



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**INDUCCIÓN DE LA REPRODUCCIÓN
ASEXUAL DE LOS CISTICERCOS DE *Taenia*
crassiceps EN CULTIVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:**

CINTHYA PAOLA HERRERA GARDUÑO



**Asesor: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena
Coasesor: Dr. José de Jesús Martínez González**



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. en V. Rubén Danilo Méndez Medina

Vocal: Dra. en C. Irene Cruz Mendoza

Secretario: M. en C. Araceli Lima Melo

Suplente: Dra. en C. Yazmín Alcalá Canto

Suplente: MVZ. Nelyda Saldaña Hernández

DEDICATORIA

A Dios, que me ha permitido llegar hasta este punto, por darme una familia, por darme salud, amor, paciencia y perseverancia en mi camino...

A mi mamá: Yolanda Garduño, el gran amor de vida, que a pesar de todo nunca me ha dejado sola, que en cada paso siempre cuidó de mí y caminó a mi lado, hoy, gracias a ti soy lo que soy...

A mi papá: Cristóbal Herrera, mi superhéroe, mi apoyo, que con el carácter que te distingue siempre me motivas a ser la mejor...

A mis abuelos: Rafa y Eli, mis segundos papás, mis ángeles de la guarda, que gracias a ustedes sigo adelante, que deseo estén orgullosos de mí...

A mis hermanos: Yere, Missa y Neric, que son la parte divertida, feliz y desesperada de mi vida, gracias a ustedes tengo un motivo para esforzarme día con día porque no están solos...

A mis tíos: Ale, Pablo, Cindy e Isra, gracias por hacerme reír, por darme a los mejores primos del mundo y por estar siempre para mí...

A la pareja de mi mamá: Eduardo, por todo el apoyo moral y económico que ofreciste durante mi carrera...

A mis mejores amigas: Gaby P, Gaby S, Roo y Dany, que durante este largo recorrido siempre caminaron conmigo, gracias por cada consejo, cada risa, cada lágrima y por su paciencia...

A mis profesores y amigos: Noé, Alma, Lupita, Dr. Alex, Dr. Cortéz, que confiaron en mí y me compartieron de su conocimiento para mi formación, tanto académica como personal...

A todas aquellas personas que con pequeños detalles me apoyaron en cada paso...

A mi MVZ favorito Sergio Rodríguez, que juntos comenzaremos un nuevo camino...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia del Arenal, por confiar en mí, por brindarme su conocimiento, su amistad, su cariño y sobre todo por su apoyo incondicional durante este trabajo, por darme un hogar y una segunda familia en el laboratorio.

A mi Coasesor y amigo, el Dr. Jesús Martínez, por su orientación, por sus clases, por sus regaños pero sobre todo por siempre enseñarme cosas nuevas y hacer de mis días en el laboratorio más divertidos.

A mi amigo, el Dr. Alberto Guevara, por cada una de sus palabras durante mi estancia, por enseñarme a siempre hacer las cosas bien y realizar lo necesario para entender el porqué de los resultados, por hacerme reír tanto y por sus críticas tan particulares.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por brindarme sus instalaciones, equipo y apoyo para la realización de esta tesis.

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por DGAPA/UNAM IN218816

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Los platelmintos parásitos como agentes patógenos	4
1.1.1 Generalidades de los platelmintos	4
1.1.2 Cestodos	6
1.1.3 Padecimientos ocasionados por cestodos del género <i>Taenia</i>	8
1.1.3.1 <i>Taenia solium</i> como agente patógeno	9
1.1.3.2 La cisticercosis en México	10
1.2 Modelos de estudio de la cisticercosis	12
1.2.1 Bioética dentro de los modelos de investigación	12
1.2.2 <i>Taenia crassiceps</i> como modelo de estudio	14
1.2.2.1 Taxonomía de <i>Taenia crassiceps</i> (Zeder 1800)	16
1.2.2.2 Morfología	17
1.2.2.3 Ciclo de vida	19
1.2.3 Similitudes con <i>Taenia solium</i>	22
1.3 Uso de medios en cultivo de parásitos	22
1.3.1 Medios de cultivo	23
1.3.2 Cultivos de mantenimiento para el cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i>	24
1.4 Reacción hospedero-huésped	27
1.4.1 Defensas inmunológicas contra las parasitosis	27
1.4.1.1 Especies reactivas de oxígeno causante del estrés oxidante en el cisticerco y homeostasis redox	29
1.4.2 Sistemas Antioxidantes	31
1.4.2.1 El sistema glutatión y el sistema de tiorredoxina	31
1.4.2.1.1 El sistema dependiente del Glutatión	32
1.4.2.1.2 El sistema dependiente de la Tiorredoxina	33
1.4.3 La Tiorredoxina Glutatión Reductasa	34
1.4.3.1 La Ribonucleótido Reductasa y su dependencia de equivalentes reductores	36
1.4.4 El selenio como elemento esencial en las selenoproteínas	37
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo general	41
3.2 Objetivos particulares	41

4. MATERIAL Y MÉTODOS	42
4.1 Estrategia general	42
4.2 Reactivos	43
4.3 Material biológico	43
4.3.1 Obtención de ratones	43
4.3.2 Obtención de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> para cultivo	44
4.3.3 Propagación de cisticercos	44
4.3.4 Selección y mantenimiento de los cisticercos para cultivo	45
4.4 Medio de cultivo RPMI 1640	45
4.5 Obtención de líquido peritoneal de ratones infectados	45
4.5.1 Medio de cultivo RPMI 1640 con líquido peritoneal	46
4.6 Diseño experimental para el cultivo de cisticercos con medio RPMI 1640 en presencia de diversos compuestos	46
4.6.1 Condiciones de cultivo de los cisticercos	46
4.6.2 Cultivo de cisticercos en presencia de selenito de sodio	47
4.6.3 Cultivo de cisticercos en presencia de glutatión	47
4.6.4 Cultivo de cisticercos en presencia de líquido peritoneal	47
4.7 Medición del efecto de los tratamientos sobre los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	48
4.7.1 Medición de pH en los medios de cultivo	48
4.7.2 Parámetros de viabilidad: motilidad y tinción con colorante vital Azul Tripano	48
4.7.3 Parámetros de reproducción: cuantificación del número de gemas y del número de cisticercos	49
4.8 Determinación de la actividad enzimática de la Tiorredoxina-Glutatión Reductasa en cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cultivados en presencia de selenio	49
4.8.1 Obtención, almacenaje y procesamiento de muestras	49
4.8.3 Determinación de proteína	50
4.8.4 Actividad de la Tiorredoxina Glutatión Reductasa por espectrofotometría	50
4.9 Cuantificación de selenio en medio RPMI 1640 en polvo	51
4.10 Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno en las distintas muestras	51
4.11 Análisis de resultados	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Determinación de viabilidad con dos diferentes parámetros	53
5.1.1 Efecto del selenio en la viabilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> en cultivo	54
5.2 Efecto del selenio en la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> en cultivo	55
5.3 Determinación de la concentración de selenio en medio RPMI 1640	59

5.4 Efecto del selenio sobre la actividad de la enzima Tiorredoxina Glutación Reductasa	60
5.5 Efecto del glutatión en la viabilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> en cultivo	61
5.6 Efecto del glutatión en la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> en cultivo	62
5.7 Efecto del líquido peritoneal en la viabilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> en cultivo	63
5.8 Evaluación de pH en los medios de cultivo	63
5.9 Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno en las distintas muestras	64
6. DISCUSIÓN	65
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS	74
9. FIGURAS	84
10. CUADROS	86

RESUMEN

HERRERA GARDUÑO CINTHYA PAOLA. Inducción de la reproducción asexual de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en cultivo (bajo la dirección de la: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena y el Dr. José de Jesús Martínez González).

Las infecciones por platelmintos son un problema de salud a nivel mundial. En México, dos de las parasitosis con mayor prevalencia son causadas por *Taenia solium*: la teniosis y la neurocisticercosis. Esta última se ha estudiado tradicionalmente usando el cisticercos *Taenia crassiceps* cultivado en la cavidad peritoneal de ratones (que a diferencia de *T. solium* puede reproducirse asexualmente), modelo desarrollado por Freeman en 1962. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio del género *Taenia* en aspectos inmunológicos, bioquímicos y farmacológicos, entre otros. Sin embargo, en la actualidad se buscan alternativas para el estudio del parásito sin la intervención del hospedero y para disminuir el uso de animales de laboratorio. Por tal motivo, en este trabajo se evaluó el cultivo *in vitro* de cisticercos de *T. crassiceps* en medio RMPI 1640 (ampliamente usado en el mantenimiento de dicho parásito) suplementado con selenio con el fin de estimular la reproducción asexual; debido a la presencia de este elemento en la Tiorredoxina Glutación Reductasa, enzima encargada de donar electrones a través de la Ribonucleótido reductasa para la síntesis de desoxirribonucleótidos necesarios para la reproducción. Para conocer tal efecto, se cultivaron 100 cisticercos de *T. crassiceps* en presencia de 0.005, 0.05, 0.5, 75, 100 y 1000 μM de selenito de sodio durante 15 y 30 días de cultivo. Cuantificando la viabilidad se observó que a concentraciones de 75 μM o más, el selenio causa toxicidad. Sin embargo, a menor concentración se notó un ligero aumento en el número de individuos así como la gemación. Aunque no se alcanzó el objetivo de conseguir cantidades similares al modelo murino, esta tesis aportó información acerca del papel del selenio en los medios de cultivo, utilizados rutinariamente, así como otros elementos a considerar en los estudios que utilizan este modelo experimental.

ABREVIATURAS

AA	Ácido Ascórbico
ATM	Viabilidad Azul Tripano-Motilidad
CAT	Catalasa
CMRL	Medio de cultivo de células de cepa L
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético (del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
GISENA	Grupo Integral de Servicios Fitosanitarios ENA
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación (forma reducida)
GSSG	Disulfuro de glutatión (forma oxidada)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBrO	Ácido Hipobromoso
HClO	Ácido Hipocloroso
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
ICP-OES	Espectroscopía de Emisión Óptica-Plasma acoplado inductivamente
LP	Líquido Peritoneal
NADPH	β-Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)
NGM	Nematode growth media (por sus siglas en inglés)
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Anión Superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito

PBS	Solución amortiguadora Fosfato-salina (del inglés <i>phosphate buffer saline</i>)
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
Prx	Peroxirredoxinas
RNAi	Ácido ribonucleico interferente
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
RNasa	Ribonucleasa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (por sus siglas en inglés)
RR	Ribonucleótido Reductasa
Se	Selenio
Sec	Selenocisteína
SeMet	Selenometionina
SeO ₂ ⁻⁴	Ion selenato
SeO ₃ ⁻²	Ion selenito
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SOD	Superóxido Dismutasa
SFB	Suero Fetal Bovino
TGR	Tiorredoxina Glutación Reductasa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano-ácido
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Reductasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los platelmintos parásitos como agentes patógenos

1.1.1 Generalidades de los platelmintos

Los platelmintos son metazoarios que se caracterizan morfológicamente en su forma adulta, por ser organismos triblásticos, con simetría bilateral, cuerpo generalmente alargado y aplanado dorso-ventralmente. Debido a esto, se les conoce comúnmente como gusanos planos (SILVA, 2014).

Son organismos acelomados con una cubierta externa llamada tegumento, con una intensa actividad metabólica, ya que a través de ella absorben selectivamente (por difusión o transporte activo) las sustancias que requieren para su nutrición. El espacio que limita el tegumento está ocupado por un tejido sincitial y fibroso denominado “parénquima”, que sirve como tejido de sostén y en el que se encuentran incluidos los órganos de los aparatos reproductor y excretor y los del sistema nervioso, así como dos paquetes de fibras musculares característica de los cestodos, que dividen el “parénquima” en dos zonas: cortical y medular. Además de la función de sostén que desempeña, el “parénquima” es considerado como un centro de síntesis transporte y almacenamiento de glucógeno, el principal sustrato energético de estos parásitos, (LAMOTHE, 1988).

La mayoría de las especies tienen un sistema nervioso bien desarrollado que consta de un ganglio cefálico constituido por células ganglionares y fibras. Carecen de tubo digestivo, de aparato circulatorio y respiratorio así como de estructuras de tipo óseo. Sin embargo, cuentan con un sistema muscular y un sistema de tipo protonefridial que funcionan como estructuras excretoras y osmorreguladoras (CORDERO, 2001).

La mayoría de las especies de platelmintos son hermafroditas, por lo que el intercambio de espermatozoides y la fertilización pueden llevarse a cabo de forma cruzada entre distintos individuos o dentro del mismo individuo (auto-fertilización), (MARTÍNEZ, 2009).

El ciclo vital de las especies más importantes en veterinaria es indirecto, lo que implica que pueden involucrar uno o más hospedadores intermediarios. No obstante, existen otras especies de ciclo directo (CORDERO, 2001).

Taxonómicamente, se clasifican dentro del Reino Animal en el Phylum *Platyhelminthes* dentro de cuatro clases: *Turbellaria*, que representa a los helmintos de vida libre (planarias); *Monogenea*, que principalmente parasitan a peces; *Trematoda*, representada por parásitos en forma de hoja y finalmente *Cestoda*, con organismos en forma de cinta (GARCÍA, 2014).

Los parásitos platelmintos han sido identificados como generadores de un sinnúmero de enfermedades a nivel mundial, tanto en seres humanos como en animales (ya sea de compañía o producción). De éstas, una de las clases con mayor impacto en salud pública y a nivel económico (en la ganadería) es la clase *Cestoda*.

Entre las principales enfermedades producidas por cestodos y debido a su prevalencia a nivel mundial, destacan la Teniosis/Cisticercosis y la Equinococosis (Cuadro 1) (SILVA, 2014).

Cuadro 1. Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por platelmintos parásitos que afectan al hombre
(Tomado de Silva, 2014)

Enfermedad	Agente etiológico	Prevalencia global	Regiones de mayor prevalencia
Teniosis/Cisticercosis	<i>Taenia solium</i>	50 millones	Asia, África subsahariana y América
Equinococosis alveolar	<i>Echinococcus multilocularis</i>	>1 millón	Norte de Asia, Europa continental y América del Norte
Equinococosis quística	<i>Echinococcus granulosus</i>		Europa del este y mediterránea, África del norte, Asia central y América Latina

1.1.2 Cestodos

Los cestodos en su forma adulta son parásitos del tubo digestivo de los vertebrados, por lo que se caracterizan por tener un aspecto de cinta (Gr. *Kestos*=cinturón + *eidōs*=forma). Los estadios larvales de los platelmintos parásitos pueden encontrarse en cualquier parte del cuerpo de sus hospederos intermediarios ya sean vertebrados (Bovinos, Ovinos, Caninos, entre otros) en el caso de algunos miembros de la familia *Taeniidae* (*T. solium*, *T. saginata*, *T. pisiformis*, *T. taeniformis*, *Echinococcus spp*, entre otros) o invertebrados como ácaros (Piojos y Pulgas) para algunos otros cestodos como: *Moniezia spp* y *Dipylidium caninum*, por mencionar algunos, (CORDERO, 2001).

Morfológicamente, un cestodo adulto presenta un color blanco amarillento o gris claro y está dividido en tres regiones: escólex, cuello y estróbilo (Figura 1).

El escólex, está provisto de estructuras de fijación que pueden ser de varios tipos, como: botrios, botridios, ventosas y probóscides, pudiendo además, ser inerme o estar armado con una o varias coronas de ganchos. El cuello, situado inmediatamente después del escólex, es la zona no segmentada del cuerpo del parásito y produce, por septación

transversal, los proglótidos que son segmentos que componen el estróbilo, de ahí que la infección persista en el hospedero definitivo, mientras el escólex y el cuello permanezcan unidos a la pared del intestino de ese hospedero.

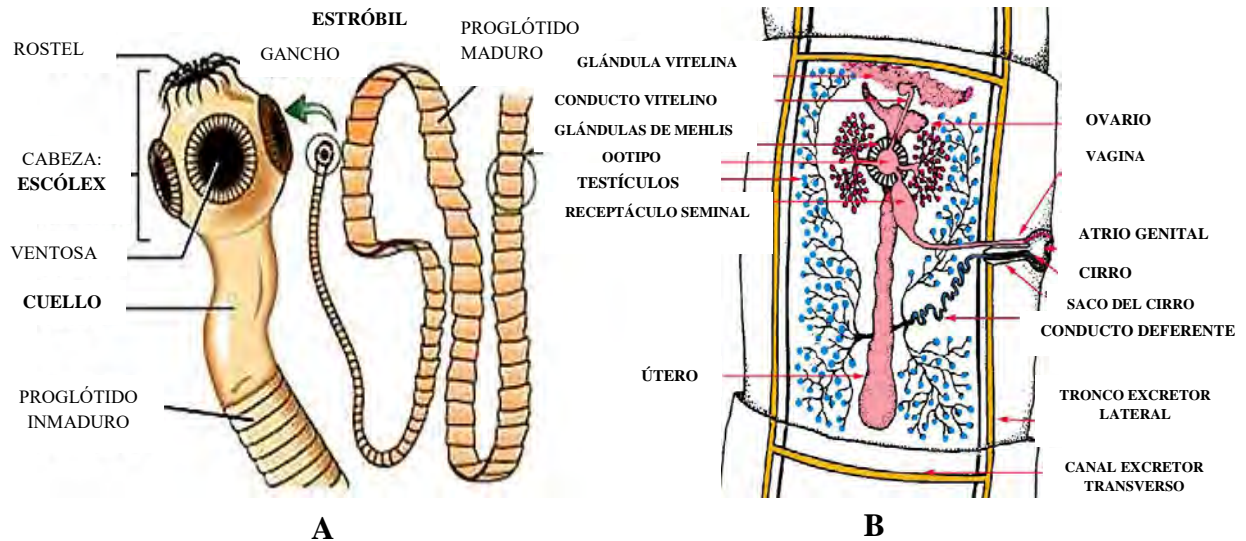
El estróbilo, formado por un número variable de proglótidos (dependiendo la especie), contienen los órganos reproductores con distinto grado de maduración a medida que se alejan del cuello y reciben el nombre de proglótidos: inmaduros, maduros y grávidos (LAMOTHE, 1988).

