones de casos de cáncer siendo el cáncer de pulmón el más común. Existen más de 200 tipos de cánceres malignos de los cuales, en Estados Unidos solo se curan el 45%. El tipo de cáncer que se presenta en cada individuo varía de región a región y es influenciado por factores sociales, nutricionales y ambientales (Tabla 2) (Izquierdo, 1997; Mayne, 1997).

TIPO DE CANCER	FACTORES DE RIESGO
CANCER DE PROSTATA	Edad Dieta rica en grasas
CANCER DE MAMA	Edad Mutaciones en BRCA1 y BRCA2 Menarquia precoz Menopausia tardía
CANCER DE PULMON	Tabaco Exposición laboral a productos químicos Exposición al radón Exposición a radiación
CANCER COLORECTAL	Herencia Falta de ejercicio Dieta pobre en fibra Dieta rica en grasas
CANCER DE VEJIGA	Tabaco Parásitos Exposición a químicos
LINFOMA NO HODGKIN	Inmunosupresión Exposición a herbicidas Exposición a químicos ambientales
CANCER DE UTERO	Promiscuidad sexual Tabaco Relaciones sexuales tempranas
MELANOMA	Exposición al sol Piel blanca
CANCER DE RIÑÓN	Tabaco Exceso de peso Exposición laboral
LEUCEMIA	Anomalías genéticas Exposición a radiaciones ionizantes Exposición a benceno
CANCER DE PANCREAS	Edad Enfermedades crónicas Dieta rica en grasas
CANCER DE OVARIO	Edad Mutaciones en BRCA1 y BRCA2

Tabla 2. Tipos de cáncer y factores de riesgo.

## 2) MARCADORES DE EFECTO GENOTOXICO

El número de agentes xenobióticos (físicos, químicos o biológicos) presentes en el ambiente, la compleja interacción con el DNA y la cromatina de los individuos, la variedad de rutas existentes para la reparación del DNA, la variedad de células y tejidos que pueden desarrollar tumores y la diversidad de tumores que pueden formarse hacen casi imposible asociar el daño genotóxico con el riesgo de algún tipo particular de cáncer (Ostrosky, 1994).

La epidemiología molecular se ha desarrollado como una herramienta de ayuda en la prevención del cáncer, y los últimos avances permiten la evaluación directa en humanos, de la dosis internas de carcinógenos y de la dosis biológicamente efectiva, de los efectos biológicos resultantes y de factores que intervienen en la susceptibilidad individual. A estos parámetros se les llama biomarcadores y los primeros miden exposición, los siguientes, efecto y los últimos son de susceptibilidad (Perera et al, 1993). Los biomarcadores de efecto se proponen como indicadores tempranos de daño, mucho tiempo antes de que se desarrolle la enfermedad, y el propósito de medirlos, además de entender los mecanismos del cáncer, es el poder llegar a prevenir el proceso que conduce a la enfermedad. Como marcadores de efecto genotóxico en humanos se han propuesto las aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas, los micronúcleos, las mutaciones génicas y las alteraciones en la proliferación celular (índice mitótico y cinética de proliferación celular) (Fig. 4) (Norppa, 1997).

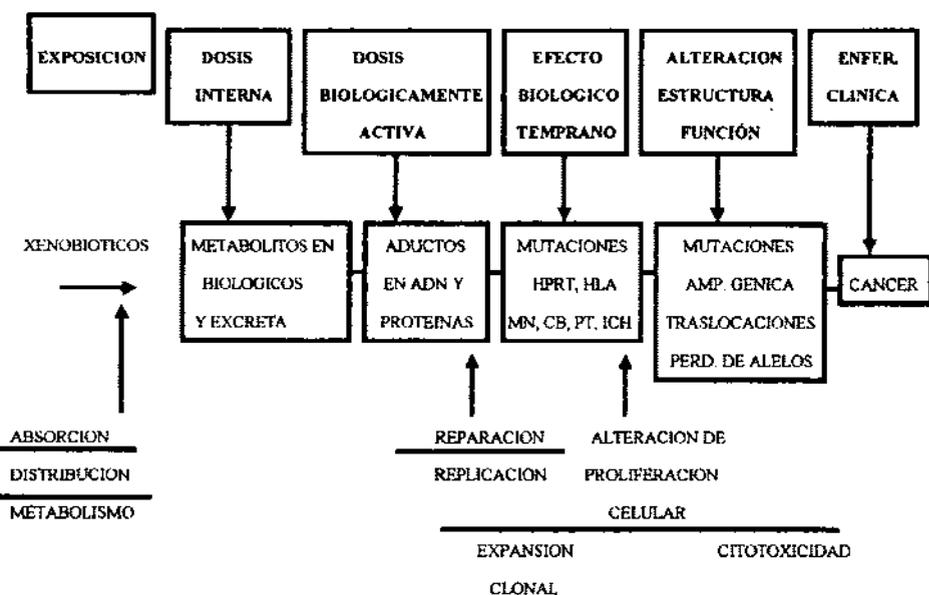


Fig. 4. Biomarcadores utilizados para evaluar individuos expuestos a agentes genotóxicos.

## 2.1) Aneuploidía

La aneuploidía es la alteración en el número de cromosomas presente en el núcleo, que puede resultar en el aumento en el número de copias (hiperploidía) o en su disminución (hipoploidía). Este fenómeno ocurre por una mala segregación durante la mitosis ocasionada por la alteración del huso mitótico y elementos asociados, daño a subestructuras cromosómicas, reordenamientos cromosómicos, alteraciones en la fisiología celular y/o disfunción mecánica. Es muy importante en la patogénesis de diversos padecimientos humanos, pues es la causa de algunos defectos al nacimiento, abortos espontáneos e infertilidad en ciertos individuos. Por otro lado, las células tumorales presentan cambios en el número de cromosomas, y esta alteración

tiene relación con el proceso carcinogénico (Varmus et al, 1993). Los cambios en la ploidía celular, usualmente poliploidía y/o hiperploidía son asociados a una gran variedad de tipos tumorales en estado avanzado. Estas hiperploidías aparentemente ocurren al azar lo que no permite una asociación estrecha entre el número cromosómico encontrado con el tipo de tumor. Se tiene por ejemplo, evidencias de hiperploidías cromosómicas en individuos con carcinoma prostático, con carcinoma de vejiga y en individuos con cáncer de mama primario; por otro lado se ha encontrado trisomía del cromosoma 5 y 8 en células tumorales de hamster Chino (Checar referencia de biology cancer del capítulo Genetic alterations in cancer cells). Las aneuploidías se pueden determinar desde la obtención de metafases y el conteo de cromosomas hasta la utilización de sondas que hibridizan cromosomas de células en interfase. La frecuencia de aneuploidía e incluso qué cromosomas involucra, se puede determinar en cualquier línea celular y potencialmente en cualquier tejido normal, gracias a las técnicas con sondas específicas para cada cromosoma humano.

## 2.2) Cinética de proliferación celular

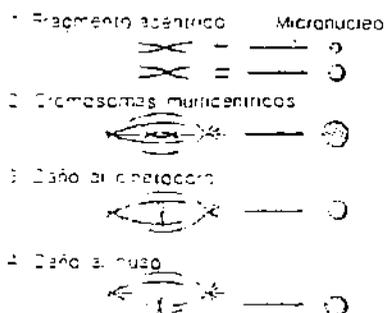
La cinética de proliferación es un parámetro que permite evaluar la capacidad de los linfocitos para proliferar en un cultivo. Su alteración puede deberse a tratamientos que reciben las células en el cultivo, pero diversos estudios (Montero et al, 1994; Herrera et al, 1994; Gonsebatt et al, 1994) han indicado que algunos eventos que ocurren in vivo se reflejan en el cultivo, alterando la capacidad de proliferación de los linfocitos. Esta se puede evaluar a través del índice mitótico y del índice de replicación, utilizando un marcador de la síntesis del DNA, como es el análogo de la timidina, la 5-Bromodesoxiuridina (BrdU). La BrdU se incorpora al DNA durante la fase de replicación, los cultivos se arrestan con un inhibidor mitótico (colcemid)

y se cuentan las metafases al microscopio; el marcaje con BrdU permite identificar metafases de células que han completado uno o más ciclos de división "in vitro", de tal forma que se puede determinar la proporción de las células que se han dividido una, dos o más veces en un determinado periodo de cultivo, con lo que se puede hacer una estimación no sólo de la velocidad de proliferación sino también la duración del ciclo celular en el cultivo (Wolff et al, 1984; Mc Carthy et al, 1990).

