



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

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

*Taenia crassiceps*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ANDREA ALEJANDRA TOLEDO ROJAS

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** PROF. ABEL GUTIERREZ RAMOS  
**VOCAL:** PROF. EDDA SCIUTTO CONDE  
**SECRETARIO:** PROF. MAITE ASTIGARRAGA ZAVALA  
**1er SUPLENTE:** PROF. FERNANDO GARCIA TAMAYO  
**2do SUPLENTE:** PROF. CONSTANTINO III ROBERTO  
LOPEZ MACIAS

**EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO  
DE INMUNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMICAS, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

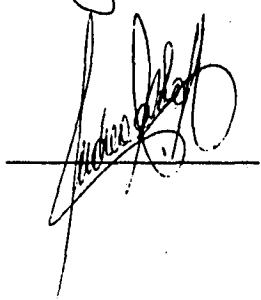
**DRA. EDDA SCIUTTO CONDE**



---

**SUSTENTANTE:**

**ANDREA ALEJANDRA TOLEDO ROJAS**



---

*Entonces no había ni gente, ni animales, ni árboles, ni piedras, ni nada. Todo era un erial desolado y sin límites. Encima de las llanuras el espacio yacía inmóvil; en tanto que, sobre el caos, descansaba la inmensidad del mar. Nada estaba junto ni ocupado. Lo de abajo no tenía semejanza con lo de arriba. Ninguna cosa se vela de pie. Sólo se sentía la tranquilidad sorda de las aguas, las cuales parecía que se despeñaban en el abismo. En el silencio de las tinieblas vivían los dioses que se dicen: Tepeu, Gucumatz y Huracán, cuyos nombres guardan los secretos de la creación, de la existencia y de la muerte; de la tierra y de los seres que la habitan.*

**POPOL VUH**  
*Antiguas leyendas del Qutche*

*Agradesco con mucho cariño a mis papás, GLORIA Y DANIEL por ser mis mejores amigos y por su ayuda a lo largo de toda mi vida. A mi mami, por ser tan buena y amorosa, porque de alguna forma u otra me encausó en el camino de la ciencia. A mi papi por ser una persona muy crítica, por enseñarme muchos de los valores que forman parte de mi personalidad y por ser tan amoroso (aunque no lo demuestre). A ambos, por haberme ayudado en la corrección de esta tesis, les dedico especialmente este trabajo.*

*A mi gran familia en México: Tía Sandra, Sandrita y Titin, ellos saben mejor que nadie como los quiero y aprecio.*

*También a mi gran familia en Chile, en especial a mis abuelitos: María y José, Corina y Segundo, a todos mis tios y primos, siempre los tengo presentes con mucho cariño y nostalgia*

*A Edda por ser una gran tutora, por saber difundir sus conocimientos, por haberme permitido formar parte de su equipo, por todo su entusiasmo y la fe que tuvo en este proyecto, en verdad un millón de gracias.*

*A mi querida amiga y compañera Carmen por haber hecho de este trabajo una gran diversión, por todos los momentos críticos que pasamos juntas, creo que después de esto pueden pasar muchas cosas pero siempre contare con su gran amistad y finalmente porque verdaderamente hacemos un gran equipo.*

*A todo el gran equipo de amigos y compañeros de laboratorio: Marisela, Gladis, Gaby, Karen, Gemma, Gonzo, y a los más recientes, Tere, Fernando y Manuel. A Meche en especial por que fue la primera persona con la que interactue en el laboratorio, por ser tan buena amiga y por ayudarme en los momentos que mas lo necesitaba. A todos muchísimas gracias por todo el apoyo, tanto académico como moral.*

*A todos mis amigos en especial a mis queridas amigas durante y después de la carrera: Irina, Alma, Erika, Aide, Blanquita y Vicki, por todos los momentos de estudio, sufrimiento y de mucha diversión que pasamos juntas.*