El aparato reproductor masculino está compuesto de uno a numerosos testículos, un conducto deferente y un órgano copulador llamado cirro, contenido por una bolsa. Por otra parte, el aparato reproductor femenino consta de un ovario, cuyo oviducto desemboca en la cámara de formación de los huevos u ootipos y parten al útero que desemboca en el atrio genital para la fertilización y posteriormente, el desarrollo de los huevos (Figura 1), (ROBERTS, 2005). Por el contrario, los estadios larvarios tienen forma esferoide u oblonga denominada quiste.

El cuerpo de los cestodos está cubierto por tegumento sincitial, que presenta proyecciones citoplasmáticas llamadas microtricas (tipo borde de cepillo) las cuales son, un aumento en la superficie celular que hace más eficiente la absorción de nutrientes y agua mediante ósmosis y pinocitosis. (SMYTH, 1989). Además, al no presentar órganos especializados para la respiración y circulación, es a través del tegumento por donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso por difusión simple (MARTÍNEZ, 2011).

Figura 1. A) Esquema de la morfología del cestodo *Taenia solium* B) Esquema del aparato reproductor del cestodo *Taenia solium*

(Modificado de UAM en <http://practicasinvertebradosuam2012.blogspot.mx/2012/12/4-revision-de-filo-platelmintos-y.html?view=snapshot>) y <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cestodos.html>)



1.1.3 Padecimientos ocasionados por cestodos del género *Taenia*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que más de 1 billón de personas alrededor del mundo sufren de enfermedades tropicales ocasionadas por helmintos, las cuales representan uno de los mayores problemas de salud (FREDERICK, 2010), principalmente en países en vías de desarrollo, debido a que pueden provocar enfermedades de alto impacto económico infectando animales y humanos (MOREAU, 2010).

Entre las muchas enfermedades causadas por tenias, en nuestro país destaca la teniosis causada por *Taenia solium* y la cisticercosis causada por su metacestodo.

Dicha enfermedad tiene relevancia debido a que es endémica en América Latina, África y Asia, destacando a México como uno de los países con mayor prevalencia, como

ejemplo, en 2014 entre el 10-25% de la población rural fue portadora de *Taenia solium* (SANCHÉZ, 2014), a la fecha se siguen presentando casos de muerte por este agente parásito (SINAVE, 2017).

1.1.3.1 *Taenia solium* como agente patógeno

La teniosis, es la parasitosis causada por la forma adulta de *T. solium*. Esta enfermedad se desarrolla por el establecimiento del parásito en el intestino delgado del ser humano. Se transmite por el consumo de carne infectada con cisticercos, -cruda o insuficientemente cocida-, los cuales al llegar al intestino delgado, evaginan su escólex y se fijan a la mucosa intestinal dando lugar al parásito adulto y provocando la enfermedad.

La teniosis se caracteriza por ser de curso crónico, con baja mortalidad pero alta morbilidad y los signos y síntomas principales son: debilidad, anorexia, vértigo, anemia y en algunos casos vómito. Dicha enfermedad es fácil de prevenirse y tratarse con el uso adecuado de antiparasitarios cestocidas. Sin embargo, las heces de los pacientes con dicha parasitosis, fungen como reservorio expulsando constantemente 300 mil huevos diarios de la tenia en las heces y por lo tanto son fuente de contaminación para sí mismos (autoinfección), para otras personas y para los cerdos (LAMOTHE 1988). Tras la ingesta de los huevos se desarrolla una enfermedad denominada cisticercosis, ya sea humana (generalmente neurocisticercosis) o porcina (cisticercosis porcina).

1.1.3.2 La cisticercosis en México

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria asintomática, causada por la larva o metacestodo de *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*), la transmisión se da por consumo de alimentos contaminados con huevos de la tenia (frutas, verduras, que han sido irrigadas con aguas negras) o en la preparación de alimentos por personas (con poca higiene) infectadas con el parásito adulto. Su prevalencia está dada tanto en áreas urbanas como rurales, siendo la última, de las zonas con más casos en nuestro país, siendo Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca de los estados con más casos reportados. (SINAVE, 2017).

En México las principales causas asociadas para el desarrollo de la enfermedad son: comunidades con malas condiciones higiénicas y con infraestructura sanitarias deficiente; generalmente debido a falta de educación para la salud y escasez económica. Otro factor que propician su incidencia es la producción porcina de traspatio (SARTI, 1997).

En 2010, la OMS añadió a la cisticercosis en la lista de las principales enfermedades tropicales desatendidas y estableció una hoja de ruta con dos objetivos: elaborar una estrategia validada para combatir y erradicar la teniosis/cisticercosis por *T. solium* y ampliar las intervenciones para lograrlo en algunos países al 2020 (OMS, 2017).

Flisser en 2011, menciona que es la parasitosis más frecuente del sistema nervioso central (neurocisticercosis) y que cerca del 70% de los casos se presenta con crisis convulsivas de inicio tardío (FLISSER, 2011). Cabe mencionar que la OMS, atribuye a *T. solium* como la causante del 30% de los casos de epilepsia en zonas endémicas de México, donde hay cerdos en libertad conviviendo con personas (OMS, 2017).

En 2015, el Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG), señaló que el cisticerco de *T. solium* es una de las principales causas de muerte por dichas enfermedades. De acuerdo con los datos disponibles sobre la prevalencia de la epilepsia, se estima que entre 2.56 y 8.30 millones de personas padecen neurocisticercosis, sumando los casos sintomáticos y los asintomáticos a nivel mundial (HAVELAAR, 2015; OMS, 2017).

En México desde hace varios años están en marcha programas y trabajos de investigación encaminados a disminuir la prevalencia de dicha enfermedad y que además, puedan aportar conocimientos para otros países (LARRALDE, 1989; MOLINARI, 1997; FLISSER, 2011). Sin embargo, en nuestro país, ambas enfermedades siguen prevalentes según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), que reporta en el Boletín Epidemiológico de 2015 a 2017, el número de casos provocados por este parásito (Cuadro 2).

Cuadro 2. Casos de Teniosis y Cisticercosis reportados en México del año 2015 a 2017
(Tomado de SINAVE/DGE/Salud 2017)

AÑO	NÚMERO DE CASOS	
	TENIOSIS	CISTICERCOSIS
2015	153	239
2016	84	156
2017	221	177

Por lo cual, se deben seguir buscando alternativas para el control de la enfermedad, no solo en nuestro país, si no en todas aquellas regiones donde las comunidades se ven afectadas por esta zoonosis.

1.2 Modelos de estudio de la cisticercosis

1.2.1 Bioética dentro de los modelos de investigación

En la actualidad y con los avances tecnológicos a la orden del día, se buscan alternativas de investigación para disminuir el uso de animales de laboratorio y cumplir con el principio de las 3 R's: Reemplazo, Reducción y Refinamiento, que fue creado hace más de 50 años por Russel y Burch en 1959 en su libro "*The Principles of Human Experimental Technique*", en el que proponen el principio de las "3 R's": Reemplazar, Reducir y Refinar, conceptos que se han vuelto clásicos en la literatura sobre animales en la experimentación (ALUJA, 2002).

Este principio establece los estándares aceptados para la investigación con animales y desde entonces, se han incorporado a la legislación y a las reglamentaciones nacionales e internacionales sobre el uso de animales en los procedimientos científicos, así como en las políticas de las organizaciones que financian o llevan a cabo investigaciones con animales (VANDA, 2003). Incluso hoy en día, existe el Centro Nacional para el Reemplazamiento, Reducción y Refinamiento en Animales de Investigación (NC3Rs), que tiene como objetivo impulsar el desarrollo científico y tecnológico que reemplacen, reduzcan o refinen el uso de animales de experimentación.

La definición de dicho principio se entiende de la siguiente manera:

- **REEMPLAZO:** Métodos que sustituyan los animales de laboratorio por equivalentes que no empleen animales de ningún tipo, cambiar los animales por otros modelos.

- **REDUCCIÓN:** Métodos que ayuden a reducir el número de animales empleados en la investigación.
- **REFINAMIENTO:** Con este término, se engloban los procedimientos que pretenden minimizar dolor, angustia o ansiedad en los animales empleados en experimentación, o los que cambian una especie por otra, con menor capacidad sensitiva. Se trata de mejorar las condiciones experimentales para causar el menor daño posible (ARANDA, 1997).

El uso de animales en investigación es una gran responsabilidad y se deben considerar dichos principios, además de cumplir con la normativa de cada país.

Tomando en cuenta lo antes mencionado, cabe destacar que en México se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio", expedida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); que tiene como objetivo, fomentar la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales de laboratorio en nuestro país.

Ésta, al ser de observancia obligatoria en todo el territorio nacional obliga a los grupos de investigación (personas físicas o morales) a cumplir con las necesidades de cada especie utilizada y a su vez con el principio de las 3 R's para el bienestar animal en investigación.

Por lo tanto, de seguir usando modelos animales con fines de investigación, se tiene la responsabilidad de cumplir con los principios éticos aplicados al uso de animales de experimentación.

1.2.2 *Taenia crassiceps* como modelo de estudio

Freeman (1962) estableció un modelo murino de cisticercosis experimental basado en la capacidad de reproducirse de manera asexual por gemación tras ser inoculados en la cavidad peritoneal de los ratones.

Además, Larralde en 1989 describió que de manera *in vitro* dichos parásitos tienen la capacidad de regenerarse por cúmulos celulares dentro de la cavidad peritoneal de los roedores por lo cual, una de las alternativas para estudiar la cisticercosis ha sido el modelo murino con *Taenia crassiceps* (WILLMS, 2010) que por su cercanía filogenética con *Taenia solium*, permite investigar distintas áreas entre las que destacan: farmacología, fisiología, inmunología y técnicas diagnósticas. Con respecto a este último punto, ha sido demostrado que *T. crassiceps* tiene una amplia reactividad antigénica y una inmunidad protectora cruzada con *T. solium*, de tal forma que antígenos de *T. crassiceps* pueden ser usados para el inmunodiagnóstico de cisticercosis en humanos e incluso para la producción de vacunas (FRAGOSO, 1998; FUENTES, 2011; SCIUTTO, 2013;).

Adicionalmente, gracias al modelo experimental de teniosis en hámster dorado inmunosuprimido para la recuperación de la fase adulta de *T. crassiceps*, se han obtenido descripciones biológicas, ultraestructurales y de interface hospedero-huésped importantes en el área de investigación (ZURABIAN, 2008).

Otras ventajas que tiene el modelo murino de cisticercosis son:

- La capacidad de reproducirse asexualmente a través de gemación en la cavidad peritoneal de ratones de laboratorio, pudiendo obtener así, grandes cantidades de material biológico en aproximadamente 1 a 4 meses.
- Es económicamente rentable.
- Seguridad del personal que trabaja con el parásito porque no representa riesgo de infección (MARTÍNEZ, 2015).

Cabe mencionar que, aunque *Taenia crassiceps* no es considerada zoonótica, en casos aislados y en condiciones de inmunodepresión severa puede llegar a hospedarse en el humano (MARTÍNEZ, 2015).

Asimismo, la cisticercosis murina es también un sistema experimental manejable para explorar el papel de los factores biológicos involucrados en la susceptibilidad del huésped para evaluar el papel del origen genético en las infecciones, estudiar la modulación de los mecanismos inmunes celular y humoral, así como la naturaleza de las células inflamatorias e inmunocompetentes y para examinar los cambios endocrinológicos que ocurren en el huésped durante la infección.

Dentro del modelo de trabajo existen distintas cepas de *T. crassiceps* que han sido usadas, ya sea para obtener cisticercos o parásitos adultos. Algunas de las más utilizadas son (CHAU, 1976):

- **ORF:** La primera cepa aislada por Freeman en 1952, que se caracteriza por ser aneuploide, por lo que es estéril y no puede formar el escólex. Actualmente se sigue usando en investigación.

- **HYG:** Cepa obtenida al administrar a ratones blancos, huevos de un cestodo recuperado de un zorro rojo parasitado naturalmente, se aisló en 1974. Esta cepa si presenta escólex y podría completar su ciclo biológico, destacando que es la cepa donde se ha reportado la mayoría de investigación en bioquímica del cisticerco.
- **WFU:** En 1999, Kuhn aisló dicha cepa de un ratón silvestre (*Peromyscus spp*) también presenta escólex y puede completar su ciclo biológico.

A lo largo del tiempo las cepas se han mantenido a través de una serie de infecciones intraperitoneales (pases) en ratones de la cepa BALB/C principalmente. En estas condiciones, la cepa que más ha sufrido modificaciones es la cepa ORF, por lo tanto, para fines de esta tesis se trabajó con la cepa HYG debido a que es por una cepa que preserva el escólex y presentar menos alteraciones con cada pase.

1.2.2.1 Taxonomía de *Taenia crassiceps* (Zeder 1800)

La clasificación taxonómica, según Pechenic en 2000 es:

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophyllidae

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia* (VERSTER, 1969)

Especie: *Taenia crassiceps*

1.2.2.2 Morfología

Adulto

La *Taenia* como ya se mencionó, es un gusano largo, aplanado, en forma de cinta, color blanco-amarillento, que en la parte anterior del escólex presenta ventosas y ganchos que sirven como órgano de fijación al intestino delgado del huésped y como toda *Taenia* tiene un cuello que está provisto de células germinativas que dan origen a los proglótidos individuales: inmaduros, maduros y grávidos y en conjunto, forman el estróbilo.

Taenia crassiceps, se puede diferenciar de otras tenias de acuerdo a sus características ultraestructurales como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Diferencias morfológicas entre varias especies del género *Taenia*
(Creado a partir de VERSTER, 1969)

Especie	Largo del adulto	Tipo de escólex	Número de ganchos	Número de testículos	Número de ramas uterinas	Tamaño del metacestodo
<i>T. crassiceps</i>	0.4 a 1 m	Armado	30 a 34	200 a 220	11 a 18	0.1 a 1 cm
<i>T. solium</i>	3 a 4 m (hasta 7 m)	Armado	22 a 32	150 a 200	7 a 12	1.8 a 2 cm
<i>T. saginata</i>	3 a 4 m (hasta 15 m)	Sin armadura	0	300 a 400	15 a 30	1 cm
<i>T. multiceps</i>	0.4 a 1 m	Armado	22 a 30	284 a 388	9 a 26	5 cm

La ultraestructura de la fase larvaria de *Taenia crassiceps* no difiere significativamente de la descrita para otros tenidos o gusanos planos (WILLMS, 2010).

Huevo

El huevo es esférico y mide aproximadamente entre 20 a 40 μm . Posee una capa externa llamada vitelo o cápsula, seguida del embrióforo, que es una serie de bloques proteicos unidos entre sí; ambas capas confieren protección a la oncósfera también denominada embrión hexacanto (llamado así, por poseer 6 ganchos en su interior) durante su estancia en el medio ambiente, esta puede resistir hasta por dos o tres meses (LAMOTHE, 1988).

Metacestodo

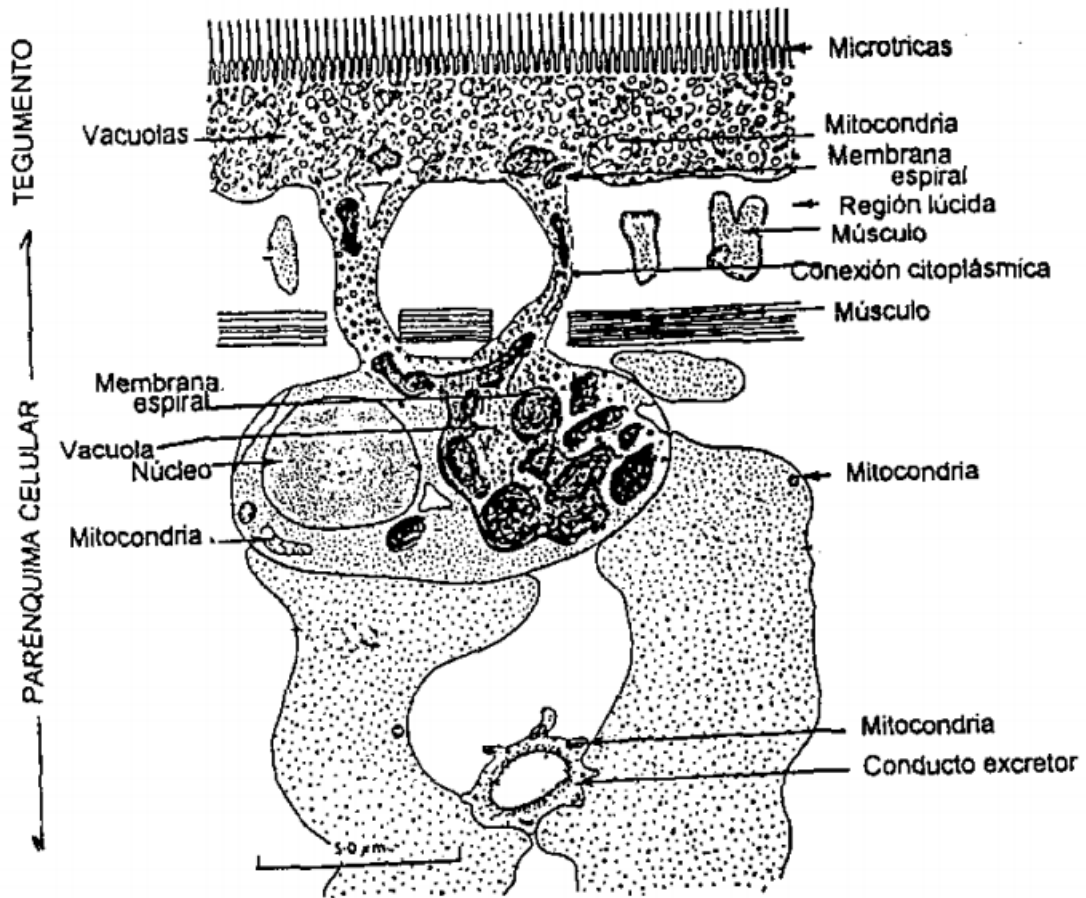
La fase larvaria o quística del cestodo (antiguamente llamada *Cysticercus longicollis*) y conocido comúnmente como cisticerco, es una vesícula ovoide, llena de fluido opalescente y que, en algunas cepas de la *Taenia crassiceps* (como la HYG y la WFU), se observa el escólex invaginado. Posee dos capas en su estructura, una externa (también llamada tegumento) que le sirve de protección y además le ayudan a la absorción de nutrientes y otra interna (formada por parénquima celular), entre ambas capas se encuentran fibras musculares, solenocitos, corpúsculos calcáreos, una red neuronal sencilla y un grupo de células germinales (SMYTH, 1989) (Figura 2).