### 2.3) Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son porciones de material genético que son segregadas del núcleo celular durante la mitosis. Diversos mecanismos se han propuesto para explicar el origen de los micronúcleos que pueden resumirse en: rompimientos cromosómicos (clastogénesis) o mala segregación cromosómica (aneuploidogénesis) (Fig. 5). Se utilizan frecuentemente para cuantificar la exposición a agentes químicos y a radiaciones. Se pueden observar en muchos tipos celulares como células uroteliales y exfoliativas de mucosa bucal y nasal pero las más utilizadas son las del sistema hematopoyético, linfocitos y eritrocitos. Los MN se pueden observar al microscopio de campo claro utilizando técnicas de tinción que utilizan BrdU y anticuerpos anti-BrdU-DNA (Montero et al, 1997), utilizando timidina tritiada, o por el método de la citochalasin B (Fenech y Morley, 1985), o simplemente por tinción de los linfocitos o de frotis de sangre para ver eritrocitos, con el colorante para ácidos nucleicos Giemsa.

## Origen de Micronúcleos



## Figuras que parecen micronúcleos

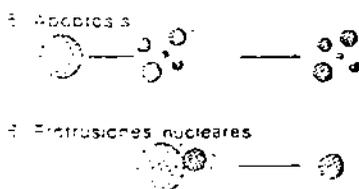


Fig. 5 Tipos de micronúcleos

### 3) PARASITOS, CANCER Y GENOTOXICIDAD

La iniciación de un cáncer se ha asociado con un sinnúmero de factores externos que están en contacto con el individuo, entre ellos se encuentran algunos agentes biológicos de tipo viral, bacteriano y parásitos (Fig. 6). Los mecanismos que dan origen a un cáncer mediado por un agente biológico no viral aún no se han establecido y los que existen todavía son incompletos.

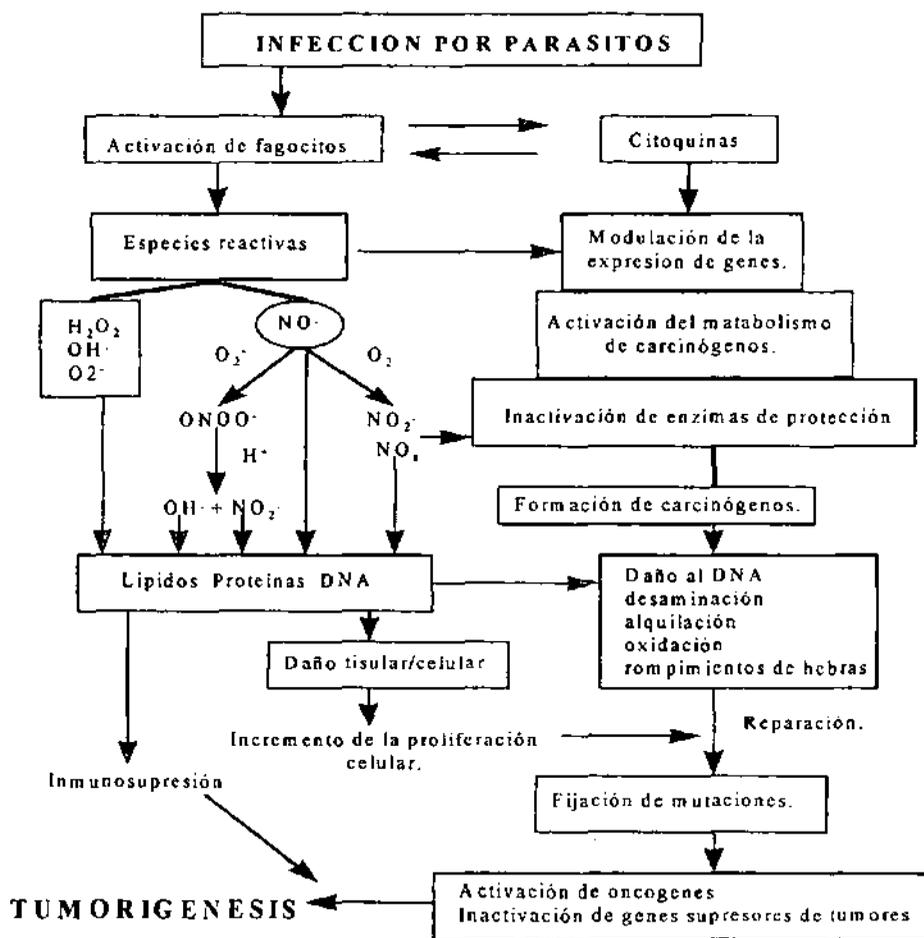


Fig. 6. Mecanismo hipotético de la iniciación de un cáncer mediado por parásitos

En el caso de parásitos, se han identificado varias asociaciones entre la infección por helmintos y diversos tipos de cáncer. Se sabe, por ejemplo, que la infección por cisticercos del céstodo *Taenia taeniformis* en ratas produce fibrosarcomas, la infección por el nemátodo *Spirocerca lupi* en perros se asocia con fibrosarcoma de esófago y sarcoma osteogénico (Hanes,

1995), la infección con el tremátodo *Schistosoma haematobium* se asocia con cáncer de vejiga en humanos, la infección de *Schistosoma japonicum* con carcinoma hepatocelular y/o cáncer colorectal y la infección con los tremátodos *Chlonorchis sinensis* , *Opisthorchis felineus* se asocia con colecistitis, colangiocarcinoma y cancer de hígado, y *Opisthorchis viverrini* se asocian con colangiocarcinoma (Ishii et al, 1994; Ilyinskikh et al, 1997). Se ha propuesto que en estas asociaciones se pudiera iniciar el cáncer a partir del daño producido por una respuesta inflamatoria crónica o por una potenciación en la metabolización de carcinógenos químicos debido a la inducción de enzimas que participan en su metabolismo (Ohshima et al, 1994; Kirby et al, 1994; Montero et al, 1999). Coincidentemente con las lesiones neoplásicas observadas, diversos estudios han demostrado que la infección produce daño genotóxico en la forma de mutaciones génicas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátides hermanas (Rosin et al, 1994; Gentile et al, 1998). Flisser y colaboradores (1990), evaluando el tratamiento con praziquantel para cisticercosis muscular y cerebral en cerdos con una infección natural, estudiaron el potencial genotóxico de la droga. Aunque no encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados, si hallaron un gran número de linfocitos poliploides antes del tratamiento, decreciendo este número después. Se propone la explicación de que el cisticerco evadía la respuesta inmune induciendo daño a las células involucradas en dicha respuesta.

Por otro lado, Montero y colaboradores (1994) evaluaron la frecuencia de mutaciones en el locus de la hipoxantinafosforibosil transferasa (HPRT) en linfocitos de pacientes con neurocisticercosis antes y después de un tratamiento con praziquantel y encontraron que en algunos pacientes la frecuencia de mutaciones era alta antes del tratamiento, al igual que la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (Montero et al, 1997).

En lo que se refiere a cáncer, dos estudios han revelado una posible asociación con neoplasias. El primero menciona la coexistencia de la neurocisticercosis con una diversidad de enfermedades, entre ellas diversos tipos de neoplasias, no obstante en este estudio efectuado en cadáveres, no se estableció si la infección ocurrió antes que el cáncer (Villagrán et al, 1989). En el segundo estudio realizado en pacientes de un hospital neurológico, se encontró que cierto tipo de glioma cerebral se encuentra frecuentemente asociado con neurocisticercosis; no obstante, los datos de este estudio tampoco señalan claramente la asociación, aunque sí es aparente que la infección puede ser un factor de riesgo para este tipo de cáncer (Del Brutto et al, 1988).

#### **4) ASPECTOS DE LA INFECCION POR *Taenia solium***

La cisticercosis y la taeniosis son un grave problema de salud pública en varios países, incluyendo el nuestro, debido a deficiencias en la estructura sanitaria y a la falta de higiene en comunidades donde existen condiciones de marginación y pobreza.

Este problema se presenta principalmente en Asia, Africa y Latinoamérica, donde las más altas frecuencias se han observado en Brasil y en México (Fig. 7) (Sarti , 1997; Shantz et al, 1998).



Fig. 7. Mapa de la distribución de la cisticercosis.