# INDICE

	Página
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	2
III. OBJETIVOS.	14
IV. MATERIAL Y METODOS.	15
<b>a) Obtención de células parasitarias a partir del cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>.</b>	15
a.1) Obtención de los cisticercos.	15
a.2) Obtención y cultivo <i>in vitro</i> de células de cisticercos.	16
a.3) Preparación del medio de cultivo	17
a.4) Condiciones experimentales evaluadas en cultivos celulares.	18
a.5) Parámetros cualitativos evaluados en cultivos celulares.	19
a.6) Cultivos <i>in vivo</i> de células de cisticercos y evaluación de la capacidad de crecimiento de las células <i>in vivo</i> .	19
a.7) Cinética de formación de parásitos a partir de células de cisticercos en ratones BALB/cAnN (susceptibles) y C57BL/6J (resistentes).	20
a.8) Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN.	21
<b>b) Preparación de la sonda c-myc de ratón.</b>	22
b.1) Obtención del plásmido.	22
b.2) Cuantificación de la concentración del plásmido pGEM2 con el gen c-myc.	22
b.3) Digestión del plásmido pGEM2 con el gen c-myc.	23
b.4) Electroforesis en gel de agarosa.	24
b.5) Extracción del DNA de agarosa con bajo peso molecular.	25
b.6) Extracción del DNA de los metacestodos de <i>T. crassiceps</i> variedad ORF e HYG.	27

b.7) Purificación del DNA.	28
b.8) Extracción y purificación del DNA de ratón BALB/cAnN.	28
b.9) Digestión del DNA de <i>T. crassiceps</i> ORF e HYG y de ratón BALB/cAnN.	29
b.10) Transferencia de DNA genómico de <i>T. crassiceps</i> variedad ORF e HYG y ratón BALB/cAnN (Southern, 1975).	31
<b>IV. RESULTADOS.</b>	<b>33</b>
<b>V DISCUSION.</b>	<b>40</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	<b>51</b>
<b>VII. APENDICE I: Cultivos celulares.</b>	<b>52</b>
<b>VIII. APENDICE II: Oncogen c-myc.</b>	<b>63</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>75</b>
<b>X. AGRADECIMIENTOS.</b>	<b>86</b>



## I. RESUMEN

**En** el presente trabajo de tesis se planearon y establecieron las condiciones experimentales para desarrollar cultivos primarios de células del cisticerco de *Taenia crassiceps*, así como para reproducirlas *in vitro* e *in vivo*. A través de dichos procedimientos se demostró que las células parasitarias pueden formar parásitos completos, capacidad de formación que a partir de células, señala la posibilidad de una forma alternativa de reproducción del parásito a través de células. La constatación de este proceso nos permite proponer un nuevo modelo experimental para el estudio de la cisticercosis. Por otro lado, se constataron también evidencias que sugieren la presencia del oncogen c-myc en el genoma del parásito, ofreciendo una herramienta potencial natural para modificarlo genéticamente con el fin de producir líneas celulares parasitarias, que contribuirán a un mayor conocimiento de la biología del cisticerco.

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

\* Títulos por litro  $\geq 1:80$

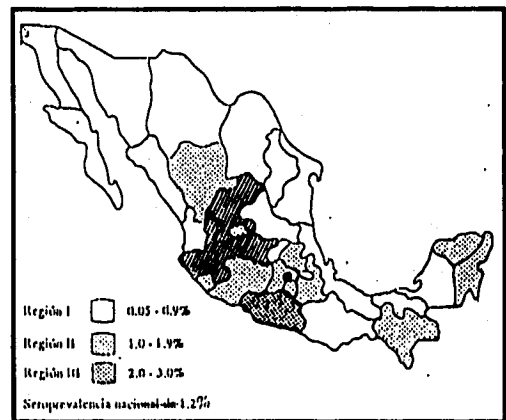


Figura 1. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Taenia solium* por entidad federativa en la población de 1 a 98 años. Tomado de Larralde, *et al*, 1992.

## II.-INTRODUCCION

La cisticercosis es una parasitosis frecuente en países en desarrollo, donde prevalecen condiciones inadecuadas de vivienda e higiene, fecalismo al aire libre y otras condiciones ambientales que favorecen la transmisión de dicha parasitosis (Gemmel, *et al.*, 1982). Las zonas más afectadas por este parásito se encuentran en Africa, algunas regiones de Asia y América Latina, siendo México y Brasil las zonas de principal incidencia en el continente americano (Bird, *et al.*, 1962; Gajdusek, 1978; Coker-Vann, *et al.*, 1981; Balasubramaniam, *et al.*, 1971). En México es un padecimiento frecuente, donde las zonas de mayor seroprevalencia se encuentran en las regiones centro occidental y en el sureste. Como puede observarse en la Figura 1, los porcentajes de seropositividad oscilan entre el 0.06 y 2.97 %. Estos resultados, obtenidos en base a la encuesta serológica realizada entre 1987 y 1988, indican que el 1.20 % de la población mexicana ha estado en contacto con este parásito, lo que es preocupante, sobre todo para aquellas zonas de mayor seroprevalencia.