Una característica distintiva de los cisticercos de *T. crassiceps* es la de, reproducirse asexualmente por gemación, la cual consiste en que el quiste principal comienza a desarrollar gemas pequeñas, que con el tiempo van creciendo hasta dar origen a otro cisticerco.

Figura 2. Ultraestructura del metacestodo *Cysticercus longicollis* de *Taenia crassiceps*

Se puede apreciar la morfología del sincicio que rodea al organismo y el parénquima celular.

(Tomada de Baron, 1968).



1.2.2.3 Ciclo de vida

Taenia crassiceps fue descrita por Zeder en 1800; este es un parásito gastrointestinal del ártico, que en su forma adulta, parasita principalmente a cánidos como zorros, lobos y perros, se encuentra adherido al intestino delgado (duodeno-yeyuno) del huésped a través del escólex, durante su desarrollo, hasta adquirir su madurez sexual en donde se producen gran cantidad de huevos fertilizados.

El hospedero defeca los proglótidos grávidos y estos comienzan a desintegrarse en el medio ambiente, exponiendo así millones de huevos, que tienen en su interior al embrión hexacanto u oncósfera (FREEMAN, 1962). Los huevos expuestos en el medio ambiente, son ingeridos por los huéspedes intermediarios: topos, marmotas y ratones de campo, principalmente. Éstos, al pasar por el tracto gastrointestinal sufren un proceso de activación, el cual consiste en la digestión de la membrana que protege al embrión hexacanto debido a la exposición de enzimas proteolíticas y sales biliares del hospedero.

El embrión, luego de ser liberado, migra hacia la mucosa intestinal y penetra con ayuda de sus ganchos, para después viajar por vía sanguínea hasta su tejido blanco: músculo, tejido conectivo subcutáneo, pleura y cavidad peritoneal (OSTOA, 2010). Finalmente, en estos tejidos se desarrolla el cisticerco o metacestodo, que es la fase larvaria de la *Taenia* (Figura 3 y 4).

El ciclo de vida vuelve a comenzar cuando el cisticerco (dentro del huésped intermediario), es ingerido por el huésped definitivo. Posteriormente, el cisticerco llega al intestino delgado donde evagina el escólex y desarrolla las ventosas y ganchos con los que se adhiere y fija a la mucosa del órgano para así nutrirse y volver a desarrollar al adulto (Figura 4), (MARTÍNEZ, 2015).

Figura 3. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*

1. Embrión hexacanto u Oncósfera (0.02 mm). 2. Larva joven (0.5 mm). 3. Cisticerco joven (0.5 mm). 4. Cisticerco joven con gemas (0.05 mm). 5. Cisticerco maduro (1.0 mm). 6. Tenia joven (1.0 mm).
(Modificado de Freeman, 1962)

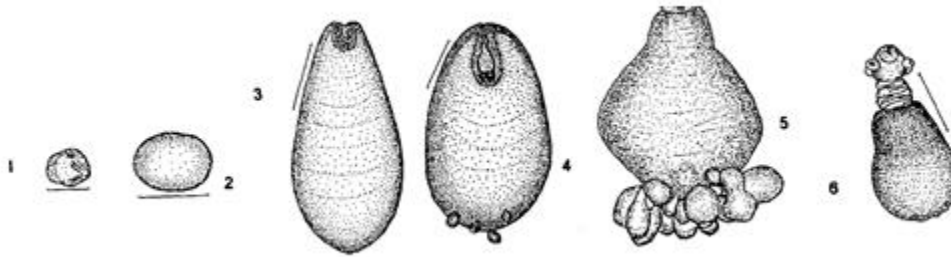
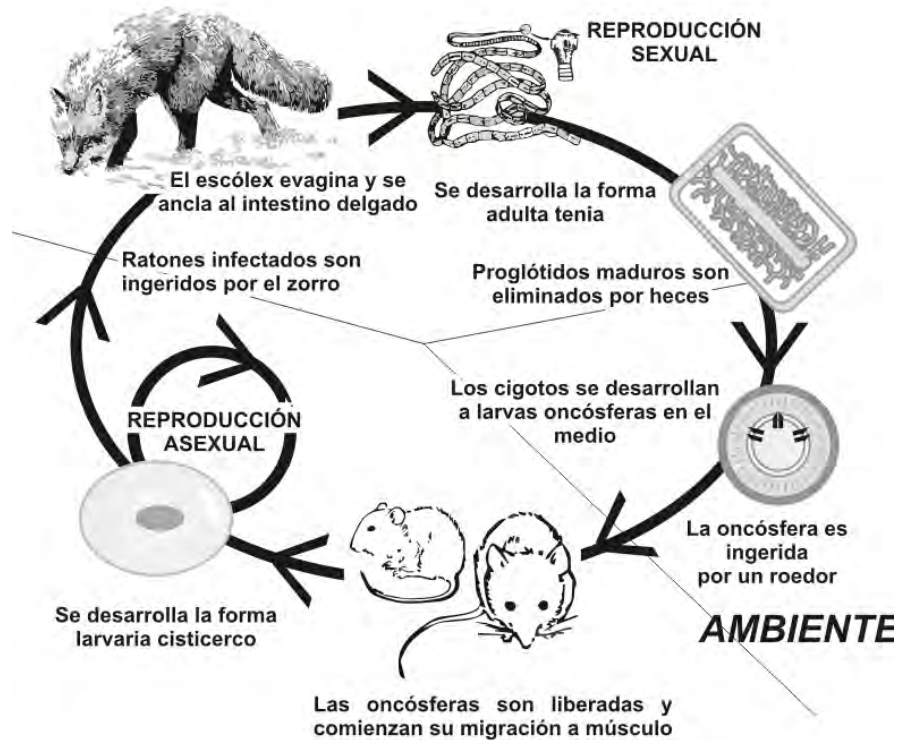


Figura 4. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*
(Tomado de Martínez, 2009)

HOSPEDERO DEFINITIVO



HOSPEDERO INTERMEDIARIO

1.2.3 Similitudes con *Taenia solium*

El estudio de *Taenia crassiceps* toma auge por la cercanía filogenética que comparte con otras *Taenias*, como: *Taenia saginata* y *Taenia solium*, siendo sólo estas últimas, zoonóticas. Debido a esto, los cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium* presentan alta homología inmunológica ya que ambos estimulan al sistema inmune a través de antígenos complejos similares de origen proteico, glicoproteico y lipídico (FUENTES, 2011). La infección ocasionada por ambas especies son generalmente crónicas, pudiendo el parásito vivir durante largos periodos de tiempo dentro de su hospedero sin ser destruido.

Debido a que, la infección por *T. solium* ha provocado altos porcentajes de morbilidad a nivel mundial, el modelo de *T. crassiceps* ha sido usado en investigación de fisiopatología, genética, endocrinología, nutrición, inmunología y farmacología (MARTÍNEZ, 2009), entre otros, pudiendo ser estudios *in vivo* e *in vitro*, siendo estos últimos los más destacados entre los platelmintos.

1.3 Uso de medios en cultivo de parásitos

Para el cultivo de diferentes especies de helmintos, entre los más destacados están, en al menos una fase de su ciclo: el nematodo *Caenorhabditis elegans* (WEN, 2011), *Schistosoma japonicum* (YE, 2013), *Mesocestoides corti* (VENDELOVA, 2016) *Echinococcus granulosus* (ELISSONDO, 2005; HEMPHILL, 2010), *Echinococcus multilocularis* (HEMPHILL, 2003), *Taenia pisiformis* (OSUNA, 1982) e incluso *Taenia crassiceps* (TOLEDO, 1997; PALOMARES, 2005; OSTOA, 2010; MÁRQUEZ, 2013) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diferentes formas de cultivos de helmintos

ORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES DE CULTIVO
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Medio NGM con <i>Escherichia coli</i>	22°C
<i>Schistosoma japonicum</i>	RPMI 1640 diluido 50% suplementado con 10% de suero de conejo	37°C, 5% CO ₂ , 95% Humedad
<i>Mesocestoides corti</i>	Medio DMEM10	37°C, 5% CO ₂ , 95% Humedad
<i>Echinococcus granulosus</i>	Medio 199 suplementado con 20% de suero fetal bovino	37°C
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Medio mixto con células alimentadoras	37°C, 5% CO ₂ , 95% Humedad
<i>Taenia pisiformis</i>	Medio CMRL 1066 suplementado con suero fetal bovino	38°C, 5% CO ₂ , 10% O ₂
<i>Taenia crassiceps</i>	RPMI 1640	37°C, 5% CO ₂ , 95% Humedad

1.3.1 Medios de cultivo

En la actualidad, la investigación científica en el área de ciencias biológicas y de la salud ha buscado ir de la mano con el bienestar animal. Debido a esto, se ha buscado implementar medios de cultivo de microorganismos, que entre sus muchas ventajas, ofrecen sustituir en gran medida a diversos animales utilizados para llevar a cabo la reproducción y propagación de algunos organismos (cómo parásitos), necesarios para el diagnóstico de enfermedades, el estudio de la fisiología de los microorganismos y la obtención de grandes cantidades de material biológico para pruebas de fármacos, entre otras.

Un medio de cultivo, es un líquido o un gel diseñado para favorecer el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas, el cual contiene los nutrientes óptimos para el mantenimiento, desarrollo o reproducción de los mismos. Existen diversas clasificaciones de los medios de cultivo: a) por su composición química (común, sintética,

semi-sintética), b) por su estado físico (líquido, sólidos, semisólidos) y c) por su finalidad (ordinaria, enriquecida, diferencial, selectiva, de enriquecimiento). Existen además, los medios de cultivo mixtos (BAILÓN, 2003), que contienen más de un tipo de células o de microorganismos y los medios de cultivo axénico que se caracterizan por ser cultivos donde sólo está presente el microorganismo de interés, es decir, sin otras células.

1.3.2 Cultivos de mantenimiento para el cisticerco de *Taenia crassiceps*

El mantenimiento *in vitro* del cisticerco de *T. crassiceps* aún continúa y los diferentes grupos de investigación en su mayoría, han cultivado a las larvas en medios de crecimiento, siendo el más utilizado el medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, por sus siglas en inglés) 1640 de GIBCO/INVITROGEN® con y sin suero fetal bovino (SFB), (TOLEDO, 1997; PADILLA, 2001; ZURABIAN, 2008; OSTOA, 2010; ESQUIVEL 2014), el cual se caracteriza por ser un medio esencial para cultivo de diferentes tipos de células y otros organismos.

Es interesante hacer notar que en la reseña de la formulación de este medio de la marca ya mencionada, no se reporta la presencia de alguna fuente de selenio, además de contar con concentraciones muy bajas de glutatión reducido (Cuadro 5), lo cual indicaría que en un cultivo *in vitro* de cisticercos, sería posible encontrar un desbalance o deficiencia de dichos elementos y por consecuente, la alteración de las enzimas seleno-dependientes.

No obstante, no se ha logrado estimular la reproducción asexual, a pesar de que el suero contiene además de nutrientes y proteínas, hormonas y factores de crecimiento.

Cuadro 5. Composición química del medio RPMI 1640 (GIBCO/INVITROGEN®)

(Tomado de Thermo Fisher Scientific 2017, en

<http://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.244.html>)

Componentes	Peso Molecular	Concentración (mg/L)	mM
Aminoácidos			
Glicina	75.0	10.0	0.1333333
L-Arginina	174.0	200.0	1.1494253
L-Asparagina	132.0	50.0	0.3787878
L-Ácido Aspártico	133.0	20.0	0.1503759
L-Cistina 2HCl	313.0	65.0	0.2076677
L-Ácido Glutámico	147.0	20.0	0.1360544
L-Glutamina	146.0	300.0	2.0547945
L-Histidina	155.0	15.0	0.0967741
L-Hidroxiprolina	131.0	20.0	0.1526717
L-Isoleucina	131.0	50.0	0.3816794
L-Leucina	131.0	50.0	0.3816794
L-Lisina hidrociorada	183.0	40.0	0.2185792
L-Metionina	149.0	15.0	0.1006711
L-Fenilalanina	165.0	15.0	0.0909090
L-Prolina	115.0	20.0	0.1739130
L-Serina	105.0	30.0	0.2857143
L-Treonina	119.0	20.0	0.1680672
L-Triptófano	204.0	5.0	0.0245098
L-Tirosina disódica dihidratada	261.0	29.0	0.1111111
L-Valina	117.0	20.0	0.1709401
Vitaminas			
Biotina	244.0	0.2	8.1967213
Colina clorada	140.0	3.0	0.0214285
D-Calcio pantotenato	477.0	0.25	5.2410900
Ácido fólico	441.0	1.0	0.0022675
Niacinamida	122.0	1.0	0.0081967
Ácido Para-Amino-benzoico	137.0	1.0	0.0072992
Piridoxina hidrociorada	206.0	1.0	0.0048543
Riboflavina	376.0	0.2	5.3191E-4
Tiamina hidrociorada	337.0	1.0	0.0029673
Vitamina B12	1355.0	0.005	3.6900E-6
I-Inositol	180.0	35.0	0.1944444
Sales Inorgánicas			
Nitrato de calcio (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236.0	100.0	0.4237288
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	120.0	48.84	0.4070000
Cloruro de Potasio (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Cloruro de Sodio (NaCl)	58.0	6000.0	103.44827
Fosfato de Sodio di básico (Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O)	268.0	800.0	2.9850745
Otros componentes			
D-Glucosa (Dextrosa)	180.0	2000.0	11.1111111
Glutación (reducido)	307.0	1.0	0.0032573
Rojo de Fenol	376.4	5.0	0.013283741

Al respecto, sabemos que la composición química exacta de cada medio puede cambiar entre cada lote y también de acuerdo al laboratorio que lo produce, lo que puede determinar que los resultados se puedan ver influenciados por estas variaciones. Uno de los elementos en los que se reportan diferencias, es en la concentración de selenio.

Karlenius en 2011, de forma similar, muestra la diferencia entre varias presentaciones de SFB, donde se determinó la concentración de selenio y los resultados fueron desde 164.6 hasta 582.6 nM reportando, que ésta afecta la actividad de las enzimas seleno-dependientes como la Trx y la GPx y su efecto en la proliferación celular, además, cuando estos sueros los suplementan con selenio, la actividad de las enzimas y la proliferación celular aumentaron alrededor de 5 veces (KARLENIUS, 2011).

Otros agentes que se han probado para mantener e incluso intentar inducir la reproducción asexual del cisticerco son: estradiol, testosterona, glucosa e insulina, entre otras, (TOLEDO, 1997; OSTOA, 2010; ESQUIVEL, 2014). Sin embargo, los reportes hablan de un aumento en la gemación de los cisticercos, pero no del aumento en el número de organismos para poder obtener la cantidad de material biológico similar a la que se obtiene con el modelo murino.

Para ello, es importante considerar los posibles factores que pueden intervenir al momento de proporcionar un medio de cultivo que permita la reproducción asexual del parásito con las condiciones ideales para tal fin, basándose en lo que sucede dentro del hospedero cuando ingresa el parásito.

1.4 Reacción hospedero-huésped

En primera instancia, se debe comprender que cuando se diseña un modelo experimental hospedero-parásito, se inicia una serie de reacciones fisiológicas en ambos organismos con el mismo fin común: sobrevivir y mantener la homeostasis.

Las respuestas que trae consigo dicho modelo, son muy variadas y para lograr obtener una fase del ciclo de vida de *T. crassiceps* en condiciones *in vivo*, es indispensable conocer a qué se enfrenta el parásito cuando entra al hospedero, es por ello que se describe la respuesta inmune reportada que desarrolla el hospedero frente a cestodos.

1.4.1 Defensas inmunológicas contra las parasitosis

En los organismos que son parasitados por cestodos, la respuesta inmediata inmunológica es inicialmente de tipo innata (inespecífica) en la cual principalmente intervienen eosinófilos secretando mediadores químicos, como la histamina, proteínas como la peroxidasa de eosinófilos, ribonucleasa (RNasa), desoxirribonucleasa, lipasa, la proteína básica mayor y el plasminógeno. Estos mediadores son liberados por un proceso llamado degranulación, que ayuda entre otras cosas a producir especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*) como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los ácidos hipobromoso (HBrO) e hipocloroso (HClO); todas éstas moléculas son tóxicas para el parásito e incluso (en grandes cantidades) para el huésped. Grandes cantidades de óxido nítrico (NO) también son producidas por los macrófagos (y en menor medida por los neutrófilos) activados por una variedad de estímulos inmunológicos, como el interferón y el factor de necrosis tumoral. El

NO reacciona con superóxido para producir peroxinitrito (ONOO^-) y otras especies reactivas de nitrógeno (ERN o RNS por sus siglas en inglés: *Reactive Nitrogen Species*) que también son tóxicas para los parásitos. Además, los neutrófilos activados y los eosinófilos liberan mieloperoxidasa y peroxidasa respectivamente, que catalizan la conversión de H_2O_2 y haluros en ácidos hipohalosos que son poderosos oxidantes y pueden formar otras especies dañinas. Colectivamente, las ERO y ERN son potentes oxidantes y especies nitrantes: pueden inactivar enzimas e iniciar el proceso de peroxidación y nitración de lípidos, lo que conduce a reacciones radicales en cadena que generan radicales libres que dañan aún más las membranas, ácidos nucleicos y proteínas (RANGEL, 2011).

Estos procesos (y la adición de las células efectoras del huésped, como las enzimas hidrolíticas) en última instancia pueden conducir a la muerte de organismos parásitos. (SALINAS, 2006)

Cabe mencionar que en infecciones por cestodos, también están presentes macrófagos, basófilos y neutrófilos que son esenciales para abatir a los parásitos. Sin embargo, la efectividad de la respuesta innata depende en gran parte de la generación de un fenómeno inflamatorio inespecífico en el entorno del patógeno, que posteriormente desencadenará la respuesta inmune adaptativa (específica) que en la mayoría de las ocasiones culmina con la destrucción o el control del patógeno y con la consecuente producción de inmunoglobulinas específicas contra los antígenos del parásito, obteniendo así una memoria inmunológica en el hospedero (respuesta mediada por anticuerpos) (RANGEL, 2011).

Pero, si es tan eficaz el sistema inmune del hospedero ¿cómo es que las infecciones tienen éxito?, Padilla en 2001, menciona que el tipo de respuesta inmune que sufre el ratón es muy dinámica, ya que se va modificando a través del tiempo; el proceso inflamatorio comienza el primer día, pero luego cae a niveles casi insignificantes durante infecciones tardías, la disminución coincide con un aumento notable en la tasa de reproducción del parásito a las 6 semanas de infección. Esto indica que el cisticerco resiste procesos inflamatorios agudos que sugiere la intervención de los sistemas antioxidantes.