En nuestro país aún no se han cuantificado de manera eficiente las pérdidas humanas y económicas ocasionadas por la enfermedad. Esto debido, en el caso de la cisticercosis porcina, a que no se tiene control total de la distribución nacional de carne de cerdo debido a prácticas clandestinas de sacrificio, y en el caso de cisticercosis humana, debido a las variadas sintomatologías que presentan los pacientes durante la infección, las cuales varían desde casos asintomáticos hasta casos con síntomas muy perceptibles, lo que origina que se tengan datos parciales de la prevalencia de la infección en cerdos y humanos. Se tiene que la cisticercosis porcina ha dejado entre los años de 1980 y 1981 una pérdida de cerca de dos millones de nuevos pesos (Acevedo, 1985) y que la prevalencia de ésta vaya de 1.4 a 4% por palpación de

lengua, y de 4.1 a 7.0% utilizando pruebas inmunoenzimáticas. Para el caso de la cisticercosis humana actualmente se sabe que existen un promedio de 500 nuevos casos anuales, con una tasa cruda de 0.6 por 100 000 habitantes (Sarti,1997).

El ciclo de *Taenia solium* se mantiene cuando el hombre come carne de cerdo infectada con cisticercos, mal cocida o cruda; el parásito evagina y se convierte progresivamente en una taenia adulta (Fig. 8).

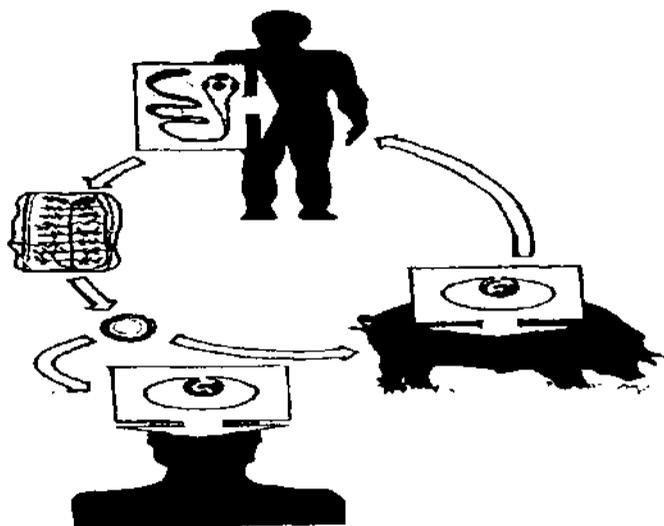


Fig. 8. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

Este proceso ocurre en el canal digestivo del huésped y requiere la presencia de pepsina, tripsina y sales biliares para llevarse a cabo (Flisser y col., 1989). Esta taeniosis tiene un curso muy benigno, o es asintomática; a veces se presenta hambre dolorosa, anorexia, indigestión crónica, periodos alternos de diarrea y constipación, síntomas nerviosos de origen tóxico y eosinofilia del 10 al 12%. Tanto los cerdos como los humanos adquieren la cisticercosis por comer alimentos contaminados con materias fecales humanas que contienen huevos de *Taenia*

*solium* que son liberados con los proglótidos maduros de la taenia adulta. Estos llegan a la luz intestinal y son absorbidos al torrente sanguíneo donde se distribuyen en todo el organismo invadiendo predominantemente tejido cerebral en humanos y muscular en cerdos (Fig. 9). Por la severidad del cuadro clínico que provoca y su alta frecuencia, la cisticercosis cerebral es la entidad clínica más importante de todas las localizaciones conocidas (Flisser y col, 1991). En ocasiones se alojan los cisticercos en sitios poco comunes dando la apariencia de tumores, (O'Grady y col, 1993; Puppín y col, 1993).



Fig. 9. Cisticercos cerebrales.

Uno de los problemas que enfrenta el hospedero es la capacidad que tiene el cisticercos de evadir la respuesta inmune, lo cual le permite crear las condiciones necesarias para su óptimo desarrollo y supervivencia (Flisser, 1988). Esto es una razón de peso para dirigir los estudios hacia una prevención más que a una curación. La respuesta humoral en cerdos es heterogénea debido tanto al tipo como al número de antígenos presentes (Flisser, 1987). Se ha encontrado

que en la superficie y microvellosidades del parásito se adhieren inmunoglobulinas, IgG en su mayoría, seguida de IgA e IgM, también se ha detectado moléculas como el C3b (Wilms et al, 1977; Correa et al, 1985). Estos datos se han obtenido a partir de técnicas inmunodiagnósticas como la inmunolectroforesis y los ensayos inmunoenzimáticos (Tsang et al, 1989; Aluja et al, 1996; Shantz et al 1994; Torres et al, 1992). Con respecto a la respuesta inmune celular se ha visto que intervienen eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas formando conglomerados alrededor del cisticerco; también se ha detectado la presencia de macrófagos fagocitando desechos celulares y corpúsculos calcáreos. El parásito podría estar modulando la respuesta inmune utilizando los siguientes mecanismos: 1) desviación de la respuesta inmune hacia el antígeno B el cual después de secretarse se fija al complemento; 2) enmascaramiento por inmunoglobulinas; 3) liberación de moléculas inmunosupresoras por parte del parásito y 4) localización del parásito en lugares inmunológicamente privilegiados.

### **III) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De los distintos tipos de daño genotóxico mencionados, la poliploidía y/o aneuploidía son fenómenos poco descritos, aunque su importancia en el desarrollo de cáncer recién se empieza a entender, en relación con los genes supresores de tumores y la pérdida de heterocigocidad. En el caso de la cisticercosis parece ser un evento importante en la evasión de la respuesta inmune, como lo propusieron Flisser y cols. (1990), por lo que consideramos importante estudiar este fenómeno en relación con otros parámetros de daño cromosómico y nuclear como son los micronúcleos, las células binucleadas y la apoptosis. Con el fin de caracterizar los aspectos de la infección que podrían influir sobre la magnitud del daño genotóxico, analizamos también la carga parasitaria y el reconocimiento antigénico como evaluación de la respuesta inmunológica.

#### **IV) HIPOTESIS**

La infección por cisticercos de *T. solium* induce daño genotóxico reconocible en los linfocitos de sangre periférica del huésped y este daño está en relación con la carga parasitaria.

#### **V) OBJETIVOS**

##### **1) Objetivo general**

Establecer si existe correlación entre la carga parasitaria y el daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de cerdos infectados con cisticercos de *Taenia solium*.

##### **2) Objetivos particulares**

- a) Evaluar la cinética de proliferación de linfocitos en sangre de cerdos infectados.
- b) Evaluar la frecuencia de linfocitos poliploides en relación con la infección.
- c) Evaluar la frecuencia de micronúcleos en células linfocitarias.
- e) Evaluar otras alteraciones nucleares: proyecciones nucleares, células binucleadas.
- h) Buscar si existe la correlación entre la frecuencia de daño genotóxico de algún tipo y la carga parasitaria.

## **VI) MATERIAL Y METODOS**

### **1) Obtención de animales**

Se obtuvieron 6 cerdos sanos y 9 cerdos infectados del poblado de Ixtitlico, Morelos, donde la seroprevalencia de la infección en cerdos y en humanos era considerable. El diagnóstico de la infección en cerdos se realizó por palpación de lengua y análisis serológico (Western Blot). Para los controles se obtuvieron 6 cerdos sanos de la zona de Xochimilco y se utilizó la técnica de flotación (copros) para descartar infecciones por otros parásitos.

### **2) Obtención de muestras sanguíneas**

A cada cerdo se le extrajeron, en condiciones asépticas, aproximadamente 60 ml de sangre vía yugular utilizando jeringas estériles (Plastipak S.A. de C.V.) que contenían 2 ml de Heparina a una concentración de 1000 UI/ml (PiSA S.A. de C.V.).

### **3) Cultivos de sangre entera**

En un área estéril y con material estéril, se sembraron 0.5 ml de sangre, 1 ml de suero fetal bovino (Gibco), 0.2 ml de una solución de fitohemaglutinina 32  $\mu$ M (Gibco), 11  $\mu$ l de una solución de Bromodesoxiuridina (BrdU) 20.3 $\mu$ M (SIGMA) y medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con aminoácidos esenciales y glutamina hasta un volumen total de 7 ml. Se incubaron a 37°C cultivos por triplicado durante 46h y 70h, por cada cerdo.