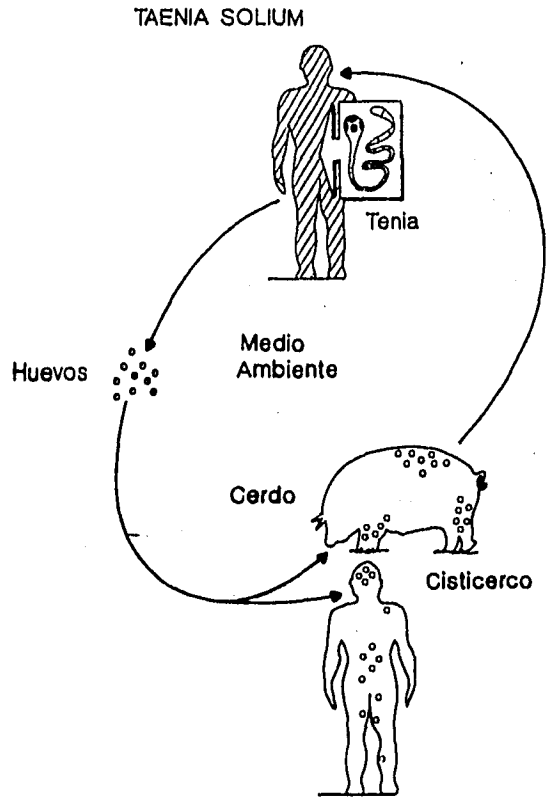


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

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

*T. solium* es un helminto de cuerpo aplanado y alargado cuya reproducción sexual se lleva a cabo en el hombre, el huésped definitivo. Su estadio larvario, el cisticerco, se aloja preferentemente en el tejido muscular y cerebral, tanto del hombre como del cerdo (Figura. 2).

La alta frecuencia de infecciones humanas ocasionadas por el metacéstodo de *T. solium* resultan probablemente a consecuencia de la ingestión de huevos de *T. solium* a través de:

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

El estadio larvario de este gusano se ha encontrado prácticamente en todos los órganos y tejidos del cuerpo humano; así se le ha encontrado en tejidos subcutáneos e intramusculares, en ojo y también en el cerebro, donde se puede desarrollar en los ventrículos del tejido cerebral o en cápsulas quísticas superficiales. Los síntomas que producen varían de acuerdo al número de parásitos y del tejido invadido. Por ejemplo, la presencia de la larva en crecimiento provoca una secuencia típica de reacciones celulares locales,

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

Estado y localidad	Frecuencia (%)	Año	Origen <sup>a</sup>
<i>Aguascalientes</i>			
<i>Aguascalientes</i>	0.52	1980	SSA
<i>Campeche</i>	Datos no facilitados		
<i>Chiuhutla</i>			
<i>Chiuhutla TII<sup>b</sup></i>	0.49	1980	SARH
<i>Chiuhutla</i>	3.32	1980	M
	1.63	1981	M
<i>Culima</i>			
<i>Culima, Villa Alvarez, Copanmatla, Cinnala</i>	2.4	1980	M
<i>Cuahuila</i>			
<i>Toncoán</i>	2.37	1981	M
<i>Durango Federal (Mexico City)</i>			
<i>Petroria</i>	0.13	1980	SSA
	0.16	1981	SSA
<i>Durango</i>			
<i>Durango</i>	2.21	1980	M
<i>Guanajuato</i>			
<i>Ocampo</i>	10.0	1981	M
<i>San Felipe</i>	3.0	1981	M
<i>Jalisco</i>			
<i>Guadalupe</i>	0.003	1980	SSA
<i>México (state)</i>			
<i>39 rastros</i>	0.22 (0.09-7.9)	1980	SSA
<i>Michoacán</i>			
<i>La Piedad</i>	10.0 <sup>c</sup>	1980	SARH
<i>Morelos</i>			
<i>Ocotepec</i>	0.37	1980	SSA
<i>Jajulla, Zacatepec, Tlaquililango, Puente de Ixtla</i>	1.9	1980	M
<i>Nuevo León</i>			
<i>Monterrey</i>	0.004	1980	SSA
	0.016	1981	SSA
<i>Querétaro</i>			
<i>Querétaro</i>	0.36	1980	SSA
	0.71	1981	SSA
<i>San Luis Potosí</i>			
<i>San Luis Potosí</i>	0.67	1980	SSA
	0.19	1981	SSA
<i>Sonora</i>			
<i>Hermosillo</i>	0.07	1980	SSA
<i>Tehuacan</i>			
<i>Villaherrera</i>	Cerdos no sacrificados en estos rastros		
<i>Tehuacan</i>			
<i>Cuicat Victoria</i>	0.37	1980	SSA
<i>Tlaxcala</i>			
<i>Tlaxcala</i>	1.0	1981	M
<i>Ilhuamante</i>	0.63	1980	M
<i>Apizaco</i>	3.3	1980	M
<i>Veracruz</i>			
<i>Jalapa</i>	0.11	1980	SSA
<i>Veracruz</i>	0.73	1980	SSA
<i>Tuxpan</i>	1.05	1980	SSA
<i>Yucatán</i>			
<i>Mérida</i>	0.04	1980	SSA
<i>Zacatecas</i>			
<i>Jerez</i>	0.75	1980	SSA
<i>Escuintla</i>	2.10	1980	SSA
<i>Zacatecas</i>	1.26	1980	SSA