Tomando en cuenta lo mencionado, podemos decir que el tipo de respuesta inmunitaria se va modificando a lo largo del tiempo en el curso de una infección crónica, y depende de la presencia de antígenos circulantes, de la persistencia de la estimulación antigénica y de la formación de inmuno-complejos, como se adapta o se abate la infección.

Este punto es clave para conocer en qué momento se inicia la reproducción asexual de los cisticercos ya que cuando baja dicha respuesta inmune, se favorece la proliferación de los parásitos (PADILLA, 2001).

1.4.1.1 Especies reactivas de oxígeno causante del estrés oxidante en el cisticerco y homeostasis redox

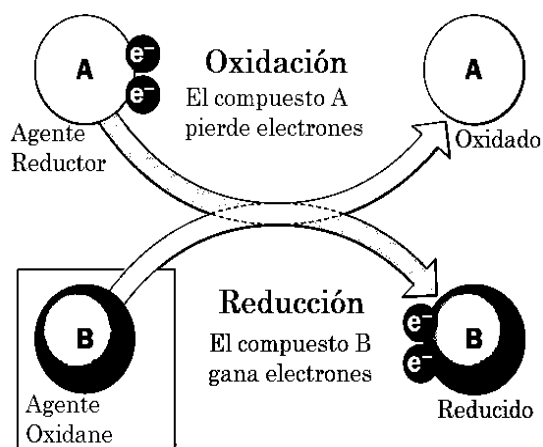
Algunas de las principales moléculas que produce el hospedero para evitar la infección parasitaria, son las producidas de la reducción incompleta del oxígeno y se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO), estas por sus características químicas pueden generar un daño oxidante en el parásito, conocido como estrés oxidante (ALESSIO, 2006).

El efecto dañino de estas moléculas se debe a que adicionalmente a las producidas por el metabolismo propio del cisticerco (de origen endógeno), hay una sobreexposición por las producidas por el hospedero (de origen exógeno); aunque también puede ocurrir una depuración deficiente de las ERO. El resultado es la generación de estrés oxidante que daña parcial o totalmente al cisticerco.

Para evitar el estrés oxidante, las células (y en este caso los parásitos) poseen sistemas antioxidantes que les permite mantener un equilibrio entre su estado reducido/oxidado (redox) y con ello evitar el daño de sus componentes por una oxidación excesiva. Esto es lo que se describe como homeostasis redox, que consiste en un balance entre la tasa de producción de ERO y la tasa de eliminación de las mismas por medio de mecanismos antioxidantes (DRÖGUE, 2002), cuando los cisticercos están expuestos a un desequilibrio redox, se ven en la necesidad de activar sus sistemas antioxidantes (Figura 5) y así evadir el daño.

Por tal motivo los parásitos, cuentan con sistemas muy eficaces para contrarrestar la respuesta inmunológica y poder llevar a cabo su establecimiento en el huésped y posteriormente continuar con su ciclo biológico. Para dichos organismos es indispensable mantener una homeostasis redox ya que, de lo contrario, implicaría que no puedan parasitar de forma correcta al hospedero y con ello no continuar con el ciclo. Por esta razón, al igual que otros helmintos que causan enfermedades crónicas, son organismos ideales para estudiar las defensas antioxidantes debido a que ellos no solo están sujetos a oxidantes endógenos, sino también como ya se mencionó, están bajo estrés oxidante por las células de su hospedero (SALINAS, 2004).

Figura 5. Elementos de un sistema antioxidante
(Tomado de WWJ en <https://waterwelljournal.com/the-oxidation-reaction/>)



1.4.2 Sistemas Antioxidantes

Los sistemas antioxidantes pueden ser de origen enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos son: los carotenoides, el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), flavonoides, selenio y el glutatión; que pueden sintetizar o bien obtenerlos exógenamente. Entre los mecanismos antioxidantes enzimáticos encontramos a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT), las peroxirredoxinas (Prx), el sistema tiorredoxina y el sistema glutatión (MARTÍNEZ, 2009).

1.4.2.1 El sistema glutatión y el sistema tiorredoxina

Siendo los sistemas redox dependientes del glutatión y la tiorredoxina los dos sistemas más importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula y en la

transducción de señales y moléculas efectoras que participan en la señalización redox (MARTÍNEZ, 2009), se describen brevemente cada uno de sus componentes:

1.4.2.1.1 El sistema dependiente del Glutati6n

Éste comprende a las enzimas glutati6n reductasa (GR) y glutati6n peroxidasa (GPx) adem6s del trip6ptido glutati6n (GSH) y la prote6na glutarredoxina (Grx) (Figura 6).

El glutati6n es un trip6ptido (formado por ciste6na, glutamato y glicina). Es abundante en todas las c6lulas animales y tiene como funci6n proteger a la c6lula, al mantener el estado redox. Cuando se encuentra en su forma reducida (GSH), participa donando su electr6n; al hacerlo, dos mol6culas se unen para formar la forma oxidada, denominada disulfuro de glutati6n (GSSG). Es la TGR en cestodos, la que se encarga de reducir al GSSG generando dos mol6culas de GSH y permitiendo que 6ste se recicle. En la mayor6a de los otros organismos, es la Glutati6n reductasa (GR) la que realiza esta funci6n (MARTÍNEZ, 2009).

Otras funciones del glutati6n, son: el transporte de amino6cidos, el mantenimiento del estado redox de prote6nas y de compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo, en la reducci6n no enzim6tica de distintas sustancias como radicales libres o la acci6n por medio de enzimas para desactivaci6n de sustancias t6xicas, tambi6n mantiene en su forma reducida al 6cido asc6rbico (AA) y participa en la formaci6n de desoxirribonucle6tidos (MATHEWS, 2002). De tal modo que, el glutati6n debido a su reactividad y concentraci6n intracelular, es uno de los antioxidantes celulares m6s importantes, siendo eficiente en el

rescate de pequeñas moléculas oxidadas y en la reacción directa con las ERO (SALINAS, 2006), de ahí la importancia que se encuentre disponible en las células.

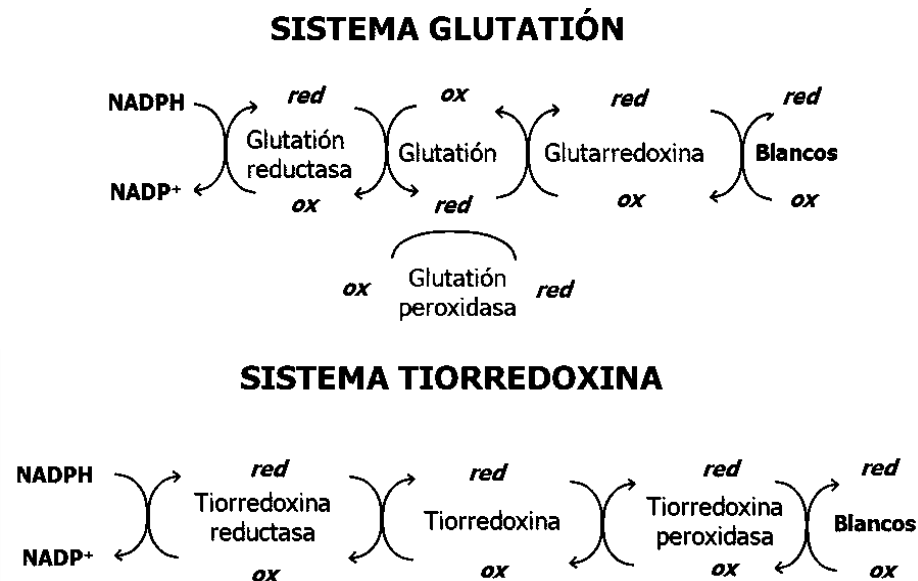
En condiciones normales, la relación entre las concentraciones de GSH: GSSG en citosol es aproximadamente de 100:1 en mamíferos (RENDÓN, 2008), en cambio, en el cisticerco de *Taenia crassiceps* la relación es de 5:1 (GUEVARA, 2004). Además, previamente, se ha descrito la existencia de mecanismos para regular el balance redox del cisticerco, en especial del glutatión en sus formas reducida y oxidada (MARTÍNEZ, 2015) por lo que sabemos que es indispensable que se mantenga el glutatión en concentraciones adecuadas para poder cumplir su funcionamiento adecuadamente.

1.4.2.1.2 El sistema dependiente de la Tiorredoxina

En el caso del sistema dependiente de la Tiorredoxina (Trx), comprende a las enzimas tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina peroxidasa o peroxirredoxina (Prx) y la proteína tiorredoxina (Figura 6).

La principal función de la tiorredoxina en su forma reducida es la de proveer equivalentes reductores a una amplia variedad de rutas metabólicas y procesos intracelulares como en la síntesis de desoxirribonucleótidos, en la detoxificación de peróxido vía las tiorredoxinas peroxidadas y la de mantener a las proteínas intracelulares en su estado reducido (MARTÍNEZ, 2009).

Figura 6. Sistemas Antioxidantes basados en Glutati3n y Tiorredoxina
(Tomado de SlidePlayer en <http://slideplayer.es/slide/1671692/>)



1.4.3 La Tiorredoxina Glutati3n Reductasa

Una integrante de la familia de las TrxR, es la Tiorredoxina Glutati3n Reductasa (TGR), descrita en el 2001 por Sun y colaboradores, en testículo de rat3n.

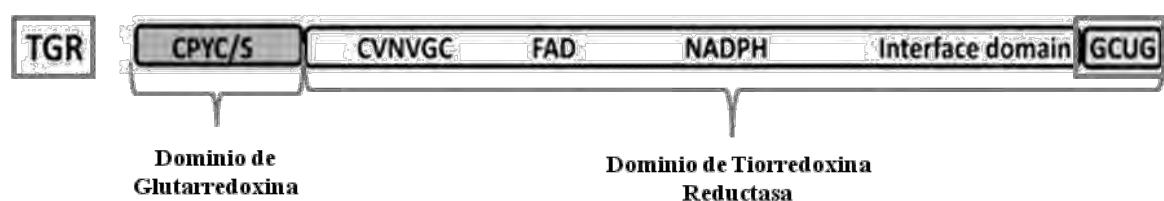
Esta enzima quimérica puede reducir tanto al glutati3n como a la tiorredoxina (CHANGKLUNGMOA, 2015).

La TGR es la 3nica enzima encargada de mantener en equilibrio la homeostasis redox de los parásitos platelmintos y sustituye tanto a la TrxR como a la GR, ambas ausentes en estos organismos (SALINAS, 2010; MARTÍNEZ, 2011).

La enzima Tiorredoxina Glutati3n Reductasa (TGR) (Figura 7), es una selenoproteína, que se encarga de las funciones antioxidantes de los platelmintos parásitos y confiere al organismo la capacidad de mantener la homeostasis redox celular (SUN, 2001; SALINAS, 2004), es la enzima que a través de la tiorredoxina, dona sus electrones a la

Ribonucleótido Reductasa (RR) para la síntesis de desoxirribonucleótidos, por lo que su inhibición o síntesis deficiente afectaría la síntesis de DNA (SALINAS, 2010).

Figura 7. Estructura primaria de la Tiorredoxina Glutathión Reductasa (TGR)
Se indica el dominio glutarredoxina N-terminal, el dominio discontinuo de unión a FAD, a NADPH y el dominio de dimerización
(Modificado de Williams, 2013)



La TGR se caracteriza por tener varios sitios catalíticos. En uno de ellos está presente un residuo de selenocisteína (RENDON 2004; WILLIAMS, 2013), conocido también como “el aminoácido número 21” (Sec en el código de tres letras, U en el código de una letra).

Este aminoácido estructuralmente es análogo a la cisteína, distinguiéndose de ésta por presentar un átomo de selenio en vez de azufre. Cabe mencionar que debido a la dependencia de la Sec para que la TGR lleve a cabo su función catalítica, una deficiencia de selenio podría afectar directamente la actividad y eficiencia de la TGR como se ha reportado para las TrxR de ratón (HILL, 1997; HADLEY, 2001).

1.4.3.2 Ribonucleótido Reductasa y su dependencia de equivalentes reductores

La Ribonucleótido Reductasa (RR) es una enzima esencial responsable de catalizar la biosíntesis de desoxirribonucleótidos (dNTP), necesarios para la síntesis de DNA durante la división celular en todos los organismos, desde procariotas hasta eucariotas (SANVICENS, 2013).

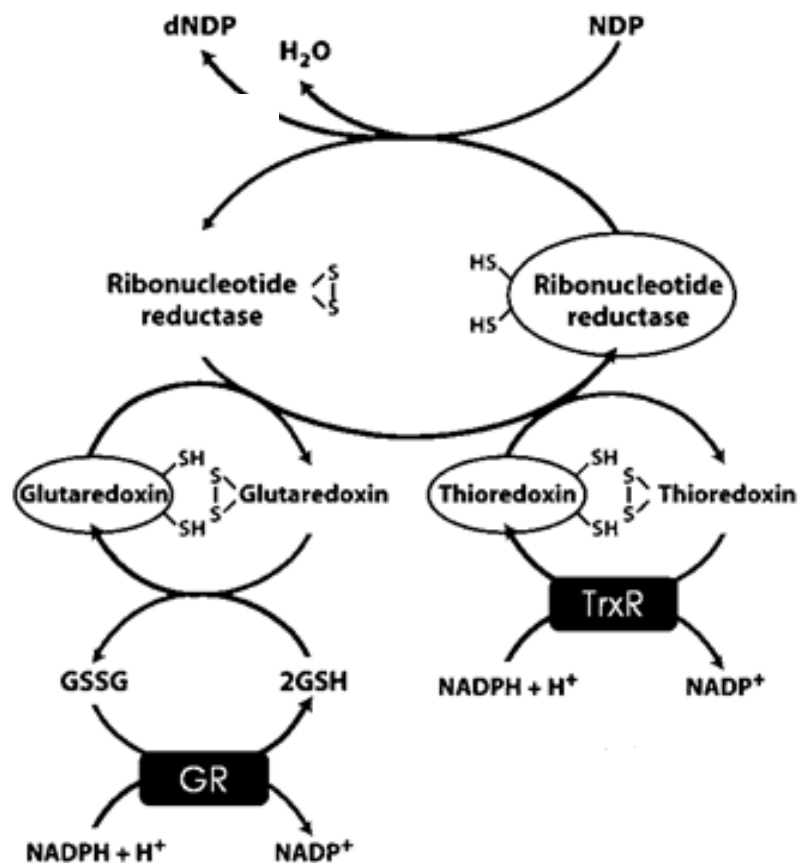
Para que realice este proceso, la RR requiere estar en una forma reducida, siendo la GR y la TrxR las dos enzimas responsables de reducirla a través de la glutarredoxina y de la tiorredoxina respectivamente (Figura 8).

En el caso de los cestodos, la TGR es la enzima responsable de reducirla a través de la tiorredoxina (DORMEYER, 2001). Por lo tanto, si la TGR no está activa o en cantidades adecuadas para transferir electrones, la síntesis de DNA y por lo tanto, la reproducción de los parásitos se ve comprometida.

Además, se ha demostrado que por ser la única enzima capaz de regular los dos sistemas antioxidantes del cisticerco (y cestodos en general), la inhibición de reductasa mediante compuestos electrofílicos como el auranofin (sal derivada del oro) ocasiona la muerte del parásito (MARTÍNEZ, 2010). Este mismo fenómeno se observó en *Echinococcus granulosus* al abatir la síntesis de esta enzima mediante el uso de RNAi.

Debido a que la TGR es una selenoproteína, es de suma importancia para el cisticerco de *T. crassiceps* que el medio donde se cultive, cuente con la concentración óptima de selenio, así como de otros elementos para cubrir todas las necesidades metabólicas del parásito.

Figura 8. Sistema de transferencia de electrones de los sistemas de Glutatión y Tiorredoxina a la Ribonucleótido Reductasa para la síntesis de desoxirribonucleótidos
(Modificado de Nelson, 2015)



1.4.4 El selenio como elemento esencial en las selenoproteínas

El selenio es un elemento traza esencial tanto en mamíferos como en platelmintos. Salinas en 2010, menciona que la importancia de este oligoelemento se debe a las selenoproteínas.

El selenio puede encontrarse principalmente en dos formas: la orgánica, como selenometionina (SeMet) y selenocisteína (Sec) y la forma inorgánica, en los iones selenato (SeO_4^{2-}) y selenito (SeO_3^{2-}).

La selenocisteína es un aminoácido más reactivo que la cisteína a pH fisiológico. Debido a esto en las selenoproteínas de función conocida, está siempre involucrado en la catálisis redox.

Como ya se mencionó, el selenio tiene una participación importante en la estructura de las selenoproteínas por lo que su deficiencia puede causar alteraciones importantes en cualquier organismo. Sin embargo, al requerirse sólo en cantidades traza, su exceso podría causar toxicidad (HILL, 1997; BOEHLER, 2013). Diversos reportes mencionan que todas las formas inorgánicas de selenio son tóxicas, aunque a diferentes concentraciones. No obstante, la toxicidad del selenio depende no sólo del compuesto de selenio empleado y la dosis, sino también en el método de administración, tiempo de exposición, la especie animal tratada, el estado fisiológico y la interacción del selenio con otros metales, nutrientes, etc. (WEN, 2011; VALDIGLESIAS et al., 2010).

En el caso del nematodo *Caenorhabditis elegans*, (utilizado como modelo de toxicología acuática y del suelo), se ha realizado varios estudios para evaluar los beneficios y la toxicidad del selenio, como los siguientes:

- a) Wen (2011), suplementa con selenito de sodio 0.01 y 0.05 μM los medios de cultivo para dicho organismo, y reporta que se acelera el desarrollo y aumentan el tamaño las crías, mientras que la adición de 20 μM de selenito de sodio retrasa la tasa de desarrollo y disminuye el tamaño de cría.
- b) En 2014, el mismo autor muestra que a pesar de todos los resultados de toxicidad del selenio en *C. elegans*, a concentraciones trazas de 0.01 μM , éste elemento tiene propiedades antioxidantes ya que interviene en la respuesta de las selenoproteínas y

mejora significativamente la supervivencia de *C. elegans* bajo estrés por calor y estrés oxidante.