### **3.1) Cosecha**

Dos horas antes de terminar cada período de incubación se adicionó una solución de Colcemid a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{cultivo}$  (Gibco) agitando suavemente. Concluido el período de incubación se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se les adicionó 10 ml de una solución hipotónica de KCl. Se incubaron a 37°C durante 30 min. Se centrifugaron nuevamente a 1500 rpm por 10 min. Se realizaron lavados con una solución fijadora de metanol-ácido acético 3:1 hasta que el paquete celular quedó limpio. Se conservó el paquete celular en la solución fijadora a 4°C.

### **3.2) Tinción diferencial de cromosomas**

Se colocaron de seis a ocho gotas de la suspensión de linfocitos en un portaobjetos desde una distancia de 60 cm. Se prepararon dos laminillas por cultivo. Se dejaron secar y se incubaron en una solución de fluorocromo Hoescht 33258 al 1% en la obscuridad durante 30min, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar. Posteriormente se colocaron bajo luz UV embebidas en solución amortiguadora de fosfatos 0.06 M, pH 7.4 durante 2 h. Se enjuagaron en agua destilada y se tiñeron en solución de Giemsa (Merck) al 4% durante tres minutos, se enjuagaron en agua corriente y se secaron. Se montaron con Entellan (Merck).

### **4) Cultivos de células mononucleadas**

10 ml de sangre se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Se extrajo la capa de células blancas de la interfase entre el suero y los eritrocitos, se transfirió a un tubo estéril y se lavaron con medio RPMI 1640 centrifugando a 1500 rpm por 10 min. Después de los lavados se desechó

el sobrenadante y se resuspendió el botón en un volumen conocido de medio RPMI 1640. Se realizó el conteo de células blancas (ver anexo 2). Contadas las células, se transfirieron  $1.5 \times 10^6$  a un tubo estéril, al cual se le adicionó 0.6 ml de suero fetal bovino, 0.2 ml de una solución de fitohemaglutinina y medio RPMI 1640, suplementado con aminoácidos esenciales y glutamina, hasta un volumen de 3 ml. Se prepararon un total de tres cultivos por cada muestra. Se incubaron a 37°C y los cultivos se incubaron por 23 h más.

#### 4.1) Cosecha

Concluyendo el período de incubación se centrifugaron los cultivos a 1500 rpm durante 10 min, se deshechó el sobrenadante y se adicionó 5 ml de solución 0.075M de KCl, inmediatamente después se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. Se deshechó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con solución fijadora hasta que quedó blanco dentro del tubo, centrifugando a 1500 rpm por 10 min durante cada lavado. El paquete celular final se resuspendió en un volumen de 0.5 ml de solución fijadora. Se conservó a 4°C.

#### 4.2) Tinción inmunohistoquímica

Teniendo las células mononucleadas suspendidas en solución fijadora se procedió a colocar de 2 a 6 gotas de esta suspensión en el centro de un portaobjetos desde una distancia de 20 cm, dejando secar al aire. Se preparó una laminilla por cultivo. Una vez secas se precalentaron 10 minutos en PBS (pH 7.1) a una temperatura de 76-80°C y se colocaron en formamida (Sigma) al 40% durante 15 minutos a la misma temperatura; se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos durante dos minutos. Se delimitó la zona de aplicación de anticuerpos con un lápiz graso y se adicionaron 220µl del primer anticuerpo, anti-BrdU (Becton Dickinson),

diluido 1:50. Se incubaron las laminillas en una cámara húmeda a temperatura ambiente por 2 h y se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos. Posteriormente se les adicionaron 220µl del segundo anticuerpo, anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido 1:100. Se incubaron las laminillas en una cámara húmeda durante 30min. Una vez fijados los dos anticuerpos se revela con una mezcla de diaminobenzidina (Sigma) y peróxido de hidrógeno durante 15 min, la cual produce una coloración café en los núcleos que incorporaron BrdU. Finalmente se lavaron con agua destilada tres veces, se secaron y contratiñeron con solución de Giemsa al 4% durante 1 min. Se montaron con Entellan.

### **5) Determinación de la cinética de proliferación y frecuencia de poliploides.**

Una vez teñidos los cromosomas obtenidos de sangre entera se observaron al microscopio 100 metafases por cultivo y se determinó cuántas de ellas estaban en primera, segunda o tercera división, para determinar la cinética mediante la siguiente ecuación.

$$IR = 1(M1) + 2(M2) + 3(M3) / T$$

donde:

IR: Índice de replicación

M1: Metafases en primera división.

M2: Metafases en segunda división.

M3: Metafases en tercera división.

T: Total de metafases observadas.

Con los índices de replicación de los cultivos de 46 h y de 70 h se calculó el tiempo promedio de generación, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{T.P.G.} = (T_2 - T_1) / (IR_2 - IR_1)$$

donde:

T.P.G. : Tiempo de generación promedio.

T2 : Tiempo de cultivo final.

T1 : Tiempo de cultivo inicial.

IR2 : Índice de replicación del cultivo final.

IR1 : Índice de replicación del cultivo inicial.

Para determinar la frecuencia de células poliploides y/o hiperploides se contaron los cromosomas de 100 metafases distinguiendo cuales tenían más juegos cromosómicos de los normales, es decir  $4n$ ,  $6n$ , o bien, un número de cromosomas mayor de 38, sin llegar a completar un número  $n$  adicional.

#### **6) Determinación del índice de marcaje, frecuencia de micronúcleos y alteraciones nucleares**

Una vez teñidas las células mononucleadas con la tinción inmunohistoquímica se determina el índice de marcaje observando 2000 células al microscopio y utilizando la siguiente ecuación:

$$IMc = (C/2000)$$

donde:

IMc: Índice de marcaje.

C: Núcleos cafés observadas.

2000: Total de núcleos evaluados, teñidos de azul o café.

Para la frecuencia de MN y alteraciones nucleares se observan 2000 células cafés y se

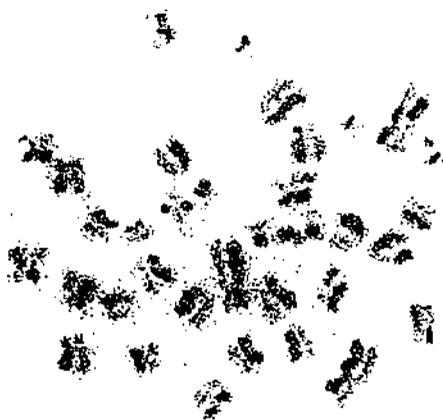
determina la proporción de células que presentan MN y alteraciones nucleares (células  
polinucleadas, protrusiones nucleares).

#### 7) Criterios para la evaluación de cada parámetro

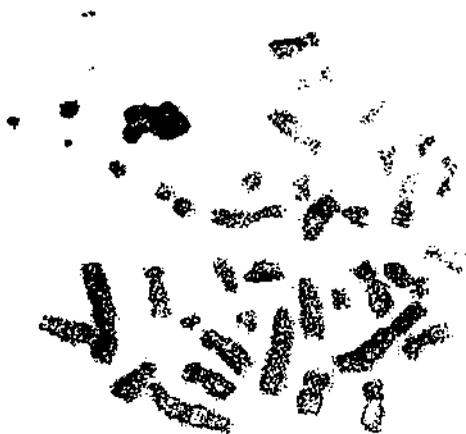
Células en 1ª división: Se observan las dos cromátides teñidas de color morado intenso,  
dado por el colorante de Giemsa.



Células en 2ª división: Se observan los cromosomas en "arlequin", esto es, una cromátide de color morado intenso, dado por el colorante de Giemsa y la otra de color azul pálido dado por la solución de Hoescht y la BrdU incorporada.



Células en 3ª división: En estas la incorporación de BrdU es completa, por lo tanto, las dos cromátides se observan de color azul pálido.



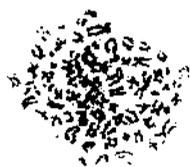
Micronúcleos: Deben tener forma redonda u ovalada; deben tener un tamaño inferior a 1/3 del núcleo principal y tener un color y apariencia igual al del núcleo principal. Su número máximo no se ha establecido, pero depende de que haya un núcleo principal distinguible.



Polinucleadas: Son células que presentan un citoplasma reconocible y dos o más núcleos del mismo tamaño, comparable con el tamaño de las células mononucleadas.



Protrusiones nucleares: Son estructuras redondas u ovaladas, del tamaño y aspecto de los MN, pero asociadas estructuralmente con el núcleo principal, por fragmentos de material que también se tiñe de café en la tinción inmunohistoquímica.