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

<sup>b</sup> TII, rastros en donde se prepara la carne para exportación, SARH.

<sup>c</sup> Valor Estimado.

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

El tiempo entre la infección inicial y la aparición de los síntomas es también muy variable y puede ser de algunos meses o hasta de años (Aluja, A. *et al*, 1986).

El cerdo, hospedero intermediario de este parásito, desempeña un papel muy importante en la transmisión de la teniasis-cisticercosis por *Taenia solium*. La porcicultura rústica constituye un factor de suma importancia en la transmisión de la cisticercosis ya que la crianza de cerdos explotados en libertad, facilita que los animales tengan una mayor oportunidad de consumir heces de humano contaminadas. Por el contrario, en la porcicultura altamente tecnificada la posibilidad de infección es muy baja. En consecuencia, la inspección sanitaria es muy importante para evitar el consumo de carne de cerdo parasitada y controlar la transmisión. Por esta razón y de acuerdo al código sanitario, las canales afectadas por cisticercosis deben ser decomisadas. Al respecto numerosos estudios demuestran la elevada frecuencia de decomiso de canales de cerdo en México, lo que si bien es cierto, atenúa la transmisión implica también numerosas pérdidas económicas (Aluja, A *et al*, 1986) (Tabla I).

Dentro de los principales factores responsables del control ineficiente del consumo de cerdos criados rústicamente, figuran el consumo directo, sin previo análisis; la falta de rastros, que acentúa la matanza doméstica; la corrupción que frecuentemente se presenta en los mismos, la evasión premeditada de rastros y la poca accesibilidad a las formas de identificación de canales infectados, etc. Dada la importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en México, ésta ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos y patológicos, así como con el diagnóstico, tratamiento y prevención; sin embargo, la incidencia de los factores señalados arriba dificulta un control más efectivo.

Como estrategias para avanzar en el estudio de la relación huésped-parásito en la cisticercosis en una forma sistemática y controlada, nuestro grupo de investigación (Laboratorio Dra. Edda Sciutto, Instituto de Investigaciones Biomédicas) comenzó a estudiar un modelo experimental de cisticercosis murina, el que además de conocer la cisticercosis del ratón permitiera extrapolar las observaciones realizadas en el modelo murino a la cisticercosis por *T. solium*, y acceder más fácilmente al estudio de ésta compleja relación.

*Taenia crassiceps* (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un gusano platelminto de la clase céstoda que se encuentra comunmente en el intestino de los zorros rojos de Europa y Norteamérica. Los zorros rojos son los hospederos principales, pero también se le ha encontrado en otros cánidos como lobos, coyotes y perros. El gusano mide aproximadamente 70 a 140 mm de largo y 2.4 mm de ancho; presenta un escólex constituido por 4 ventosas y un rostelo o





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

corona formado por 2 anillos que tienen de 32 a 36 ganchos rostelares.