- c) Boehler reportó en 2013 que *C. elegans* puede sobrevivir a concentraciones máximas de 100 μM y que en cultivo puede concluir su ciclo de vida, a diferencia de otras concentraciones como 200 y 500 μM , lo que nos indicaría que en otros helmintos (como los cestodos) los niveles de selenio no podrían sobrepasar esta concentración, de lo contrario habría un efecto tóxico.

Sin embargo, en *T. crassiceps* aún no existe información sobre el efecto del selenio por lo que es indispensable conocer el rango óptimo de concentración de selenio y sus efectos sobre el mismo en el medio de cultivo.

Por otro lado, Hill (1997) reportó que ratas con deficiencia de selenio en su dieta, presentan una disminución funcional en la enzima tiorredoxina reductasa (TRxR), que disminuyó a un 4.4% en el hígado y a 11% en el riñón. Posteriormente, Hadley (2001) también demostró la importancia de este elemento en estas proteínas, cuando en ratas con deficiencia de selenio presentan, una disminución en la síntesis de RNAm para la TrxR y GPx-4 así como la disminución en su actividad, lo que indica el papel regulador del selenio.

Karlenius en 2011, muestra que la proliferación celular en cultivos de células cancerosas, se ve beneficiada si se adiciona selenio al medio que si no se le añade. Asimismo, se encontró que la actividad de las selenoproteínas como la TrxR, la glutatión reductasa (GR) y la GPx, depende de la presencia de selenio en el medio de cultivo.

Por lo tanto, es de suma importancia que el medio de cultivo para *T. crassiceps* cuente con una concentración óptima de selenio para que la actividad enzimática de la TGR

se vea favorecida y así desarrolle su función como donadora de electrones para la RR, de tal forma que el cisticerco pueda reproducirse en el medio. No obstante, el selenio no es el único elemento indispensable para ésta enzima, ya que es una enzima que utiliza dos sustratos para poder donar electrones: la tiorredoxina y el glutatión (SALINAS, 2010), éste último por estar limitado en los medios de cultivo comerciales, también debe tomarse en cuenta en la suplementación del medio para la reproducción asexual del cisticerco.

Hasta el día de hoy, se ha reforzado el concepto de que los sistemas de tiorredoxina y glutatión unidos por la TGR juegan un papel fundamental en la defensa antioxidante de platelmintos (KUNTZ, 2007; MARTÍNEZ, 2010; BONILLA, 2011). Y podría ser clave en la reproducción asexual de los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

El propósito de esta tesis es proponer un medio de cultivo axénico bajo condiciones controladas para la reproducción asexual de los cisticercos de *T. crassiceps* con el fin de disminuir el uso de los ratones como reservorio de los cisticercos, cumpliendo esencialmente con el “principio de Reemplazo”, y a su vez, ofrecer nuevas alternativas que permitan:

- Obtener material biológico para estudiar al parásito sin la intervención del huésped
- La modulación de las condiciones de cultivo para el aislamiento del cestodo en diferentes etapas de desarrollo
- Muestreo de un número definido de parásitos, modulación y análisis de los factores que rigen el crecimiento y la proliferación
- Investigaciones de captación y secreción de sustancias
- Conocer más a detalle el mecanismo de acción de los fármacos, así como el desarrollo de ensayos *in vitro* para determinar la viabilidad del parásito (HEMPHILL, 2002).

2. HIPÓTESIS

Si se cultivan cisticercos de *Taenia crassiceps* en medio con las concentraciones óptimas de selenio, entonces este parásito lo incorporará a la TGR y esta favorecerá la reproducción asexual *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.4 Objetivo general

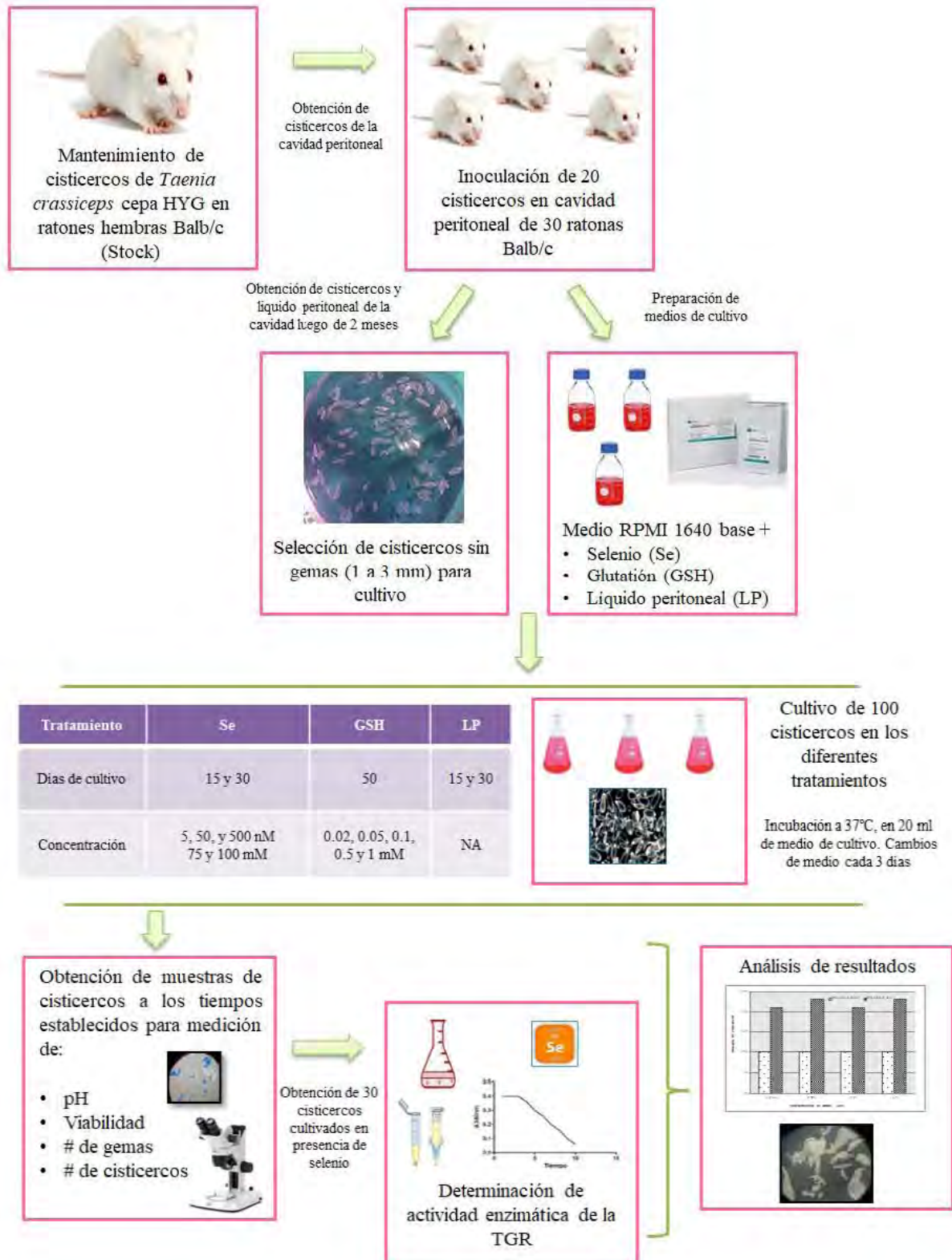
- Establecer la formulación del medio de cultivo óptimo para inducir la reproducción asexual del cisticerco de *T. crassiceps*.

3.5 Objetivos particulares

- Estudiar si la deficiencia de selenio en el medio de cultivo está relacionada con la deficiencia de Tiorredoxina Glutación Reductasa (TGR) y por ende, con la capacidad reproductiva del cisticerco *in vitro*.
- Identificar la concentración de selenio que se requiere en el medio de cultivo para la reproducción asexual de los cisticercos
- Determinar si la actividad de la TGR se ve favorecida con la presencia de selenio
- Conocer el efecto del glutatión sobre el cisticerco de *T. crassiceps*
- Conocer el efecto del líquido peritoneal sobre el cisticerco de *T. crassiceps*

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general



4.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo se adquirieron de los siguientes laboratorios:

- GIBCO/INVITROGEN®: Medio RPMI 1640 Lote 1306237
- J.K.BAKER: Bicarbonato de Sodio y Fosfato de Sodio.
- SIGMA: HEPES (N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)), Penicilina-Estreptomicina al 1%, PMSF (Fenil-metil-sulfonil-fluoruro), Tris (Hidroximetil) aminometano-ácido, EDTA (Ácido etilendiamintetraacético), Colorante Azul Tripano, Selenito de Sodio, Glutación (GSH).

4.3 Material Biológico

4.3.1 Obtención de ratones

Los ratones se obtuvieron en la Unidad de Bioterio (Facultad de Medicina, UNAM) y fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Bioquímica de la misma facultad, que cumple con las condiciones apegadas a la NOM-062-ZOO-1999; bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12 h y una temperatura constante de 22°C, con alimento y agua *ad libitum*.

El mantenimiento y transporte de los ratones se realizó en cajas de polipropileno con pisos y paredes continuas sólidas (cama de viruta) con tapa removible de reja.

Ratones hembras (30) de la cepa Balb/c de 6 semanas de edad, con un peso promedio de 18 gramos, fueron sometidos a un periodo de adaptación de una semana antes de iniciar el experimento, (7 semanas de edad al momento de iniciar cada ensayo).

4.3.2 Obtención de cisticercos de *Taenia crassiceps* para cultivo

El grupo de investigación con el que se realizó el siguiente trabajo, cuenta con un reservorio (stock) de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa HYG, que se mantienen dentro del mismo Bioterio del Departamento. De dicho stock, se obtuvo un ratón como donador (con dos meses de infección), para iniciar la infección de los ratones usados en la fase experimental de esta tesis.

El ratón donador se sacrificó por dislocación cervical (de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999) y se obtuvieron los cisticercos de la cavidad peritoneal del ratón, en condiciones estériles.

Posteriormente, se colocaron en una solución amortiguadora fosfato-salina (PBS) 10 mM, pH 7.4 (DEL ARENAL, 2005) estéril, y se lavaron entre 3 a 4 veces con la misma solución en un recipiente estéril para su posterior selección.

El cadáver fue depositado en un contenedor para desechos biológico-infecciosos a 4°C para su incineración.

4.3.3 Propagación de cisticercos

Una vez obtenidos los cisticercos, se colocaron en una caja de Petri con PBS, se seleccionaron 20 cisticercos de manera aleatoria y con jeringa de 1 ml y aguja calibre 18, se inocularon los ratones vía intraperitoneal, para generar la parasitosis.

Los ratones se mantuvieron en el bioterio antes mencionado, durante un periodo máximo de 4 meses, siendo monitoreados continuamente para asegurar que su estado de salud fuera adecuado.

4.3.4 Selección y mantenimiento de los cisticercos para cultivo

Al cumplir los 2 meses de infección, se recuperaron los cisticercos de los ratones parasitados, en las condiciones antes mencionadas. La selección de los parásitos se realizó manualmente, con ayuda de un microscopio estereoscópico y se formaron alícuotas de 100 cisticercos de aproximadamente de 3-5 mm de diámetro sin gemas.

4.4 Medio de cultivo RPMI 1640

Se utilizó medio RPMI 1640 en polvo (GIBCO/INVITROGEN®) preparado en agua destilada y suplementado con: 2.2 g de HEPES (N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)) y 2.2 g de Carbonato de sodio (Na_2CO_3). El pH final del medio se ajustó a 7.0 y se esterilizó por filtración (poro 0.22 μm). Finalmente, se suplementó con antibióticos: penicilina-estreptomina al 1% inmediatamente antes de su uso. Una vez listo el medio, se separó en volúmenes idénticos y se añadió a cada uno:

- Selenio (5.0, 50 y 500 nM y 75 y 100 μM),
- Glutación (0.02, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM)

4.5 Obtención de líquido peritoneal de ratones infectados

Simultáneo a la obtención de los cisticercos de los ratones, se colectó el líquido peritoneal (LP) más el PBS (usado para la obtención de los cisticercos) presente en la cavidad peritoneal de los ratones con 2 meses de infección.

El LP colectado de cada grupo experimental (10 ml promedio por ratón), se recuperó por separado y se almacenó a -20°C , para la posterior preparación de medios experimentales.

4.5.1 Medio de cultivo RPMI 1640 con líquido peritoneal

En el caso del medio de cultivo con líquido peritoneal se preparó de acuerdo a lo antes mencionado con la diferencia de que en el lugar de agua se utilizó el líquido peritoneal con PBS obtenido de los ratones parasitados.

4.6 Diseño experimental para el cultivo de cisticercos con medio RPMI 1640 en presencia de diversos compuestos

4.6.1 Condiciones de cultivo de los cisticercos

En matraces de vidrio de 50 ml se colocaron los 100 cisticercos sin gemas previamente seleccionados, en 20 ml de medio RPMI 1640 base suplementado con los distintos tratamientos. La relación medio-cisticerco fue de 20:1 (v/v), para favorecer la oxigenación y aportar de manera segura los nutrientes para su mantenimiento, crecimiento y su posterior reproducción. La incubación se realizó a una temperatura constante de 37°C porque en el interior de su huésped original se expone a esta misma temperatura.

Durante el periodo de cultivo, se cambió el medio cada 3 días en condiciones de esterilidad con el objetivo de evitar cambios de pH, agotamiento de nutrientes y no limitar el metabolismo de los organismos, así como evitar la acumulación de desechos productos

del mismo. El cambio se hizo en proporción 1:1, es decir, de los 20 ml de medio por tratamiento se retiraron 10 ml de medio y se agregó 10 ml de medio fresco. En cada cambio se determinó el pH del medio descartado. Los tratamientos se realizaron por duplicado, todos bajo las mismas condiciones de mantenimiento y esterilidad.

4.6.2 Cultivo de cisticercos en presencia de selenito de sodio

Se cultivaron los cisticercos en las condiciones de cultivo antes mencionadas con presencia de selenito de sodio 5.0, 50, y 500 nM y 75 y 100 μ M, durante 15 y 30 días. Luego del tiempo de cultivo, se recuperaron los cisticercos para evaluar diversos parámetros.

4.6.3 Cultivo de cisticercos en presencia de glutatión

Se expuso a cisticercos en condiciones de cultivo con glutatión reducido a concentraciones de 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM durante 50 días. Pasando el tiempo de tratamiento, se recuperaron los cisticercos para evaluar diversos parámetros.

4.6.4 Cultivo de cisticercos en presencia de líquido peritoneal

Se cultivaron cisticercos durante 15 y 30 días en medio RPMI 1640 preparado en el líquido peritoneal obtenido al momento de la colección de cisticercos. Pasando el tiempo de tratamiento, se recuperaron los cisticercos para evaluar diversos parámetros.

4.7 Medición del efecto de los tratamientos sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps*

4.7.1 Medición de pH en los medios de cultivo

Para la medición de pH se utilizaron tiras indicadoras de pH (Merck). Se midió el pH a todos los tratamientos, al inicio de cada cultivo, durante los cambios de medio y al final, una vez concluidos los tiempos establecidos.

4.7.2 Parámetros de viabilidad: motilidad y tinción con colorante vital Azul Tripano

Se determinó la viabilidad de los cisticercos por dos métodos, de acuerdo a Martínez, 2010:

1) Ensayo de viabilidad por motilidad

La motilidad se evaluó observando las contracciones musculares activas del cisticercos al microscopio estereoscópico y que sólo presentan los parásitos vivos. Dicho movimiento incrementa considerablemente luego de su exposición a temperatura alta. Por el contrario, los cisticercos muertos son aquéllos que no presentaron ningún tipo de movimiento.

Se tomaron alícuotas de 30 cisticercos de cada tratamiento, se colocaron en cajas de Petri de 5 cm y se enjuagaron con PBS. Una vez limpios, se estimuló su movimiento mediante su exposición a una temperatura de 45°C (baño María) durante un minuto. Posteriormente, se observaron al microscopio y se cuantificó el número de cisticercos totales con movimiento (vivos) y sin movimiento (muertos).

2) Ensayo de viabilidad por tinción con colorante vital: Azul Tripano

Una vez realizada la prueba de motilidad se procedió a agregar a cada caja de Petri 1 ml de colorante vital Azul Tripano al 0.02% y se dejó reposar durante 15 minutos. Una vez cumplido el tiempo de exposición, los cisticercos se enjuagaron con PBS y se determinó el patrón de tinción para comprobar el número de cisticercos teñidos (muertos) y no teñidos (vivos).

4.7.3 Parámetros de reproducción: cuantificación del número de gemas y del número de cisticercos

Una vez cumplido cada uno de los tiempos de tratamiento (15, 30 y 50 días) respectivamente, se procedió a contabilizar el número de gemas por cisticerco así como el número de cisticercos presentes en los matraces de cultivo, con ayuda de un microscopio estereoscópico.

4.8 Determinación de la actividad enzimática de la Tiorredoxina Glutación Reductasa en cisticercos de *Taenia crassiceps* cultivados en presencia de selenio

La determinación se hizo acorde a lo reportado por Martínez 2010. A continuación se describe brevemente el procedimiento.

4.8.1 Obtención, almacenaje y procesamiento de muestras

Se recuperaron alícuotas de 30 cisticercos de cada uno de los tratamientos efectuados, se lavaron, se retiró todo el exceso de líquido y se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento y medición de la actividad enzimática de la TGR en extractos crudos.

Para la obtención de extractos crudos, se procedió a descongelar a temperatura ambiente las muestras de 30 cisticercos provenientes de cada tratamiento con selenio.

Una vez temperadas, se homogeneizaron manualmente con un pistilo de teflón Bel Art (ICA) en presencia de PMSF (Fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 86 μ M. Posteriormente, se centrifugaron todas las muestras a 18000 rpm a 4°C durante 60 minutos, se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf para realizar un dializado, usando una membrana con corte de peso molecular de 3.500 kDa (Spectrum), contra una solución Tris (Hidroximetil) aminometano-ácido 50 mM EDTA (Ácido etilendiamintetraacético) 1 mM, pH 7.8 (amortiguados TE) a 4°C, durante 24 horas. Se realizaron 2 cambios de solución, uno a las 24 horas y otro, 2 horas antes de recuperar el dializado. En estas muestras, se determinó proteína y la actividad de la enzima (MODIFICACIÓN DE MARTÍNEZ, 2009).

4.8.3 Determinación de proteína

Una vez obtenidos los dializados de cada muestra, se procedió a medir la concentración de proteína por el método de Lowry (1951) modificado por Markwell (1978).