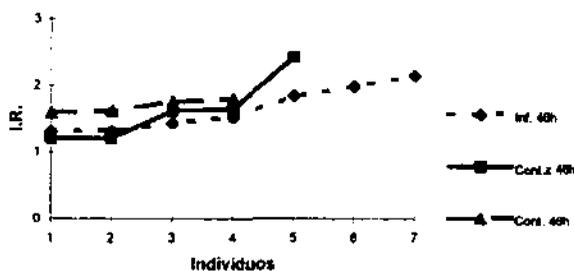


## VII) RESULTADOS.

### A) Cultivos de sangre entera.

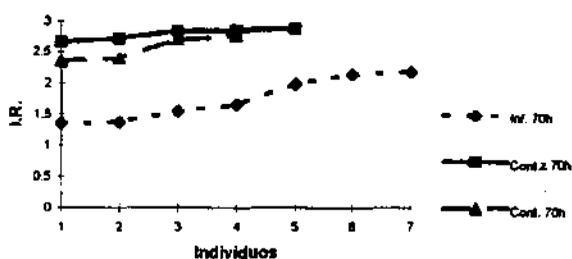
#### A.1) Cinética de proliferación celular.

Se determinó el índice de replicación (I.R.) para cada cultivo de sangre entera. La Gráfica 1 muestra este índice para cada uno de los grupos en cultivos de 46h. La replicación promedio en este tiempo de cultivo es de 1.5 (o lo que se vio en controles sanos) y se observa que no hay variación en los 3 grupos estudiados.



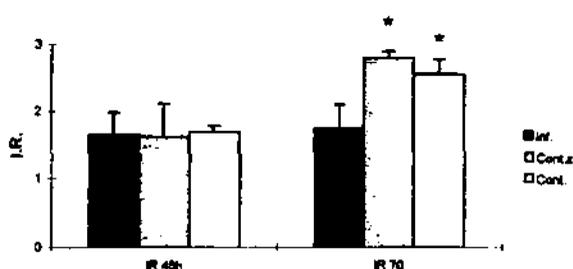
Gráfica 1. Índice de replicación para cultivos de 46h. Inf.-infectados; Cont.z- controles de la zona de muestreo (Ixtilteco); Cont.- controles de granjas tecnificadas. Se gráfico cada cerdo como un punto en cada grupo y se unieron los puntos con líneas para facilitar su comprensión.

Para los cultivos de 70h se procedió de la misma manera; en la Gráfica 2 se observa el índice de replicación para cada uno de los grupos. Mientras que los 2 grupos de cerdos no infectados con cisticercos mostraron el incremento esperado en el índice de replicación, los cerdos infectados mostraron un retraso claramente visible en la gráfica.



Gráfica 2. Índice de replicación para cultivos de 70h. Inf-infectados; Cont.z- controles de la zona de muestreo (Ixtlilco); Cont- controles de granjas tecnificadas.

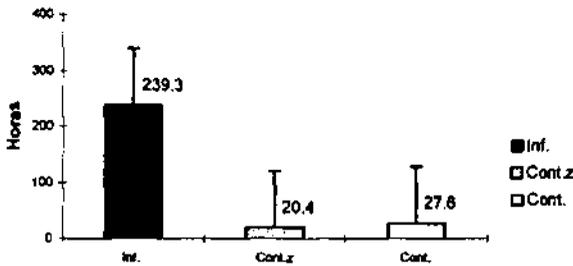
Para hacer el análisis estadístico se determinó el índice de replicación promedio para cada uno de los grupos en estudio. En la Gráfica 3 se muestra el índice de replicación promedio a 46h y 70h.



Gráfica 3. Índice de replicación promedio a 46h y 70h. Inf-infectados; Contz- controles de la zona de muestreo (Ixtlilco); Cont- controles de granjas tecnificadas. \*  $p < 0.05$  al comparar cultivos de 46 y de 70 h.

Comparando el índice de replicación promedio entre grupos, observamos que los cultivos de 46 y 70 h del grupo de cerdos con infección natural no muestran una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), mientras que los cultivos a 46 y 70 h de controles de la zona y de granjas tecnificadas sí muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Con el índice de replicación de cada muestra y el índice de replicación promedio se determinó el tiempo promedio de generación celular (T.P.G.) para cada grupo de estudio. En la Gráfica 4 se muestra dicho promedio.

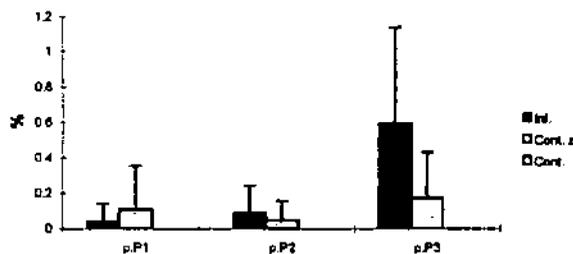


Gráfica 4. Tiempo promedio de generación celular para cada grupo en estudio.

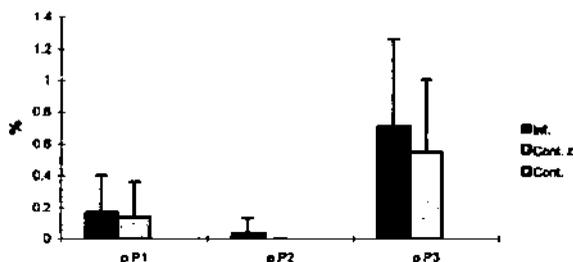
Cuando se calculó el tiempo promedio de generación (T.P.G.) para cada grupo de estudio se encontró que, mientras a los controles les lleva aproximadamente un promedio de 24 h terminar su replicación (20.4 h para Cont-z y 27.6 h para Cont.), a los infectados les lleva aproximadamente 10 veces más del tiempo (239.3 h).

## A.2) Frecuencia de células poliploides.

En los mismos cultivos se determinó la frecuencia de células poliploides y/o hiperploides, distinguiendo si estaban en primera, segunda o tercera división. Esta frecuencia se determinó a 46 h y 70 h. En la Gráfica 5 se muestra la frecuencia de poliploides para cada grupo en cultivos de 46 h. Para los cultivos de 70 h la frecuencia de poliploides se observa en la Gráfica 6.



Gráfica 5. Frecuencia de células poliploides en cultivos de 46h. Inf-infectados; Contz-contróles de la zona de muestreo (Ixtilco); Cont-contróles de granjas tecnificadas. PPx-células poliploides en 1ª, 2ª o 3ª división.



Gráfica 6. Frecuencia de células poliploides en cultivos de 70h. Inf-infectados; Contz-contróles de la zona de muestreo (Ixtilco); Cont-contróles de granjas tecnificadas. PPx-células poliploides en 1ª, 2ª o 3ª división.

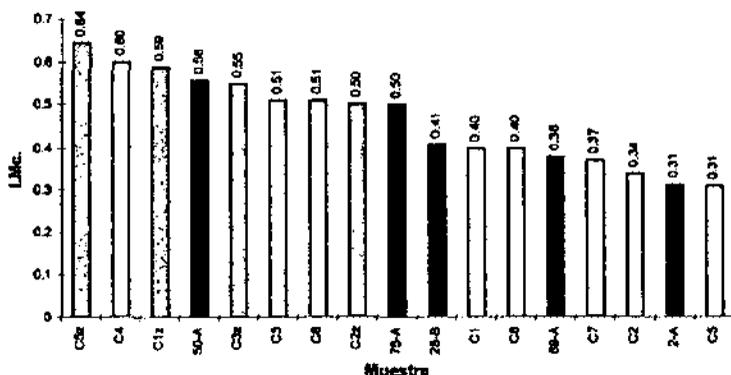
Como se observa en las gráficas aparentemente existe un incremento en la frecuencia de células poliploides, para el grupo de cerdos con infección natural, conforme las células blancas van replicándose. Observe en la Gráfica 5 este incremento en las células de 3ª división significativo para el grupo de cerdos con infección natural ( $p < 0.05$ ); para los controles de la zona, aunque la diferencia no es significativa ( $p > 0.05$ ), sí se observa una pequeña frecuencia durante la replicación. Por otro lado, en la Gráfica 6 observamos que aunque no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), se observa que en tercera división la frecuencia de poliploides es mayor para los grupos de cerdos con infección natural y de controles de la zona. Los cultivos de controles de granjas tecnificadas no presentaron células poliploides.