El estado larvario de *T. crassiceps* es el *Cysticercus longicollis* sus hospederos principales lo constituyen pequeños roedores de Europa y Norteamérica, los cuales adquieren la infección al ingerir los huevos de cisticercos presentes en las heces de cánidos infectados. Dentro del roedor los huevos se transforman en cisticercos y comienzan un proceso de reproducción asexual, en el cual el cisticercos ya maduro comienza a gemar, iniciándose así un ciclo de gemación que tendrá como consecuencia la liberación de nuevos cisticercos (Figura 3). La forma adulta de *T. crassiceps* se desarrollará cuando un roedor con cisticercos sea ingerido por un predador cánido. La *Tenia* alcanza la edad madura después de 6 semanas de haber ingresado los huevos en el intestino de zorros y perros (Freeman, 1962), cerrándose de esta forma el ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

El desarrollo general del metacéstodo en un roedor, después de haber ingerido este último los huevos, es como a continuación se describe: la capa estriada del huevo es removida gracias a la acción de los jugos gástricos del intestino, permitiendo la liberación del pequeño embrión u oncosfera de aproximadamente 0.02 mm de diámetro, el cual posee 3 pares de ganchos (de aproximadamente 6 a 8  $\mu$  de longitud). El embrión migra al sitio en donde se va a desarrollar, generalmente en las cavidades pleural y subcutánea, y ocasionalmente en la cavidad peritoneal. Una vez instalado el embrión se transforma en un cisticercos, el cual tiene un escólex incipiente en uno de sus extremos. Después de esto, el cisticercos comienza a gemar por el lado opuesto al escólex (Freeman, 1962). La morfología de las etapas de desarrollo del

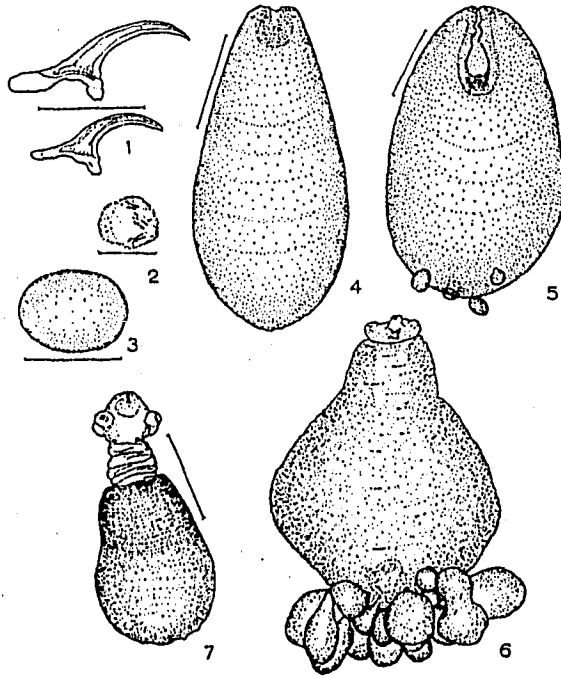


Figura 4. Etapas del desarrollo del metacéstodo de *Taenia crassiceps*. (valor de la escala entre paréntesis): 1. Ganchos rostellares (0.1 mm); 2. Embrión (0.02 mm); 3. Vesícula joven (0.5 mm); 4. Cisticerco joven (0.5 mm); 5. Cisticerco con gemas (0.5 mm); 6. Cisticerco totalmente gemante (unidad gemante).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

cisticercos se muestra en la Figura 4.

En relación a su desarrollo, la velocidad de multiplicación del parásito varía dependiendo del sitio donde se desarrolla la infección. El crecimiento es mayor en la cavidad peritoneal (Freeman, 1962), razón por la cual la inoculación intraperitoneal en ratones ha sido la seleccionada por muchos investigadores con fines experimentales; así mismo su capacidad de gemación exógena, en su estadio larvario, permite mantenerlo fácilmente en ratones de laboratorio por medio de pases intraperitoneales sucesivos (Freeman, 1962).

Existen varios tipos de "cepas" o variedades de cisticercos de *T. crassiceps*: ORF es la cepa más antigua, aislada en 1952 (Freeman, 1962) a partir de un zorro; ORF es una variedad anormal debido a que raramente produce escólex, característica que se ha acentuado conforme la cepa se ha transferido de ratón en ratón (Dorais y Esch, 1969). En 1972, Smith, Esch y Kuhn registraron que la cepa ORF presenta aberraciones cromosómicas y la caracterizaron como un mutante aneuploide. Para fines prácticos, la cepa ORF es la más utilizada debido a su capacidad de desarrollarse más rápidamente en la cavidad peritoneal de ratones.

Otras cepas de *T. crassiceps* son:

-KBS, aislada en 1965 por Dorais y Esch (1969), la cual presenta anormalidades frecuentes en el escólex.