4.8.4 Actividad de la Tiorredoxina Glutación Reductasa por espectrofotometría

La actividad enzimática de la TGR se midió en cada uno de los dializados utilizando un espectrofotómetro (BECKMAN-530) a una temperatura de 39°C. Para el ensayo se agregaron: 120 μ M de NADPH más 100 μ L de muestra, a un volumen final de 1.0 ml de

amortiguador TE y se registró la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos para obtener la línea basal. La reacción se inicia al agregar 60 μ L de GSSG. La actividad se obtiene midiendo en el tiempo inicial de reacción, la disminución de la señal a 340 nm debida a la oxidación del NADPH (RENDÓN, 2004).

4.9 Cuantificación de selenio en medio RPMI 1640 en polvo

Se enviaron al Grupo Integral de Servicios Fitosanitarios ENA S.A. de C.V (GISENA) muestras de medio RPMI 1640 (GIBCO/INVITROGEN®) de dos diferentes lotes: uno con número 1306237 utilizado durante toda la fase experimental y otro como control (1 gramo por muestra), para cuantificación de selenio por medio del método Determinación de Metales y Metaloides por Espectroscopía de Emisión Óptica-Plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (FSISM, 2013).

4.10 Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno en las distintas muestras

Con alícuotas de 10 cisticercos de cada uno de los tratamientos: control, selenio, glutatión y su combinación, se realizó la técnica de cuantificación de especies reactivas de oxígeno descrito por Martínez (2016) para determinar si existía correlación entre la presencia de ERO en mayor o menor medida con la viabilidad y reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

4.11 Análisis de Resultados

Los resultados obtenidos de esta investigación se analizaron mediante estadística descriptiva en donde se realizó una comparación entre tratamientos para destacar semejanzas y diferencias entre sí. Se utilizó el programa Microsoft Excel 2010 para la obtención de tablas y gráficos.

5. RESULTADOS

En la presente tesis se midieron los siguientes parámetros para determinar el efecto del selenio (adicionado en forma de selenito de sodio al medio de cultivo) en la reproducción de los cisticercos: viabilidad, cuantificación de gemas y de cisticercos; así como la actividad de la Tiorredoxina Glutatión Reductasa (TGR). Adicionalmente a la presencia de selenio, se probó el efecto del glutatión y del líquido peritoneal en la reproducción del cisticerco.

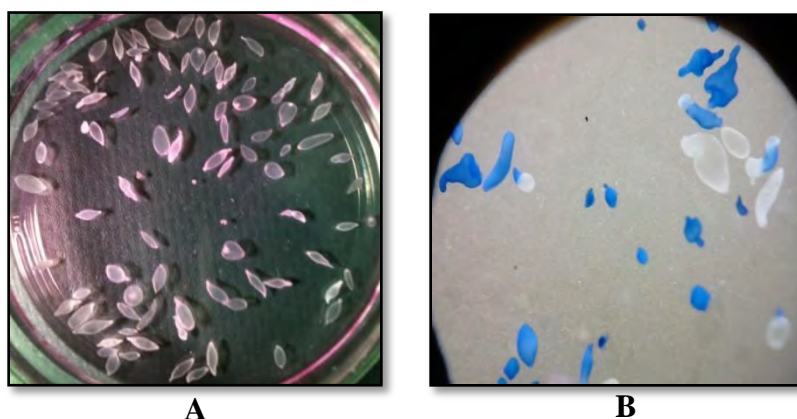
5.1 Determinación de viabilidad con dos diferentes parámetros

En todos los casos, los parámetros de viabilidad: movimiento y tinción con el colorante azul tripano coincidieron entre sí, por lo cual, se reporta de manera conjunta estos dos parámetros, mostrando los valores como % de ATM (Azul Tripano-Motilidad).

En el caso de los cisticercos muertos se observó una coloración azul intenso persistente, la cual se mantiene aún con el lavado de PBS. Los cisticercos vivos no se tiñen (Figura 9).

Figura 9. Cisticercos expuestos al colorante Azul Tripano: (A) Cisticercos vivos (B) Cisticercos muertos.

Fotos tomadas a través de Microscopio estereoscópico con cámara digital



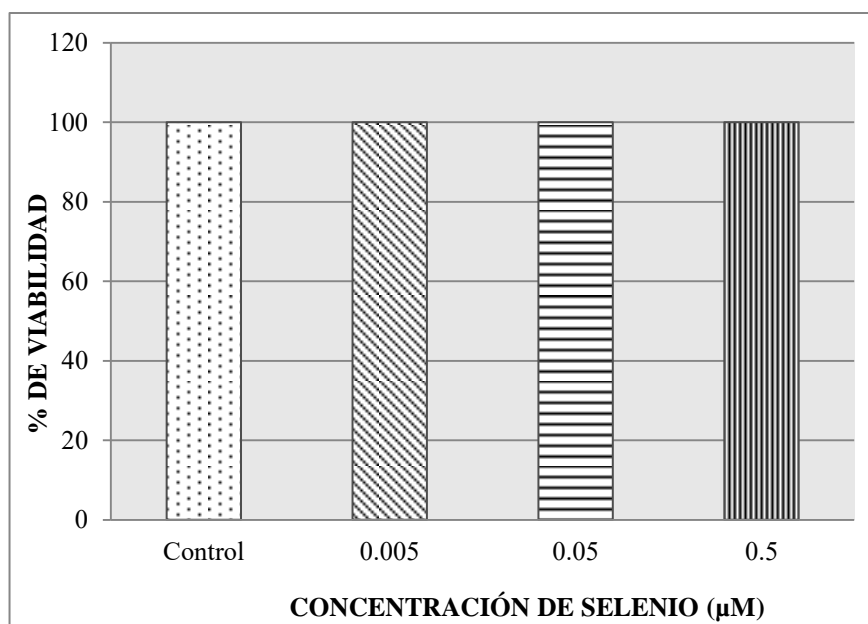
5.1.1 Efecto del selenio en la viabilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en cultivo

Se probó el efecto del selenito de sodio a 5, 50 y 500 nM sobre la viabilidad de los cisticercos en cultivo con RPMI 1640 durante 15 y 30 días, en todos los casos la viabilidad ATM fue de 100% (Figura 10).

Posteriormente se probó el efecto del selenito de sodio a 75, 100 y 1000 μ M sobre la viabilidad de los cisticercos en cultivo en RPMI 1640 y se observó que sólo los controles se mantenían vivos y todos los tratamiento con selenio presentaban un mortalidad del 100% a partir del segundo día de cultivo, por lo tanto, el selenio fue tóxico (Figura 11).

Cabe mencionar que los cisticercos presentaron movimientos contráctiles evidentes una vez que estuvieron en contacto con el selenito de sodio en el medio, estos movimientos son muy comunes cuando están en condiciones de estrés.

Figura 10. Efecto del selenio en la viabilidad de los cisticercos cultivados *in vitro*



*El control corresponde al medio RPMI 1640 con 200 nM de Se no reportado en la formulación.

Figura 11. Cisticercos expuestos a selenito de sodio 100 μ M durante 15 días
Foto tomada a través de Microscopio estereoscópico con cámara digital



5.2 Efecto del selenio en la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en cultivo

La evaluación del efecto del selenio (5, 50, y 500 nM) en la reproducción de los cisticercos en cultivo se llevó a cabo a través de la contabilidad del número de cisticercos y del número de gemas totales (en 100 cisticercos) a los 15 días (Figura 12 y 13) y a los 30 días de cultivo (Figura 14 y 15).

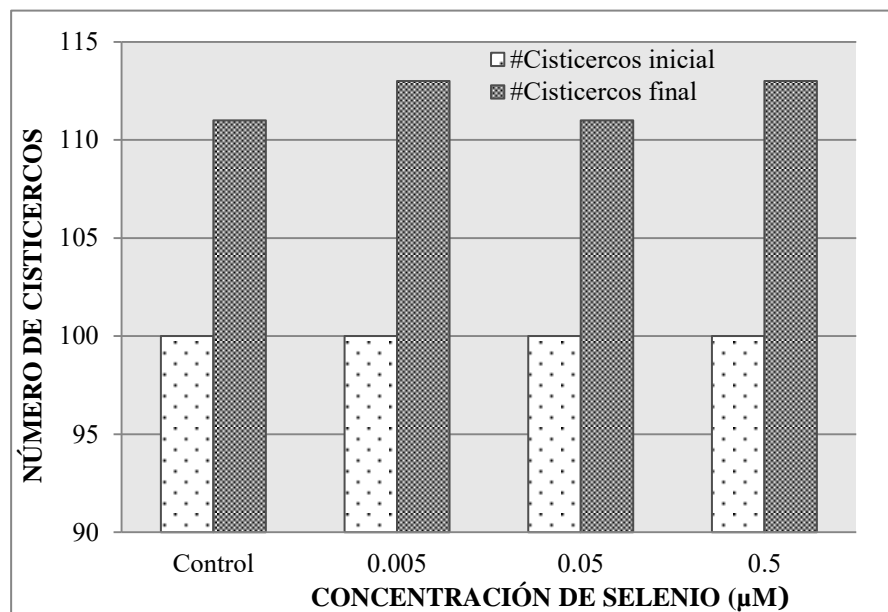
En todos los casos se observó un aumento en el número de cisticercos y en el número de gemas. Sin embargo, cabe destacar que tanto en los tratamientos como en los controles hubo un efecto en los cisticercos, ya que se logró tener nuevos individuos que son resultado de una reproducción asexual (síntesis de desoxirribonucleótidos), que si bien, no es por un efecto directo del selenio, sí indica que la enzima TGR se mantiene activa con dichas concentraciones del metal. Adicionalmente a esto, en todos los grupos evaluados se observó gemación (Figura 16).

Finalmente, se observaron cambios con respecto al tamaño de los cisticercos que de forma general aumentaron a concentraciones nanomolares, lo que también sugiere una síntesis activa de desoxirribonucleótidos, y por ende, que las enzimas trabajan adecuadamente.

Cuando se midió el efecto del selenio durante 15 días, a concentraciones de selenito de sodio en un rango micromolar: 75 100 y 1000 μM ; con el objetivo de ver si se requerían cantidades mayores de este elemento para lograr finalmente el aumento de cisticercos en el medio. No se observó un aumento en el número de cisticercos y la gemación fue nula ya que a partir del segundo día había cisticercos muertos.

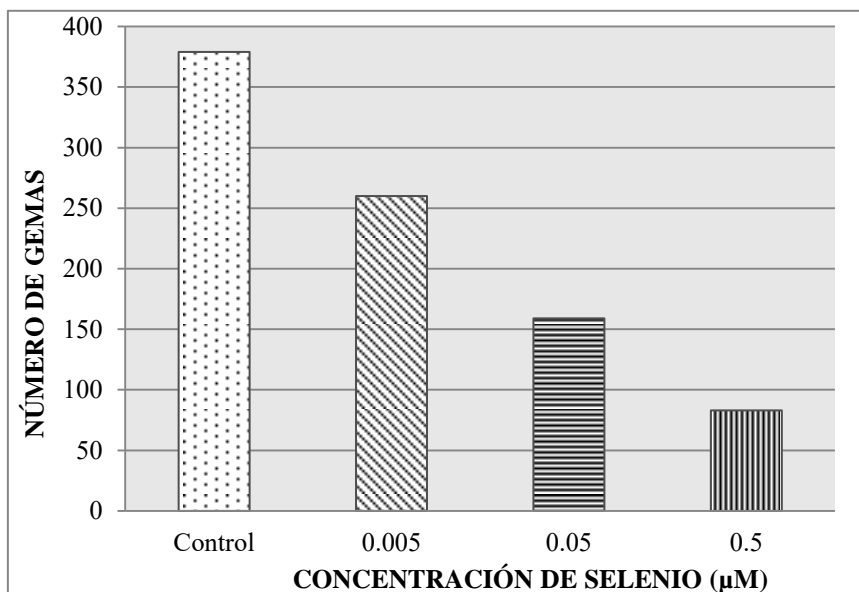
Los cisticercos control se mantuvieron vivos pero sin un aumento en el número de cisticercos y un ligero aumento de gemas (120 gemas/100 cisticercos).

Figura 12. Efecto del selenio en el número de cisticercos cultivados *in vitro* durante 15 días



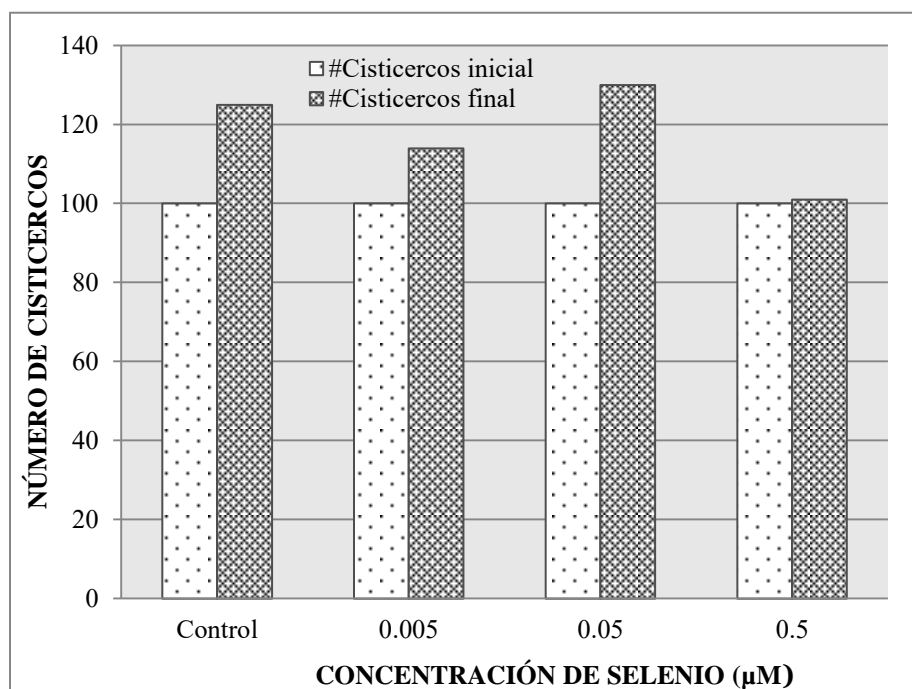
*El control corresponde al medio RPMI 1640 con 200 nM de Se no reportado en la formulación.

Figura 13. Efecto del selenio en la gemación total de los cisticercos cultivados *in vitro* durante 15 días



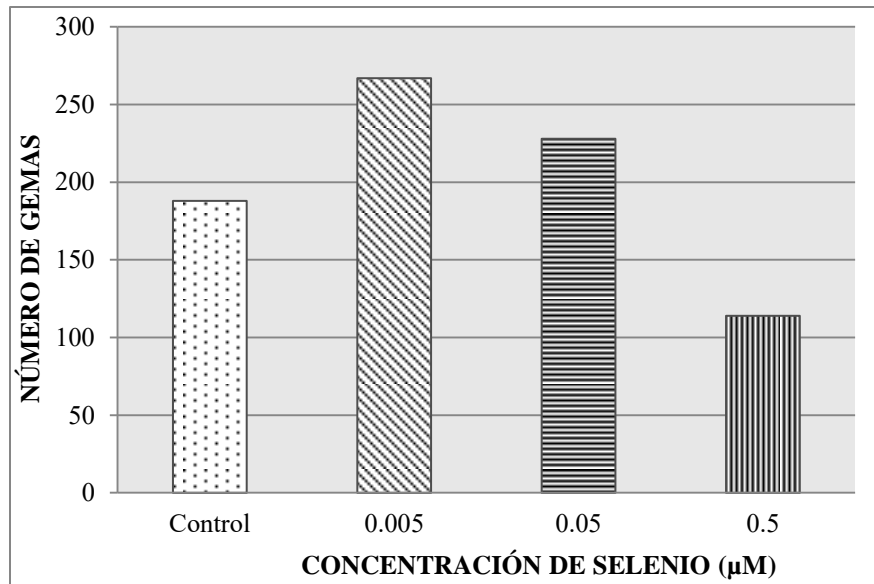
*El control corresponde al medio RPMI 1640 con 200 nM de Se no reportado en la formulación.

Figura 14. Efecto del selenio en el número de cisticercos cultivados *in vitro* durante 30 días



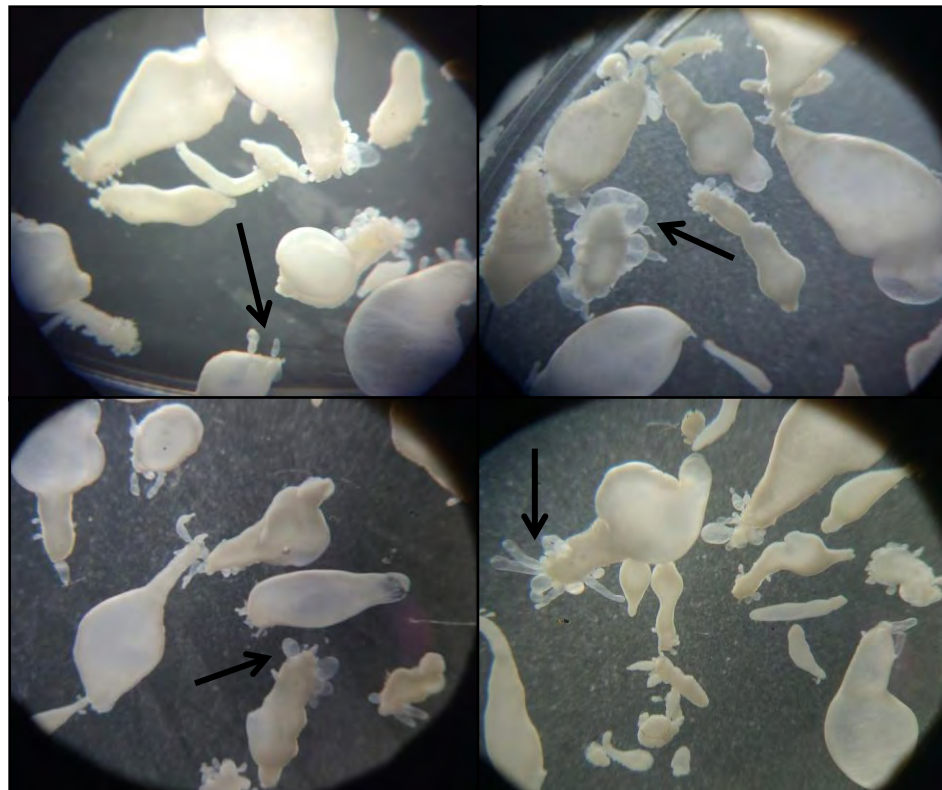
*El control corresponde al medio RPMI 1640 con 200 nM de Se no reportado en la formulación.