## B) Cultivo de células mononucleadas.

En estos cultivos se evaluaron núcleos en interfase con tinción inmunohistoquímica; en estas preparaciones se obtiene una coloración café de los núcleos que incorporaron BrdU, contrastando con núcleos teñidos de púrpura con el colorante Giemsa, los cuales no incorporan BrdU.

### B.1) Índice de marcaje.

Se utiliza para estimar la capacidad de proliferación de las células en el cultivo. Se determinó mediante la frecuencia de células marcadas con BrdU entre un total de 2000 células observadas. La Gráfica 7 muestra el índice de marcaje para cada muestra analizada.



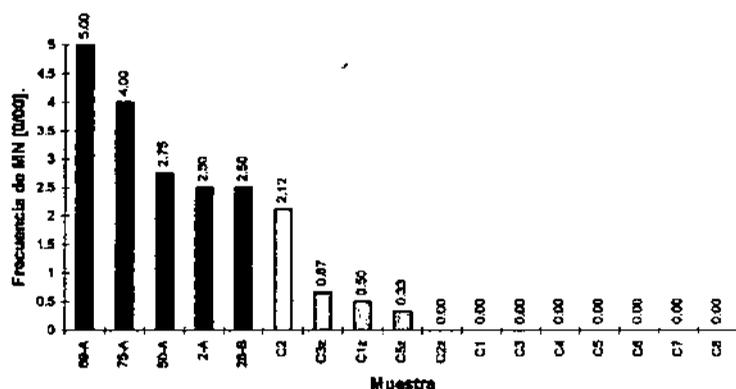
Gráfica 7. Índice de marcaje por muestra. La clave numérica seguida por un guión y una letra corresponde a las muestras de los animales infectados; la letra C en la clave de cada animal estudiado se refiere a que son controles; la z al final de cada clave indica que las muestras son controles de la zona de muestreo (batilco).

Como se puede observar no existen diferencias significativas entre muestras (Prueba de

Kruskal Wallis).

## B.2) Frecuencia de micronúcleos.

Se determinó la frecuencia de micronúcleos para cada muestra mediante la observación de 2000 células café. La frecuencia encontrada en cada animal se representa en la Gráfica 8.

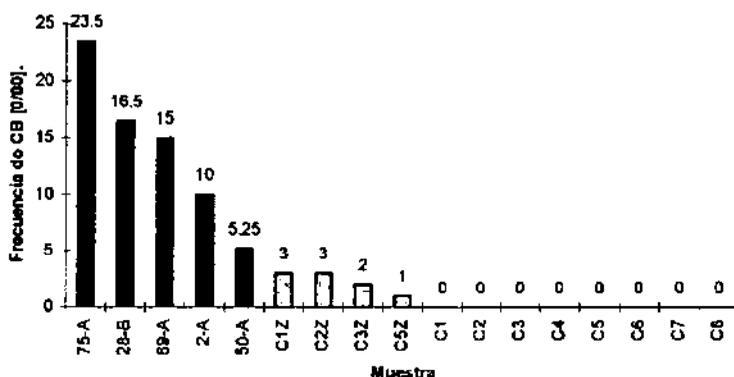


Gráfica 8. Frecuencia de micronúcleos para cada muestra. La clave numérica seguida por un guión y una letra corresponde a las muestras de los animales infectados; la letra C en la clave de cada animal estudiado se refiere a que son controles; la z al final de la clave indica que son controles de la zona de muestreo (Ixtilco).

Como se puede observar existe una diferencia significativa (Prueba de Kruskal Wallis) entre el grupo de cerdos con infección natural, el grupo de controles de la zona y el grupo de controles de granjas tecnificadas. Entre los grupos de controles no hay diferencia significativa alguna (Prueba de Kruskal Wallis).

### B.3) Frecuencia de células binucleadas.

En la gráfica 9 se observa la frecuencia de células binucleadas determinado por la observación de un total de 2000 células cafés por cada animal.



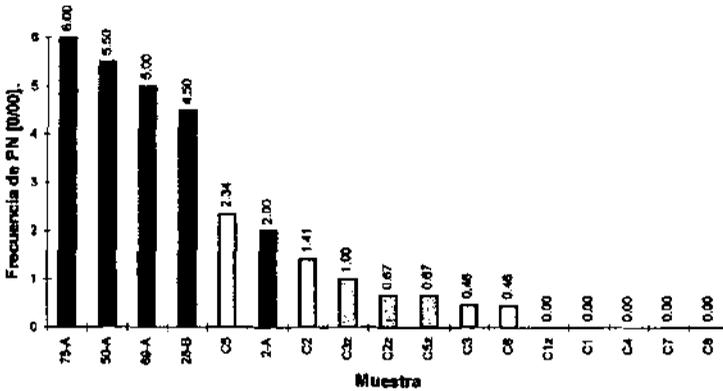
Gráfica 9. Frecuencia de células binucleadas, evaluada en cada muestra. La clave numérica seguida de un guión y una letra corresponde a las muestras de los animales infectados; la letra C en la clave de cada animal estudiado se refiere a que son controles; la z al final de la clave indica que son controles de la zona de muestreo (Ixtilco).

Como se observa en la Gráfica 9 existen diferencias significativas (Prueba de Kruskal Wallis) entre el grupo de infectados y los grupos de controles de la zona y de granjas tecnificadas.

#### B.4) Frecuencia de protrusiones nucleares.

Se observaron 2000 células cafés y se determinó la frecuencia de protrusiones nucleares.

La Gráfica 10 muestra esta frecuencia.



Gráfica 10. Frecuencia de protrusiones nucleares de cada muestra analizada. La clave numérica seguida de un guión y una letra corresponde a las muestras de los animales infectados; la letra C en la clave de cada animal estudiado se refiere a que son controles; la z al final de la clave indica que son controles de la zona de muestreo (Ixtilco).

Se determinó que existen diferencias significativas (Prueba de Kruskal Wallis) entre el grupo de cerdos con infección natural, y cada uno de los grupos usados como controles. Entre los controles de la zona y los de granjas tecnificadas no existen diferencias significativas (Prueba de Kruskal Wallis).

### C) Correlación entre daño genotóxico y carga parasitaria.

La Tabla 1 muestra los datos de genotoxicidad encontrados (CB, MN, PN) para cada una de las muestras y la cantidad de cisticercos presentes en el cerdo así como también el tipo de banda identificada.

Muestra	CB	MN	PN	I.Mc	# Cisti.	Banda
50-A	5.25	2.75	5.5	0.557	0	18
75-A	23.5	4	6	0.49975	0	42
2-A	10	2.5	2	0.31375	1	42, 24
28-B	16.5	2.5	4.5	0.40975	0	42
69-A	15	5	5	0.3795	0	24, 13, 14
Cz1	3	0.5	0	0.58738	0	Ning.
Cz2	1	0	0.67	0.50133	0	Ning.
Cz3	3	0.67	1	0.5485	0	Ning.
Cz5	2	0.33	0.67	0.6445	0	Ning.
C1	0	0	0	0.4	0	Ning.
C2	0	2.12	1.41	0.34	0	Ning.
C3	0	0	0.46	0.51	0	Ning.
C4	0	0	0	0.6	0	Ning.
C5	0	0	2.34	0.31	0	Ning.
C6	0	0	0.46	0.51	0	Ning.
C7	0	0	0	0.37	0	Ning.
C8	0	0	0	0.4	0	Ning.

Tabla 1. Datos de los parámetros de genotoxicidad encontrados complementados con los datos de cisticercos encontrados y bandas identificadas. Las claves numéricas seguidas de un guión y una letra corresponden a los Inf., la C corresponde a los controles de granjas tecnificadas y la z al final definen los controles de la zona de muestreo, CB (células binucleadas), MN (micronúcleos), PN (protrusiones nucleares), I.Mc (índice de marcaje).

No se encontró correlación entre el daño genotóxico y la carga parasitaria ni tampoco relación entre el daño genotóxico encontrado y el tipo de banda identificada por el suero del cerdo.

## VIII) DISCUSION.

El cáncer es un problema a nivel mundial que día a día cobra la vida de miles de individuos, del que aún se desconocen algunos aspectos de los mecanismos que llevan a su iniciación y por ende aún no se comprenden las rutas principales que lleven a su radicación.