-TOI, obtenida por Freeman (1961) a partir de una infección natural de marmota (*Marmota monax*).

-ERS, obtenida por una infección en ratas a partir de parásitos de ratón.

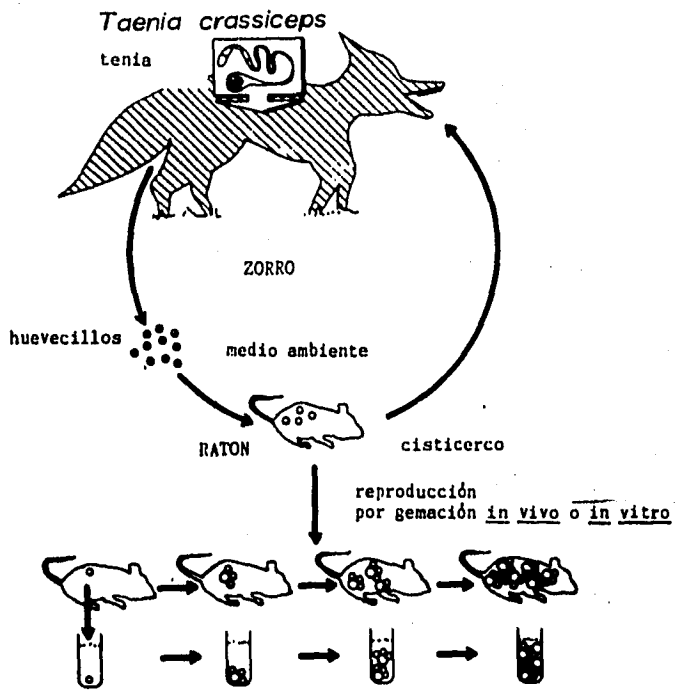


Figura 5. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

-HYG, aislada en 1974 por infección de un ratón con huevos obtenidos de una zorra.

-DEB, aislada de ojo humano en 1972 (Freeman, *et al* 1973).

En la Figura 5 se describe el ciclo de vida de este céstodo.

Un aspecto muy importante es la antigenicidad cruzada que existe entre el metacéstodo de *T. solium* y *T. crassiceps* (Larralde *et al*, 1989). Esta compartición de antígenos ha permitido utilizar los antígenos de *T. crassiceps* con fines diagnósticos. Así, los antígenos de *T. solium* se pueden reemplazar por los de *T. crassiceps* en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana (Larralde *et al*, 1989; Ramos-Kuri *et al*, 1992); también los antígenos de *T. crassiceps* han demostrado inducir altos niveles de protección, al igual que los de *T. solium*, en contra de la cisticercosis murina y ser de utilidad en la inmunoprevención de la cisticercosis porcina (Manoutcharian, *et al*, 1995) (Tabla II).

La cisticercosis en el ratón es una parasitosis de tipo crónico, no mata a su huésped, aún cuando puede continuar multiplicándose hasta que la carga parasitaria supera hasta el peso del propio huésped. A consecuencia de las infecciones crónicas, hay presencia de antígenos circulantes, estimulación antigénica y formación de complejos inmunes. Es característico en este tipo de parasitosis niveles elevados de inmunoglobulinas, específicamente IgE (Roitt, *et al.*, 1991).

Varias clases de células efectoras como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, ayudan a la defensa del huésped frente al parásito y actúan tratando de controlar la multiplicación y diseminación de los mismos. Los eosinófilos

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

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

\*Diferencias protectoras significativas con los controles.

†Promedio ± error estandar de los cisticercos recobrados. El número de animales de cada grupo varía de 5 a 15. KETc 1, 7, 11 y 12 son antígenos recombinantes de *T. crassiceps*.

son menos fagocíticos que los neutrófilos, pero al igual que éstos, pueden destruir a los parásitos por mecanismos oxígeno dependientes y oxígeno independientes. Se degranulan en respuesta a la perturbación de su membrana, y al unirse con la superficie de los gusanos, especialmente cuando éstos se hallan recubiertos de IgE, se provoca la deposición del contenido de los gránulos en la superficie de los gusanos, con su consiguiente destrucción. Los antígenos así liberados provocan la desgranulación local (IgE-dependiente) de los mastocitos, con la liberación de mediadores que atraen selectivamente a los eosinófilos hacia ese punto, e incrementan su actividad (Roitt, *et al*, 1991).