Figura 15. Efecto del selenio en la gemación total de los cisticercos cultivados *in vitro* durante 30 días



*El control corresponde al medio RPMI 1640 con 200 nM de Se no reportado en la formulación.

Figura 16. Cisticercos de *Taenia crassiceps* gemando en cultivo *in vitro*
Fotos tomadas a través de Microscopio estereoscópico con cámara digital



Los resultados hasta aquí obtenidos sugerían que no hay ningún efecto del selenio adicionado al medio de cultivo en la reproducción de los cisticercos, ya que éstos se mantuvieron vivos aún en ausencia de alguna fuente externa de selenio después de 30 días.

Por esta razón, se mandó determinar la cantidad de selenio elemental presente en el medio RPMI 1640 (GIBCO/INVITROGEN®).

5.3 Determinación de la concentración de selenio en medio RPMI 1640

La determinación de selenio en dos lotes de RPMI 1640 en polvo, fue realizada por espectroscopia de Emisión Óptica-Plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), en la unidad de servicio del laboratorio GISENA (Cuadro 6). A partir de la cantidad reportada, la concentración de selenio en los medios de cultivo, se determinó considerando las instrucciones de preparación del fabricante (GIBCO-INVITROGEN).

Cuadro 6. Concentración de Se, obtenida a partir de la cuantificación de selenio elemental en dos lotes de medio RPMI 1640 por ICP-OES.

LOTE	Cantidad (ng/g)	Concentración (nM)
1306237	963	197.71
1112591	937	192.38

Como se muestra en el cuadro 6, la concentración de selenio elemental determinado en ambos lotes es similar, por lo que se asume que esta cantidad es constante en la presentación de este medio. Este dato fue importante en nuestros estudios debido a que la concentración de selenio en el medio RPMI, no está reportado en la formulación proporcionada por el fabricante.

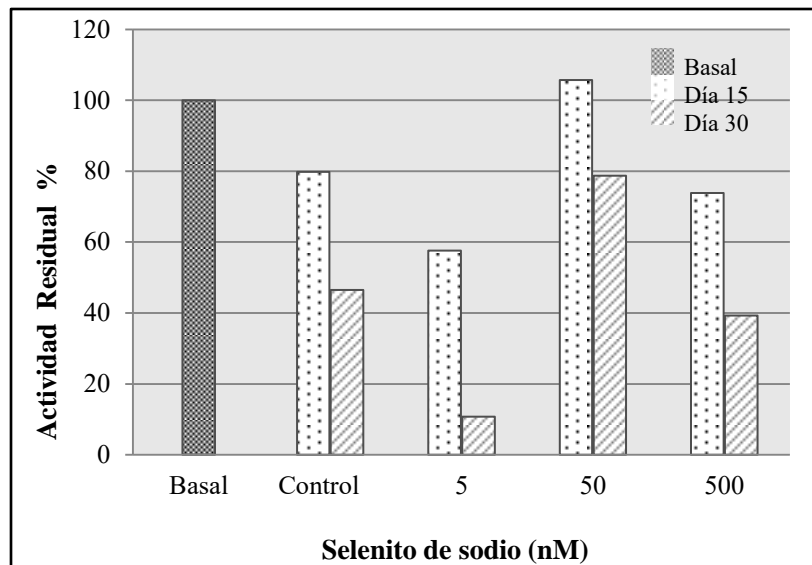
Después de los resultados reportados por GISENA, y sabiendo que el medio RPMI 1640 de GIBCO/INVITROGEN® si contiene selenio aunque no está reportado, las concentraciones usadas de selenito de selenio se sumaron a los 200 nM que contiene el medio. Quedando concentraciones de: 200, 205, 250, 700 nM y 75.2, 100.2 y 1000.2 μ M.

Por lo que se sugiere que la viabilidad y efectos del selenio basal en el medio fue lo que mantuvo al 100% a los controles y ninguna diferencia en los tratamientos, excepto en la toxicidad.

5.4 Efecto del selenio sobre la actividad de la enzima Tiorredoxina Glutación Reductasa

La actividad de la TGR se muestra en la Figura 17, donde se observa claramente que la actividad de la enzima disminuye con el tiempo en comparación con la actividad basal. Sin embargo, vale la pena resaltar que ésta se mantiene hasta el día 30 lo que parece indicar que es posible que se esté consumiendo el selenio del medio pero no lo suficiente, y que los aproximadamente 200 nM que tiene el RPMI 1640, son suficientes para que esta enzima se sintetice.

Figura 17. Actividad específica de la TGR a 15 y 30 días de cultivo



*El control corresponde al medio RPMI 1640 con 200 nM de Se no reportado en la formulación.

5.5 Efecto del glutatión en la viabilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en cultivo

Muestras de cisticercos por cuadruplicado, se cultivaron en presencia de Glutatión (GSH) a 100, 200, 500 y 1000 μM durante 50 días, sólo los controles y GSH a 1000 μM (pH 7.4) presentan una viabilidad del 100%.

A concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 μM toda la población de cisticercos muere después del día 35 de cultivo, lo que correlaciona con el cambio de pH que presentaron dichos cultivos, sobrepasando el 7.7 (máximo tolerable para los cisticercos en cultivo) y llegando hasta 7.9 de pH. Por lo tanto, el medio al tornarse alcalino puede provocar que los cisticercos no sean viables. De manera general se observó un aumento de tamaño en los cisticercos control y de los cultivados en presencia de 1000 μM de GSH (Figura 18), sin embargo no hubo aumento en número de organismos y gemas.

5.6 Efecto del glutatión en la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en cultivo

En el caso de la reproducción de los cisticercos en cultivo en presencia de GSH se observó que no hubo un efecto sobre los mismos, ya que en ambos parámetros (número de cisticercos y gemación) los resultados no fueron los esperados en cuanto a reproducción (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto del glutatión en los cisticercos durante 50 días de cultivo

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (μM)	%ATM	# GEMAS
CONTROL	0	100	0
	100	0	0
GSH	200	0	0
	500	0	0
	1000	100	83

%ATM=Viabilidad Azul Tripano-Motilidad, GEMAS= Número de gemas totales en los cisticercos de *Taenia crassiceps*

Figura 18. Diferencia de tamaño entre cisticercos de 15 (A), 30 (B) y 50 (C) días de cultivo en presencia de 1000 μM de GSH

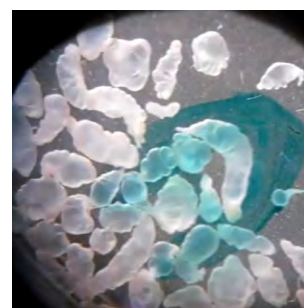
Fotos tomadas a través de Microscopio estereoscópico con cámara digital



A



B



C

5.7 Efecto del líquido peritoneal en la viabilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en cultivo

En el caso de la viabilidad de los cisticercos cultivados en medio RPMI 1640 preparado con líquido peritoneal de ratones infectados, se observó una mortalidad del 100% tanto a los 15 como a los 30 días de cultivo de dicho tratamiento (Figura 19). Con respecto al efecto en la reproducción, no hubo ningún tipo de reproducción asexual en los cisticercos ninguno de los tratamientos, incluidos los controles.

Figura 19. Cisticercos muertos, por efecto del cultivo con medio RPMI 1640 preparado con líquido peritoneal de ratones con 2 meses de infección.

Fotos tomadas a través de Microscopio estereoscópico con cámara digital



5.8 Evaluación de pH en los medios de cultivo

A lo largo del experimento, se midió el pH en todos los cultivos (al inicio, durante cada cambio de medio y al final), todas las mediciones de pH fueron similares y éste se mantuvo siempre en un intervalo de 7.2 a 7.6, exceptuando los medios con GSH 100, 200 y 500 μ M que después de 35 días se alcalinizó, sobrepasando el 7.7 de pH.

5.9 Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno en las distintas muestras

Se cuantificaron las especies reactivas de oxígeno de todas las muestras de cisticercos con distintos tratamientos de selenio, glutatión y líquido peritoneal sin embargo los resultados no fueron concluyentes dado que los controles no indicaban certeza en la técnica.

6. DISCUSIÓN

El cestodo *Taenia crassiceps*, ha sido desde hace años utilizado como modelo para el estudio de dos enfermedades prevalentes en México: La teniosis (causada por *Taenia solium*) y la neurocisticercosis (causada por su metacestodo).

Una de las razones radica en la capacidad de *Taenia crassiceps* de reproducirse asexualmente en la cavidad peritoneal de ratones (a diferencia de *T. solium*) por lo que ha sido el modelo de estudio de diversos procesos biológicos importantes. Sin embargo, no existen datos sobre el establecimiento de las condiciones que permitan la reproducción asexual *in vitro* del cisticerco, aunque existen reportes donde se han probado diversas condiciones de cultivo, sólo se ha logrado un aumento en la gemación (OSTOA 2010; ESCOBEDO, 2009). En esta investigación, el parámetro que indicaría la reproducción asexual de los cisticercos fue el aumento en el número total de individuos ya que, el requerimiento de desoxirribonucleótidos tanto para gemación como para aumento del número de cisticercos es indispensable; pero en diferente magnitud, por tanto, las enzimas requieren una mayor actividad en el segundo caso.

Se requiere sustituir dicho modelo y encontrar una alternativa de cultivo que permita por un lado obtener mayor cantidad de cisticercos, y por otro disminuir el uso de animales de laboratorio.

Entre los medios más utilizados para el mantenimiento del cisticerco de *T. crassiceps*, es el medio RPMI 1640 (GIBCO/INVITROGEN®) que es usado habitualmente para el cultivo de células, ya que proporciona todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (aminoácidos, vitaminas, minerales y sales inorgánicas). No obstante, en la

formulación proporcionada por el proveedor, no reporta la presencia de ninguna fuente de Selenio, el cual se sabe es un oligoelemento indispensable para las selenoproteínas como la enzima TGR. La importancia de esta enzima para la reproducción del cisticerco radica, en que es la única enzima encargada de donar electrones para la síntesis de desoxirribonucleótidos (necesarios para la duplicación del DNA), proceso que lleva a cabo la enzima Ribonucleótido reductasa, y por tanto involucrada en la reproducción asexual de los cisticercos.

En este estudio se investigó el efecto del selenio exógeno sobre la reproducción asexual del cisticerco de *T. crassiceps*, tanto a concentraciones nano como micromolares.

Para llevar a cabo el estudio de suplementación de selenio en un medio de cultivo, el primer paso era determinar el rango óptimo de exposición, evitando el efecto tóxico que produce su exceso. En este caso, se decidió utilizar selenio en forma de selenito de sodio para suplementar al medio de cultivo RPMI 1640 base, con concentraciones de 5, 50 y 500 nM. Debido a que no existen reportes previos sobre los requerimientos de selenio en platelmintos, se utilizó como base estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el cual reportan la suplementación con selenito de sodio en un rango de 10 a 50 nM observando un crecimiento y desarrollo acelerado, mientras que la adición de 20 μ M lo retarda (WEN, 2011).

En este caso, se suplementó el medio con 0.005, 0.05, 0.5, 75, 100 y 1000 μ M de selenito de sodio durante 15 y 30 días y se observó que a concentraciones a partir de 75 μ M el selenio es tóxico, tal vez, por la generación de estrés oxidante debido a los altos niveles de selenio. En un principio esto podría parecer contradictorio ya que este microelemento es

considerado como antioxidante, sin embargo, puede (bajo ciertas condiciones y en función de su estado de oxidación) reaccionar con otras moléculas para producir ERO, aunque los mecanismos exactos todavía son poco claros (VALDIGLESIAS, 2010).

Por el contrario, se observó que en todos los casos a concentraciones nanomolares (control 200, 205, 250 y 700 nM), los cisticercos se mantienen viables y con un ligero aumento en la gemación y en el número de cisticercos, sin lograr obtener un número de individuos cercano, al producido en el modelo murino. Más aún, este mismo fenómeno se observó en los cisticercos cultivados en ausencia de una fuente de selenio por lo que surgió una interrogante: ¿Por qué están vivos en ausencia de selenio? Adicionalmente, tras medir la actividad de la Tiorredoxina Glutación Reductasa en extractos crudos provenientes de estos cisticercos, se observó que está activa hasta el día 30, por lo que se llegó a formular una segunda pregunta: ¿Por qué hay actividad de esta enzima si hay carencia de selenio?

Por esta razón, se decidió mandar a determinar la presencia de selenio en el medio RMPI 1640 base. Contrario a lo reportado por el proveedor GIBCO/INVITROGEN®, se demostró que en esta presentación comercial del medio RPMI 1640 contiene al menos 200 nanomolas de selenio por litro de medio. Este valor es compatible con lo reportado como la concentración mínima necesaria para que las selenoproteínas se pueden mantener activas (KARLENIUS, 2011).

La discrepancia en la cantidad de selenio reportado para el cultivo celular no es nueva. Karlenius y colaboradores reportaron que la cantidad de selenio en los sueros utilizados para el crecimiento de células es muy variado y no se considera en los estudios previamente reportados, ellos encuentran que es posible registrar diferentes cantidades de

este oligoelemento en Suero Fetal Bovino (SFB) en función del país de origen, el laboratorio encargado de su producción e incluso del lote utilizado. Este grupo de investigadores probó diferentes sueros con concentraciones de 200 a 500 nM de selenio en cultivos celulares y observó que la actividad de las selenoproteínas se veía afectada por la concentración de este elemento, por lo que demostraron que esto puede influir en los resultados de las investigaciones.

En esta investigación los datos sugieren que el selenio a las concentraciones usadas, no contribuye para exacerbar la reproducción asexual de los cisticercos de *T. crassiceps* (ya que siempre estuvo presente en los tratamientos y, sin embargo no se observó un aumento representativo en el número de cisticercos) pero sí es necesario a una concentración mínima de 200 nM, para que su sistema antioxidante TGR se mantenga activo y funcional y sugiere, los cisticercos viables durante el cultivo, (KARLENIUS, 2011). No obstante, se debe demostrar que a concentraciones de 0 y menores de 200 nM el selenio tiene o no, un efecto en la viabilidad y en la reproducción asexual de los cisticercos.

En este sentido, es bien sabido que la deficiencia de selenio compromete la actividad de las enzimas dependientes de selenio como la TrxR y la TGR así como de otras enzimas antioxidantes como la GR (ausente en el cisticerco) (HILL, 1997; HADLEY, 2001; KARLENIUS, 2011). Por ejemplo, Hadley y colaboradores reportaron la importancia del selenio en las enzimas sele-noddependientes cuando administró a ratas, dietas con y sin deficiencia de selenio y observó que cuando hay deficiencia de selenio, la actividad de las enzimas se ve afectada.

Abdelahi en 2010, del mismo modo demostró que el selenito de sodio mejora el desarrollo folicular *in vitro* en ovarios de ratonas, aumentando la capacidad total antioxidante y la actividad de la enzima Glutatión Peroxidasa, además de reportar una reducción de los niveles de ERO lo que en conjunto mejora el desarrollo *in vitro* de los folículos ováricos en las ratonas.

En este sentido, se puede observar que la regulación de los niveles de selenio en el medio es un factor crítico que puede comprometer la reproducción e incluso la supervivencia de los helmintos. En este caso, se cree, que es necesario hacer más estudios para evaluar este sutil límite entre la reproducción y el cese del desarrollo pues, aunque se logró observar un aumento en el número de gemas por individuo, no se logró obtener un incremento representativo en el número de cisticercos por tratamiento; tal vez debido a mecanismos de regulación de la reproducción hasta ahora desconocidos.

Dado que la reproducción *in vitro* del cisticerco es un objetivo muy ambicioso y perseguido por muchos grupos de investigación, han sido numerosos los compuestos ensayados para estimular esta reproducción como: SFB (TOLEDO, 1997; PADILLA, 2001; ZURABIAN, 2010; ESQUIVEL, 2014), glucosa, insulina, hormonas esteroideas como el estradiol y la testosterona (OSTOA, 2010; ESCOBEDO, 2009), entre otras sustancias. Sin embargo, en todos los casos (al igual que este trabajo) sólo se ha logrado estimular un aumento en la gemación. Esto lleva a nuevas interrogantes: ¿Qué le hace falta al medio de cultivo, si no es el selenio? Por tanto, se decidió proponer otros esquemas de suplementación.

La primera opción fue el glutatión, que por su importancia como donador de electrones para la RR a través de la glutarredoxina, podía ser el factor ideal a ensayar. Esto debido a que el cisticerco cuenta con 1 mM de glutatión (MARTÍNEZ, 2015) y en el medio RPMI 1640 sólo hay 0.003 mM, además, que éste se oxida rápidamente en las condiciones de cultivo. De tal forma, se decidió, adicionar al medio RPMI base, con glutatión a diversas concentraciones (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM). Sin embargo, tampoco se obtuvieron los resultados deseados, a pesar de que se adicionó siempre antes del cambio de medio, para evitar su oxidación.

Una segunda opción fue, cultivar a los cisticercos en medio RPMI 1640 preparado en líquido peritoneal (LP) de ratones infectados con cisticercos “esperando” que en el líquido peritoneal hubiera moléculas que indujeran la reproducción asexual, acorde a lo observado en el modelo murino existente de cisticercosis. Contrario a lo esperado, el resultado en todos los casos fue la mortalidad del 100% de la población de cisticercos ensayados. Esto sugiere una respuesta de tipo inmunológica en el líquido (debido a la presencia de algún factor no celular) que no permitió la viabilidad y por ende, la reproducción de los cisticercos.

Finalmente, a la par de esta investigación, se probaron otras opciones de cultivo como: suplementación con vitamina E (por ser antioxidante) y medios con grenetina y colágena (para dar estructura y estabilidad al medio así como simular la cavidad peritoneal del ratón pensando en que el medio físico también era clave para la reproducción). Sin embargo, en ninguna de las alternativas de cultivo se obtuvieron resultados.

A pesar de no obtener los resultados esperados tras la suplementación de selenio al medio de cultivo de los cisticercos, se realizaron dos importantes contribuciones al conocimiento de este modelo:

- A partir de 75 μM de selenito de sodio en el medio de cultivo, este es tóxico para los cisticercos, lo que ofrece a otros investigadores la sugerencia para trabajar en un rango nanomolar (por debajo de los 1000 nM), en posteriores estudios. Otro elemento a considerar es:
- La evaluación del selenio en el mantenimiento de la actividad de TGR del cisticerco de *T. crassiceps* y *T. solium*, ya que en estudios previos no han tenido problema debido a la inadvertida presencia de 200 nM de selenio en el medio usado. Sin embargo, no se puede dejar pasar por alto la observación que debido a estos compuestos no reportados en los medios de mantenimiento y cultivo es que existen diferencias entre los resultados obtenidos al trabajar con uno u otro medio.