Hoy en día existen numerosos estudios que han encontrado una correlación directa y significativa entre parámetros de genotoxicidad como aberraciones cromosómicas, micronúcleos, y ciertas aneuploidías, tóxicos químicos-físicos-ambientales y cáncer. En el caso de parásitos, como tóxicos ambientales, existen pocos estudios, pero en ellos se ha podido establecer una relación estrecha entre la infección crónica en el huésped y la presencia de algún tipo de cáncer (WHO/IARC, 1994).

Para el caso específico de *Taenia solium*, existen trabajos donde demuestran la presencia de daño genotóxico en pacientes y animales cisticercosos e incluso asocian la infección crónica con formas de cáncer (Montero et al, 1997; Flisser et al, 1990; Herrera et al, 1994; Del Bruto et al, 1997).

Por tanto nuestro estudio pretendió ampliar un poco más los conocimientos existentes sobre la relación posible entre la infección crónica inducida por cisticercos de *Taenia solium* y el incremento en la frecuencia de parámetros de genotoxicidad en el huésped, además de observar si este incremento tiene relación con la carga parasitaria.

Tenemos entonces, que al estudiar la cinética de proliferación celular, encontramos un decremento en el índice de replicación para los cultivos de 70 h del grupo de cerdos con infección natural en comparación con los grupos controles que presentaron un índice de replicación normal. Visto de otra manera se tiene que los linfocitos obtenidos del grupo de cerdos con infección natural necesitan diez veces más del tiempo (239.3 h para infectados vs 24 h para controles) utilizado por los grupos controles para replicarse. Esto hace suponer que existe un daño en la

maquinaria que permite la división celular una vez formados los núcleos de las células hijas. Estudios previos (Aluja et al, 1988) describen que la infección crónica por cisticercos de *Taenia solium* deprimen el sistema inmune del huésped, lo que nos hace suponer que los cerdos en estudio, debido a la infección natural, estaban inmunosuprimidos lo que se refleja en el decremento de la replicación de los linfocitos en el cultivo.

Se observó también una pequeña frecuencia de linfocitos poliploides y/o hiperploides en el grupo de cerdos con infección natural y en el grupo de controles de la zona; aunque no significativos ( $p > 0.05$ ) sí corroboran los datos publicados por Flisser et al (1990) encontrados en cerdos con infección natural. Se encontró también que en cultivos de 46 h, del grupo de cerdos con infección natural, la frecuencia de linfocitos poliploides y/o hiperploides se incrementa conforme las células se replican, lo que hace suponer que existe un daño en el linfocito debido a la infección crónica natural del cerdo, que impide una adecuada segregación de los cromosomas. Hablando de aneuploidias, encontramos también un claro incremento significativo (prueba de Kruskal Wallis) en la frecuencia de células binucleadas para el grupo de cerdos con infección natural; este valor fue 7 veces mayor al obtenido por (Martínez F, 2000), lo que nos hace suponer que el tiempo de infección de nuestro grupo de cerdos es un factor determinante en la inducción de este tipo de daño. Podemos decir que el daño se va acumulando en la célula y se expresa durante su proliferación. Conociendo entonces que las células hiperploides y las células binucleadas pueden ser el resultado de alteraciones durante la mitosis y la citocinesis se infiere que el parásito, por mecanismos desconocidos, puede iniciar el daño a nivel de microfilamentos o de microtúbulos.

Al determinar la frecuencia de micronúcleos (MN) y de protrusiones nucleares (PN) se encontró un incremento significativo (prueba de Kruskal Wallis) de estos parámetros en el grupo

de cerdos con infección natural en comparación con los grupos de cerdos controles. Martínez F, (2000) observó también este incremento en cerdos infectados en forma intencional, más jóvenes y con menor tiempo de infección.

La determinación de MN en cualquier tipo de línea celular ha tenido un amplio uso en diferentes estudios que tratan de entablar una relación entre parámetros de genotoxicidad y la presencia de cierto tipo de cáncer. Para el caso de parásitos se ha observado que una infección crónica en el huésped puede producir un daño de tipo genotóxico y éste podría asociarse con cáncer. Se tienen un estudio que sugiere esta asociación, con la presencia del parásito *Schistosoma hematobium* (WHO/LARC, 1994) en pacientes infectados, en los que se encontró un incremento de MN en células de descamación de vejiga, que es el órgano donde se aloja este parásito, preferentemente y donde se produce el cáncer.

En este estudio se encontró daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica en los cerdos infectados con cisticercos de *Taenia solium*. Por los antecedentes que existen, podemos especular que el aumento en la frecuencia de MN encontrado en nuestro estudio podría ser originado de dos formas: 1) por eventos de clastogenicidad iniciados por mecanismos inflamatorios ó 2) por eventos de aneuploidía iniciados por mecanismos no conocidos. Esta hipótesis adquiere más veracidad observando los incrementos encontrados en las frecuencias de células hiperploides y células binucleadas.

El hecho de que el parásito sea el responsable del incremento en los parámetros de genotoxicidad lo corroboran con los datos obtenidos por Martínez F (2000), al correlacionar la frecuencia de MN que ella encontró con la viabilidad de los parásitos obtenidos. No obstante la definición de los mecanismos que provocan este incremento en la frecuencia de los marcadores de genotoxicidad evaluados requiere la realización de estudios posteriores.

No encontramos relación directa entre la carga parasitaria y el daño genotóxico encontrado.

La presencia de anticuerpos en sangre, identificados por Western Blot, demuestran que hubo infección y que su erradicación era reciente; las bandas predominantes fueron la GP24, GP18 y GP42.

En la práctica se ha demostrado que existen jerarquías en el comportamiento social de los cerdos que deambulan libremente lo que impide que todos los cerdos ingieran la misma cantidad de huevos de *Taenia solium*: ingiere más el líder que come más, y el resto ingiere menos (Copado, 1996). Esto, aunado con el dato que existe publicado por Aluja et al (1996) de que la respuesta inmune persiste por más de 5 meses, podría explicar la baja carga parasitaria y la ausencia de cisticercos en los cerdos de estudio. No obstante, la respuesta inmunológica tiene lugar aún cuando sólo haya un cisticerco.

## **IX) CONCLUSIONES.**

- 1.** La infección natural por cisticercos de *Taenia solium* provocó un decremento significativo en el índice de replicación de linfocitos.
- 2.** Encontramos daño genotóxico en los linfocitos de sangre periférica; el cual medimos como MN, PN, CB y células poliploides.
- 3.** El daño encontrado se puede relacionar con mecanismos de alteración por aneuploidía o daño a nivel de microtúbulos o microfilamentos.
- 4.** No se encontró relación entre la carga parasitaria y el daño genotóxico evaluado.

## **X)PROPUESTAS.**

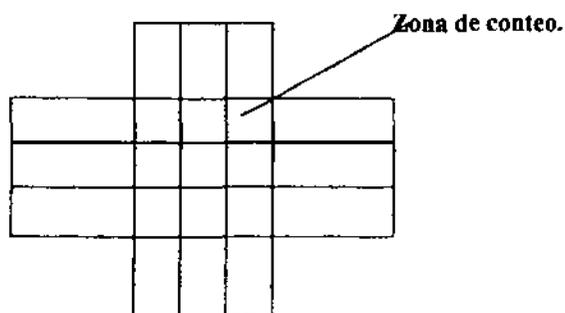
- 1.** Continuar con el estudio y determinar los mecanismos que originan el daño genotóxico encontrado, en un modelo de laboratorio donde la infección, su progresión y duración puedan controlarse.
- 2.** Evaluar diferentes fracciones del cisticercos para encontrar si algunos de ellos provocan el daño genotóxico.
- 3.** Determinar con exactitud en qué sitio de la célula se producen las alteraciones que impiden su estimulación con mitógenos o que completen adecuadamente el ciclo celular.

## XI) ANEXOS.

### Anexo 1. Conteo de células mononucleadas.

Una vez resuspendido el botón de células blancas en un volumen conocido de medio de cultivo se realiza lo siguiente:

Se transfiere una alícuota de 20 $\mu$ l a un tubo no estéril adicionándole 0.9 $\mu$ l de Azul de Tripano (Gibco) y medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) hasta un volumen de 1ml. Se agita la mezcla, se coloca una gota con la ayuda de una pipeta Pasteur en un hemocitómetro y se realiza el conteo de células presentes en los recuadros del hemocitómetro.