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

Otro factor importante involucrado en la regulación de la respuesta inmune es el sistema reproductor. Al respecto, se ha demostrado que existe un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas-timo que, junto con el sistema inmune, se puede autoregular (Grossman, 1985). Generalmente se acepta que los machos son más susceptibles que las hembras para las infecciones parasitarias, y la susceptibilidad se ve aumentada en varias parasitosis durante el embarazo (Alexander, y Stimson, 1988), aunque en la parasitosis murina, producida por el metacéstodo de *T. crassiceps*, se observó que las hembras son más susceptibles



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

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

Los números en paréntesis representan los números de ratones probados.

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

que los machos ( Sciutto, *et al*, 1991) (Tabla III). Además de la respuesta inmunitaria dirigida contra el parásito, se observa inmunosupresión y efectos inmunopatológicos, fenómenos que ocurren simultáneamente. Tanto el parásito, como el hospedero, han sufrido procesos de coevolución que los han llevado a una convivencia muy específica, aún cuando dentro de una misma especie existen también variaciones individuales de resistencia a la parasitosis.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que existen diferencias de susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina genéticamente determinada. En este sentido resultados obtenidos recientemente nos señalan que cepas que tienen un fondo genético B10 son resistentes a cisticercosis (Tabla IV), mientras que cepas que presentan un fondo BALB presentan diferentes grados de susceptibilidad (Tabla V). Así, entre las cepas BALB, la cepa BALB/cAnN es la más susceptible; la cepa BALB/ByJ resultó de susceptibilidad intermedia, e igualmente susceptible que las cepas BALB/K y BALB/B; por su parte la cepa BALB/cJ resultó ser la de mayor resistencia; presentando, entre otras diferencias genéticas reportadas, los genes codificadores de la proteína no clásica de histocompatibilidad Qa-2 funcionalmente activos. Como uno de los genes de resistencia probable, se evaluó su capacidad funcional para transferir este fenotipo a través de transgénesis y se observó que la transferencia del gene confería efectivamente resistencia a la cisticercosis murina, constituyéndose al menos en uno de los genes que determinan la resistencia. Queda aún por evaluar la funcionalidad, a través de la cual se determina la resistencia.

Considerando todo lo anteriormente descrito, nos hemos propuesto

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

Cepa	H-2								Carga Parasitaria Promedio ± ES	
	I								Hembra	Macho
	K	Aα	Aβ	Eα	Eβ	S	D.L	Qa-2		
BALB/cAnN	d	d	d	d	d	d	b	-	132.96 ± 6.88 <sup>a</sup>	27.49 ± 1.95 <sup>b</sup>
C57BL/6J b	b	b	b	b	-	b	b	+	18.60 ± 5.38 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.14 <sup>d</sup>
C57BL/10J (B10)b	b	b	b	b	-	b	b	+	23.00 ± 5.52 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>d</sup>
B10.D2	d	d	d	d	d	d	d	+	16.04 ± 3.47 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>d</sup>
B10.D2 (R103)	d	d	d	d	d	d	b	+	18.38 ± 2.61 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.46 <sup>d</sup>
B10.D2 (R107)	b	b	b	b	-	b	d	+	21.68 ± 4.42 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.36 <sup>d</sup>
B10.A (2R)	k	k	k	k	k	k	b	+	18.05 ± 4.70 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>d</sup>

Promedio ± SE de cisticercos recuperados 30 días después de retarlos con 10 cisticercos por ratón.

<sup>a,b,c,d</sup> Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre ellos, mientras que los datos con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ).

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

Cepa	Haplotipo		Carga parasitaria Promedio ± ES	
	H-2	Qa-2	Hembra	Macho
BALB/cAnN	d	-	122.1 ± 8.07 <sup>a</sup>	30.29 ± 2.15 <sup>b</sup>
BALB/cByJ	d	-	31.1 ± 4.80 <sup>b</sup>	4.46 ± 1.84 <sup>c</sup>
BALB/cJ	d	+	10.2 ± 2.98 <sup>d</sup>	0.39 ± 0.16 <sup>c</sup>
BALB/B	b	+	23.7 ± 3.76 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.27 <sup>c</sup>
BALB/K	k	-	27.7 ± 5.49 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>

Promedio ± SE de cisticercos recuperados 30 días después de retarlos con 10 cisticercos por ratón.