Es importante recalcar que sí se observó gemación en todos los casos con selenito de sodio a concentraciones nanomolares, e incluso un aumento en el tamaño de los cisticercos pero que esto, no es suficiente para sustituir al modelo murino como método de obtención de material biológico para la investigación de la cisticercosis.

Con este trabajo queda claro que los mecanismos de reproducción asexual *in vitro* de los metacestodos de *T. crassiceps* aún no se han dilucidado. Los efectos del selenio y el glutatión pueden ser esenciales para el mecanismo de reproducción a través de las enzimas seleno-dependientes pero no sugieren ser el factor esencial para detonar la reproducción asexual en condiciones *in vitro*. Estos hallazgos ayudan avanzar nuestra comprensión en el mecanismo de las enzimas seleno-dependientes en la interacción con la reproducción asexual de los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

7. CONCLUSIONES

Es posible mantener viables a los cisticercos en presencia de selenio en concentraciones máximas de 700 nM, durante 30 días.

El selenio en concentraciones por arriba de 75 μ M, es tóxico para los cisticercos cultivados *in vitro*.

El selenio a las concentraciones usadas, parece no ser un factor determinante para la reproducción asexual del cisticerco.

La actividad de la TGR se mantiene hasta por 30 días por la presencia de selenio 200 nM del medio de cultivo.

Los cisticercos cultivados en presencia continua de 1 mM de GSH pueden permanecer viables hasta 50 días, pero no contribuye en la reproducción asexual de los metacestodos.

A diferencia de lo reportado por el proveedor, se encontró que el medio RPMI 1640 de GIBCO/INVITROGEN®, sí contiene selenio (200 nM). Este es un dato importante a considerar en aquellos estudios que utilizan este medio para cultivar células o microorganismos.

El líquido peritoneal de ratones parasitados tiene un efecto letal cuando se añade al cultivo *in vitro* de cisticercos de *T. crassiceps*.

8. REFERENCIAS

1. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA & Davoodi D. Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. Human Reproduction. 2010; 25 (4): 977-985.
2. Alessio HM & Hagerman AE. Oxidative Stress, exercise and aging. Imperial Collage Press. Miami University, USA. 2006; 1-8.
3. Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) Gaceta Médica, México. 2002; 138: 3, 295-298.
4. Aranda A. & Pastor L. Ética con la experimentación con animales. Revista Bioética y Ciencias de la Salud. 1997; 3 (4): 1-11.
5. Bailón LL, González RM & Cervantes SA. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. 2003; 16-23.
6. Baron PJ. On the histology and ultrastructure of *Cysticercus longicollis*, the cysticercus of *Taenia crassiceps* Zeder, 1800, (*Cestoda*, *Cyclophyllidae*). Parasitology. 1968; 58 (3): 497-513.
7. Boehler C, Raines A, & Sunde R. Deletion of Thioredoxin Reductase and Effects of Selenite and Selenate Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. Plos One. 2013; 8 (8): 1-8.
8. Bonilla M, Denicola A, Marino SM, Gladyshev VN & Salinas G. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminthes parasites: alternative pathways for glutathione reduction and de-glutathionylation. Journal of Biological Chemistry. 2011; 286 (7): 4959–4967.

9. Changklungmoa N, Pornanan K, Kant S, Panningan C, Wipaphorn J, Suda R, *et al.* Molecular cloning and characterization of *Fasciola gigantica* thioredoxin-glutathione reductase. *The Journal of Parasitology*. 2015; 114: 2119-2127.
10. Chau CY. Intraperitoneal passage of *Taenia crassiceps* in rats. *The Journal of Parasitology*. 1976; 62: 5, 837-839.
11. Cordero CM & Rojo VFA. *Parasitología Veterinaria*. 2da. ed. McGraw-Hill: Madrid, España. 2001; 105-112, 451-489.
12. Del Arenal IP, Rubio ME, Ramírez J, Rendón JL & Escamilla JE. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. *Parasitology International*. 2005; 54: 185-193.
13. Dormeyer M, Reckenfelderbaumer N, Ludemann H, & Krauth L. Trypanothione-dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* Ribonucleotide Reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (14): 10602-10606.
14. Drögue W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002; 82: 49-54.
15. Elissondo MC, Dopchiz MC, Zanini F, Pérez H, Brasesco M & Denegri G. Strain characterization of *Echinococcus granulosus* protoscoleces of cattle origin using the *in vitro* vesicular development. *Parasite*. 2005; 12: 159-164.
16. Escobedo G, Romano MC & Morales MJ. Differential *in vitro* effects of insulin on *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *Journal of Helminthology*. 2009; 83: 403-412.
17. Esquivel M, Hernández R, Larralde C, & Ostoa S. Crosstalk among *Taenia crassiceps* (ORF Strain) cysts regulates their rates of budding by ways of soluble and contact signals exchanged between them. *BioMed Research International*. 2014: 1-4.

18. Flisser A. Cisticercosis: enfermedad desatendida. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 2011; 68 (2): 138-145.
19. Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernández M & Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. Infection and Immunity. 1998; 66: 760–764.
20. Frederick W. Advance in immunology. 2010; 108: 22-37.
21. Freeman RS. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology. 1962; 40: 969-990
22. FSISM, Food Safety and Inspection Service Method 103. CLG- TM3.04. Determination of metals by ICP-MS and ICP-OES (Optical Emission Spectrometry). Última revision Sep. 30, 2013.
23. Fuentes RO. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la cisticercosis porcina. [tesis de maestría]. México, (D.F.): Instituto Politécnico Nacional. 2011; 20-29.
24. García PL, Mendoza GB & Pérez PLG. Biodiversidad de Platyhelminthes parásitos en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 2014; 85: 164-170.
25. Guevara FA. Caracterización parcial del sistema de glutatión y de tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*. [tesis de maestría]. México (D.F). Universidad Nacional Autónoma de México. 2004; 31.
26. Hadley KB & Sunde RA. Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and in rat liver. Journal of Nutritional Biochemistry. 2001; 12: 693-702.
27. Havelaar *et al.* World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. PLOS Medicine. 2015; 12(12): en e1001923.

28. Hemphill A, Stadelmann B, Scholl S, Müller J, Spiliotis M, Müller N, Gottstein B & Soles M. *Echinococcus* metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. *Parasitology*. 2010; 137: 569-587.
29. Hemphill A, Stettler M, Walker M, Siles L, Fink R, *et al.* Culture of *Echinococcus multilocularis* metacestodes: an alternative to animal use. *Trends in Parasitology*. 2002; 18 (10): 445-451.
30. Hemphill A, Stettler M, Walker M, Siles LM, Fink R & Gottstein B. *In vitro* culture of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus vogeli* metacestodes: studies on the host-parasite interface. *Acta Tropical*. 2003; 85: 145-155.
31. Hill K, McCollum G, Boeglin M, & Burk R. Thioredoxin Reductase Activity Is Decreased by Selenium Deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997; 234: 293-295.
32. Karlenius TC, Shah F, Yu WC, Hawkes HJ, Tinggi U, Clarke FM & Tonissen KF. The selenium content of cell culture serum influences redox-regulated gene expression. *BioTechniques*. 2011; 50 (5): 295-301.
33. Kuntz AN, Davioud CE, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, Arnér ES, *et al.* Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLOS Medicine*. 2007; 4: 206.
34. Lamothe AR & García PL. *Helmintiasis del hombre en México*. 2da. ed. AGT Editor: México. 1988; 25-45.
35. Larralde C, Sciutto E & Huerta L, *et al.* Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 1989; 57: 2, 131–134.
36. Lowry OH, Rosenbrough A, Lewis F & Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-275.

37. Markwell AK, Haas SM, Bieber LL & Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 1978; 87: 206-210.
38. Márquez NA, Pérez RA, Zepeda RA, Reynosa DO, Hernández CA, Hernández LF, Castillo R, Yépez ML & Ambrosio RJ. RCB20, an experimental benzimidazole derivate, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Journal of Parasitology Research*. 2013; 112: 2215-2226.
39. Martínez GJJ, Guevara FA, Rendón JL & del Arenal IP. Auranofin- induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2015; 201: 16-25.
40. Martínez JJ, Guevara A, Álvarez J, Rendón J, & del Arenal P. *In vitro* killing action of auranofin on *Taenia crassiceps* (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). *Journal of Parasitology Research*. 2010; 107 (1): 227-231.
41. Martínez JJ. Efecto del auranofin en los procesos REDOX de platelmintos parásitos. [Tesis modalidad por artículo científico de maestría]. México (D.F.): Universidad Nacional Autónoma de México. 2011; 21.
42. Martínez JJ. Efectos del auranofin en los procesos REDOX del cisticerco de *Taenia crassiceps* [tesis de licenciatura]. México (D.F.): Universidad Nacional Autónoma de México. 2009; 59-66.
43. Martínez JJ. Participación de los sistema dependientes de glutatión y tiorredoxina en el mantenimiento del estado redox del cisticerco de *Taenia crassiceps* [tesis de doctorado]. México (D.F.): Universidad Nacional Autónoma de México. 2016; 6-12, 43-48.
44. Mathews C, Van Holde K, & Ahern K. *Bioquímica*. 3ra. Ed. Madrid (España): Paerson Addison Wesley; 2002: 841-850.

45. Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F & Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Veterinary Parasitology*. 1997; 69: 55-63.
46. Moreau E & Chauvin A. Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2010; 1-9.
47. Nelson LD & Cox MM. Lehninger, Principios de Bioquímica. 6ta. ed. OMEGA. 2015: 917.
48. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). En: Diario Oficial de la Federación, México, 6 de diciembre de 1999.
49. OMS. Teniosis y cisticercosis. [Internet]. [Consultado 1 Dic 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>
50. Ostoa S, Ostoa J, Esquivel M, Bazúa S, & Larralde C. Budding of *Taenia crassiceps* cysticerci *in vitro* is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 1-5.
51. Osuna CA & Mascaró LMC. The *in vitro* cultivation of *Taenia pisiformis* to sexually mature adults. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*. 1982; 67: 67-71.
52. Padilla A, Govezensky T, Sciutto E, *et al.* Kinetic of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. *The Journal of Parasitology*. 2001; 87: 591-599.
53. Palomares AF, Palencia HG, Ortiz PA & Jung CH. Evaluación de la actividad cestocida de nitazoxanida en combinación con albendazol. Estudios *in vitro-in vivo*. Resúmenes de investigación, Suplemento. 2005; 33-34.

54. Pechenic JA. Biology of the invertebrates. Cuarta edición. Mc-Graw Hill. New York, U.S. 2000; 143-16.
55. Rangel RL. Estudio de la respuesta inmune generada por la coinfección *Taenia crassiceps* y *Toxoplasma gondi*. [tesis de licenciatura]. México (Estado de México): Universidad Nacional Autónoma de México. 2011; 3-9.
56. Rendón JL & Juárez O. Glutathione reductase: structural, catalytic and functional aspects. Advances in protein physical chemistry. García HE & Fernández VA (eds). Transworld Research Network. Kerala, India. 2008; 317-349.
57. Rendón JL, del Arenal IP & Guevara FA. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode. Molecular and Biochemical Parasitology. 2004; 133:61-69.
58. Roberts L & Janovy J. Foundations of Parasitology. 7th ed. McGraw-Hill, New York. 2005.
59. Salinas G, Lobanov A & Gladyshev VN. Selenoproteins in parasites. Vadim Gladyshev Publications. 2006; 40 (31): 355-366.
60. Salinas G, Murray E, Cora C, Rick M, & Fernández C. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. TRENDS in Parasitology. 2004; 20 (7): 340-345.
61. Salinas, G. Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. Mensaje Bioquímico. 2010; 34: 121-133.
62. Sánchez JA. Cisticercosis, primera causa de epilepsia en México: experta Alma Ramírez. La jornada 2014 julio 24; Sec. Sociedad: 36 (col 1).
63. Sanvicens, N. Mecanismos de regulación de la enzima Ribonucleótido reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta a la deficiencia de hierro [tesis de doctorado]. Valencia, (ES): Universidad de Valencia; 2013: 27-37.

64. Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Salud Pública de México. 1997; 39 (3): 225-231.
65. Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, Cervantes J, Aluja A, & Larralde C. Development of the S3Pvac Vaccine Against Porcine *Taenia solium* Cysticercosis: A Historical Review. The Journal of Parasitology. 2013; 99: 4, 686 -92.
66. Silva AMV. Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. [tesis de doctorado]. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Universidad Nacional La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. 2014; 6-28.
67. SINAVE. Casos de zoonosis en México hasta la semana epidemiológica 52 del 2017. Dirección General de Epidemiología: Salud; 2017.
68. SlidePlayer. Defensas antioxidantes, curso de biología parasitaria. [Internet]. [Consultado 7 Feb 2017]. Disponible en: <http://slideplayer.es/slide/1671692>
69. Smyth AD & McManus DP. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 1989; 5-21.
70. Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S, & Gladyshev V. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001; 98 (7): 3673-3678.
71. Thermo Fisher Scientific. Technical Resources-Media Formulations A10491 RPMI 1640 (ATCC modification). [Internet]. [Consultado 2 Feb 2017]. Disponible en: <http://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.244.html>
72. Toledo A, Cruz C, Fragoso G, Laclette J, Merchant M, Hernández M, *et al.* *In vitro* culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. The Journal of Parasitology. 1997; 83 (2): 189-193.

73. UAM. Prácticas Invertebrados UAM 2012. [Internet]. [Consultado 7 Feb 2017]. Disponible en: <http://practicasinvertebradosuam2012.blogspot.mx/2012/12/4-revision-de-filo-platelmintos-y.html?view=snapshot>
74. UNAM. Departamento de Microbiología y Parasitología - Recursos en Parasitología: Cestodos. [Internet]. [Consultado 02 Mayo 2018]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cestodos.html>
75. Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J & Laffon B. *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Archives of Toxicology*. 2010; 84: 337–351.
76. Vanda CB. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. *Humanidades y Ciencia. LAB-acta*. 2003; 15: 69-73.
77. Vendelova E, Hrckova G, Lutz MB, Brehm K & Komguez N. *In vitro* culture of *Mesocestoides corti* metacestodes and isolation of immunomodulatory excretory-secretory products. *Parasite Immunology*. 2016; 38: 403-413.
78. Verster A. A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus, 1758, s. str. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1969; 36: 1, 3-58.
79. Wen HL, Fu LH, Jui TL & Vivian HCL. The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 812-819.
80. Wen HL, Yun RJ & Chung ML. Assessment of selenium toxicity on the life cycle of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology*. 2014; 23: 1245-1253.
81. Williams D, Bonilla M, Gladyshev V, & Salinas G. Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent Redox Networks in Platyhelminth Parasites. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013; 19 (7): 735-745.

82. Willms K & Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*. 2010; 137: 335-346.
83. WWJ. Water Well Journal: The Oxidation Reaction. [Internet]. [Consultado 7 Feb 2017].
Disponible en: <https://waterwelljournal.com/the-oxidation-reaction/>
84. Ye Q, Dong HF, Grevelding GC & Hu Min. *In vitro* cultivation of *Schistosoma japonicum*-parasites and cells. *Biotechnology Advances*. 2013; 31: 1722-1737.
85. Zurabian R. Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. *The Journal of Parasitology*. 2008; 94: 1, 1-6.

9. FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Figura 1. A) Esquema de la morfología del cestodo <i>Taenia solium</i> B) Esquema del aparato reproductor del cestodo <i>Taenia solium</i> .	8
Figura 2. Ultraestructura del metacestodo <i>Cysticercus longicollis</i> de <i>Taenia crassiceps</i> .	19
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i> .	21
Figura 4. Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i> .	21
Figura 5. Elementos de un sistema antioxidante.	31
Figura 6. Sistemas Antioxidantes basados en Glutatión y Tiorredoxina.	34
Figura 7. Estructura primaria de la Tiorredoxina Glutatión Reductasa (TGR).	35
Figura 8. Sistema de transferencia de electrones de los sistemas de Glutatión y Tiorredoxina a la Ribonucleótido Reductasa para la síntesis de desoxirribonucleótidos.	37
Figura 9. Cisticercos expuestos al colorante Azul Tripano: (A) Cisticercos vivos (B) Cisticercos muertos	53
Figura 10. Efecto del selenio en la viabilidad de los cisticercos cultivados <i>in vitro</i> .	54
Figura 11. Cisticercos expuestos a selenito de sodio 100 μ M durante 15 días.	55
Figura 12. Efecto del selenio en el número de cisticercos cultivados <i>in vitro</i> durante 15 días.	56

Figura 13.	Efecto del selenio en la gemación total de los cisticercos cultivados <i>in vitro</i> durante 15 días.	57
Figura 14.	Efecto del selenio en el número de cisticercos cultivados <i>in vitro</i> durante 30 días.	57
Figura 15.	Efecto del selenio en la gemación total de los cisticercos cultivados <i>in vitro</i> durante 30 días.	58
Figura 16.	Cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> gemando en cultivo <i>in vitro</i> .	59
Figura 17.	Actividad específica de la TGR a 15 y 30 días de cultivo.	61
Figura 18.	Diferencia de tamaño entre cisticercos de 15 (A), 30 (B) y 50 (C) días de cultivo en presencia de 1000 μ M de GSH.	62
Figura 19.	Cisticercos muertos, por efecto del cultivo con medio RPMI 1640 preparado con líquido peritoneal de ratones con 2 meses de infección.	63

10. CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por platelmintos parásitos que afectan al hombre.	6
Cuadro 2. Casos de Teniosis y Cisticercosis reportados en México del año 2015 a 2017.	11
Cuadro 3. Diferencias morfológicas entre varias especies del género <i>Taenia</i>	17
Cuadro 4. Diferentes formas de cultivos de helmintos.	23
Cuadro 5. Composición química del medio RPMI 1640 (GIBCO/INVITROGEN®).	25
Cuadro 6. Concentración de Se, obtenida a partir de la cuantificación de selenio elemental en dos lotes de medio RPMI 1640 por ICP-OES.	59
Cuadro 7. Efecto del glutatión en los cisticercos durante 50 días de cultivo.	62