Se calcula la cantidad de células blancas presentes en los 20 $\mu$ l mediante la ecuación siguiente:

$$CM = (M/8) \times 10^6 \times (V)$$

donde:

CM: Número de células blancas.

M: No. de células observadas en los recuadros del hemocitómetro.

V: Volumen final de la suspensión de células.

Las células blancas se distinguen fácilmente porque son brillantes, con una coloración amarillenta y de tamaño mayor que los eritrocitos que son translúcidos y de color anaranjado.

## XII) REFERENCIAS.

- Acevedo HA (1985): Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Flisser A, Malagón F (edit): Cisticercosis humana y porcina. Limusa Noriega Editores Méx. Pag. 251-253.
- Aluja A, Vargas G (1988): The histopathology of porcine cysticercosis. Vet. Parasitol. 28: 65-69.
- Aluja A, Villalobos AM, Plancarte CA, Rodarte LF, Hernández M, Sciutto E (1996): *Taenia solium* cisticercosis i pigs: characteristics of the infections and antibody response. Vet. Parasitol. 61: 49-59.
- Coben MS, Ellwein BL (1990): Cell Proliferation in Carcinogenesis. Science 249: 1007-1011.
- Coben JJ (1993): Overview: Mechanisms of apoptosis. Immunology Today 14: 126-130.
- Collins LM, Rivas LA (1993): The control of apoptosis in mammalian cells. Trends Biochem. Sci. 18: 307.
- Copado BF (1996): Estudio del comportamiento del cerdo rural no confinado. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A (1985): Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. Journal of Parasitology 71: 535-541.
- Del Brutto OH, Sotelo J (1988): Neurocysticercosis: An update. Rev. Infect Dis 10:1075-1087.
- Del Brutto OH, Castillo RP, Mena XI, Amada MD (1997): Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. Arch. Neurol. 54: 1125-1128.
- Duke CR, Ojcius MD, Young Ding-E J (1996): Cell suicide in health and disease. Scientific American Dec: 48-55.
- Farber E (1987): Possible etiologic mechanisms in chemical carcinogenesis. Environmental Health Perspectives 75: 65-70.
- Fenech M, Morley A (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research. 147: 29-36.
- Flisser A (1987): Relación huésped-parásito en la cisticercosis humana y porcina. Gaceta Médica Mexicana 123: 157-164.
- Flisser A (1988): Neurocysticercosis in Mexico. Parasitology Today 4: 131-137.
- Flisser A y Malagón (1989). Cisticercosis Humana y Porcina. Su Conocimiento e Investigación en México. Limusa Noriega México.

- Flisser A, Gonzales D, Plancarte A, Ostrosky P, et al (1990): Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. Parasitology Research 76: 640-642.
- Flisser A, Plancarte A, Correa D (1991): *Taenia solium* Cysticercosis : A review. Research and Review in Parasitology 51: 17-23
- Gentile JM, Gentile JG (1998): implication for the involvement of the immune system in parasite-associated cancer. Mutation Research 305: 315-330.
- Gonsebatt ME, Vega L, Montero MR, Garcia VG, et al (1994): Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. Mutation Research 313: 293-299.
- Hanes AM (1995): Fibrosarcomas in two rats arising from hepatic cysts of *Cysticercus fasciolaris*. Vet Pathology 32: 441-444.
- Herrera AL, Santiago P, Rojas G, Salazar PM, Tato P, et al (1994): Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. Mutation Research 305: 223-228.
- Ilyinskikh N E , Logvinov V S, Rodicheva S N, Lepekhin V A, Ilyinskikh N N (1997): Mutagenic and carcinogenic properties of one of the trematodes - *opisthorchis felineus*. Journal of BUON 4: 367-372.
- Ishii A, Matsuoka H, Aji T, Ohta N, et al (1994): Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. Mutation Research 305: 273-281.
- Izquierdo RM (1997): Conceptos básicos sobre el cancer: ¿Que es el cancer?. En Martha Izquierdo Rojo (ed): "Biología Molecular del Cancer". Madrid España: Editorial Síntesis, pag. 15-19.
- Kirby GM, Pelkonen P, Vatanaspt V, Camus AM, Will CP Mc lang (1994): Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. Molecular carcinogenesis 11:81-89.
- Martín JS, Green RD, Cotter GT (1994): Dicing with death: Dissecting the components of the apoptosis machinery. Trends Biochem. Sci. 19:26.
- Martínez F (2000): Efecto genotóxico de oncosferas de *Taenia solium* en linfocitos de cerdos inmunes y no inmunes. Tesis de Licenciatura. UNAM
- Mastrangelo JA, Betenbaugh JM (1998): Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. TIBTECH 16: 88-95.

- Mayne TS (1997):** Antioxidant nutrients and cancer incidence and mortality: An epidemiologic perspective. Advances in Pharmacology 38: 657-675.
- Mc Cartby M, Michalski J, Secro E, Mc Combs C (1990):** Inhibition of polyamine synthesis suppresses human lymphocyte proliferation without decreasing cytokine production or inter-leukine 2 receptor expression. Immunopharma 20: 11-20.
- Montero MR, Flisser A, Madrazo I, Cuevas C, et al (1994):** Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. Mutation Research 305: 181-188.
- Montero-Montoya R, Serrano GL, Ostrosky-Wegman P (1997):** In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker. Mutation Research 391: 135-141.
- Montero MR, Gentile JG, Frederick L, et al (1999):** Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. Mutagenesis 14: 217-220.
- Norppa H (1997):** Cytogenetic markers of susceptibility: Influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. Environmental Health Perspectives 105: 829-834.
- O'Grady CT, Robbins AB, Barrett LT, Higginbottom AP (1993):** Subcutaneous cysticercosis simulating metastatic breast carcinoma. International Journal of Dermatology 32: 62-64.
- Ohshima H, Bartsch H (1994):** Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutation Research 305: 253-264.
- Ostrosky-Wegman P (1994):** El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. Gaceta Médica Mexicana 130: 432-437.
- Perera F, Santella.** Carcinogenesis. En: Schulte P, Perera F (eds.) Molecular Epidemiology. Principles and Practice. Academic Press, Inc., New York, 1993. pp. 277-300.
- Puppin DJr (1993):** Subcutaneous cysticercosis of the tongue mimicking a tumor. International Journal of Dermatology 32: 818-819.
- Rosin PM, Wagida A, Ward JA (1994):** Inflammation, chromosomal instability and cancer: the Schistosomiasis model. Cancer Research (Suppl) 54: 1929-1933.
- Sartí E (1997):** La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Salud Pública de México 39: 225-231.
- Seamus JM, Douglas RG, Thomas GC (1994):** Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. TIBS 19: 26-30.

- Shantz PM, Sarti E, Plancarte CA, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser SA (1994):** Community-Based epidemiological investigation of cysticercosis due to *Taenia solium*: Comparison of serological screening test and clinical findings in two population in Mexico. Clin. Inf. Dis. 18: 879-885.
- Schantz MP, Wilkins PP, Tsang WC (1998):** Immigrants, imaging, and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. En Scheld WM, Craig AW, Hughes MJ (de): "Emerging Infections 2". ASM, Press. Washington, D.C. pag. 213-242.
- Torres A, Plancarte CA, Villalobos AN, Aluja AS, Navarro R, Flisser SA (1992):** Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis 3. Effect of 1 day treatment. Parasitology Research. 78: 161-164.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE (1989):** An Enzyme-linked immunotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J. infect. Dis. 159 (1): 50-59.
- Tucker JD, Preston JR (1996):** Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. Mutation Research 365:147-159.
- Varmus H, Weinberg R.** Multistep Carcinogenesis. En: Varmus H, Weinberg R, Genes and the Biology of Cancer. Scientific American Library, New York, 1993.
- Vaux LD (1993):** Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:786.
- Villagran UJ, Rabiela JE (1989):** La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México. En: Flisser A, Malagon F (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. México Limusa Noriega; pag. 97-105.
- WHO/IARC (1994):** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 61 Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*, IARC, Lyon France.
- Willms K, Arcos L (1977):** *Taenia solium*: Host serum proteins on the cysticercus surface identified by ultrastructural immunoenzyme technique. Experimental Parasitology 43: 396-406.
- Wolff S, Afzal V, Lindquist PB (1984):** Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibodies. Mutation Research 70: 343-350.
- Zhang M, Martin JK, Sheng S, Sager R (1998):** Expression genetics: a different approach to cancer diagnosis and prognosis. TIBTECH 16: 66-71.