<sup>a,b,c,d</sup> Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre ellos, mientras que los datos con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ).

generar un modelo experimental, potencialmente sensible a moléculas y células inmunes, con el cual avanzar en la identificación de mecanismos inmunológicos asociados a condiciones de resistencia genética, determinadas o inducidas por vacunación. Para ello consideramos la producción de células obtenidas a partir de cisticercos de *T. crassiceps*. El disponer de células parasitarias, en principio, ofrecería un blanco más susceptible al ataque de diferentes mecanismos inmunológicos del huésped, y probablemente resulte más accesible a la identificación de componentes inmunológicos involucrados en el control del crecimiento parasitario.

Por otra parte, el contar con células parasitarias permitiría disponer de una versión simplificada del parásito, obtener una información más amplia y profunda sobre su biología celular y molecular, y la fisiología de su desarrollo. La manipulación de células provenientes de parásitos presenta un gran potencial para ahondar en el conocimiento de la estructura y la fisiología del parásito, y los esfuerzos por establecer cultivos celulares a partir de células parasitarias han comenzado a resultar exitosos.

Para el desarrollo de cultivos primarios de cisticercos, se comenzará considerando la experiencia obtenida en la producción de líneas celulares de invertebrados (Hink, 1979) y parásitos (Bayne *et al*, 1994), las cuales se modificarán a fin de encontrar las condiciones apropiadas para desarrollar cultivos celulares provenientes de cisticercos de *T. crassiceps*.

En el intento de desarrollar líneas celulares parasitarias se planea en esta tesis evaluar la presencia de genes de interés a modificar con el propósito de incrementar la proliferación celular. En este sentido, se ha visto que existen

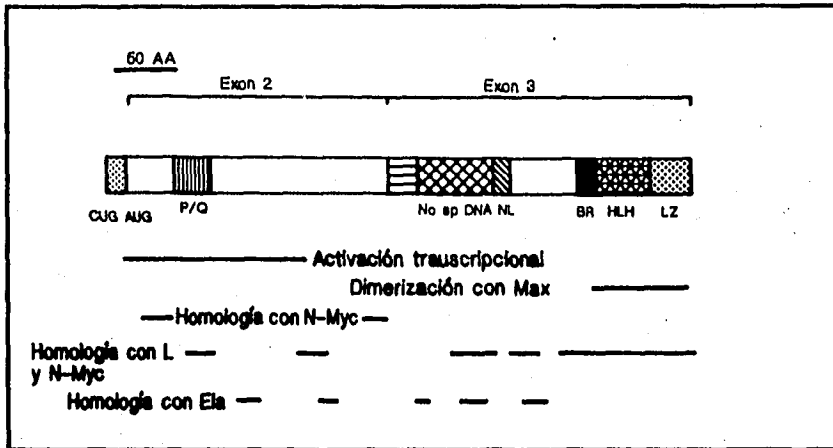


Figura 6. Esquema del polipéptido c-Myc y sus dominios funcionales. CUG, sitio de iniciación dentro del exón; AUG, sitio de iniciación definido para el exón 2; P/Q, región rica en prolina/glutamina; No sp DNA, región de unión no específica al DNA; NL, localización de la señal nuclear; BR, región básica;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

genes específicos (oncogenes), involucrados en fenómenos de neoplasia, tumores y proliferación celular (Watson, *et al*, 1987). Genes celulares normales que tienen el potencial de convertirse en oncogenes, por lo cual son llamados proto-oncogenes u oncogenes celulares. Entre ellos figuran el gen c-myc (Figura. 6), el cual se ha reportado que interviene en procesos de proliferación y diferenciación celular. Algunas de las formas de activación del oncogen myc, para dar lugar a estados malignos, incluyen a translocaciones cromosomales no azarosas como en la génesis de leucemias de células T, y leucemia linfocítica de células B; amplificación de genes (expresión elevada del gen c-myc) que se observa en la progresión de un gran número de tumores humanos generalmente asociados a fenotipos altamente malignos, como en células gástricas adenocarcinomas, células pequeñas de carcinoma de pulmón, glioblastoma, carcinoma de colon, y leucemia de células plasmáticas, entre otras; y la activación del gen c-myc por inserción proviral como en la linfomagénesis bursal, en donde el locus c-myc se encuentra integrado en el mismo sitio que el virus de la leucosis en aves (Marcu *et al.*, 1992). Además, en la mayoría de los diferentes tipos celulares, c-myc se expresa omnipresentemente (Kelly, 1986). El gen c-myc se agrupa dentro de los oncogenes nucleares, por codificar proteínas nucleares que se encuentran involucradas, por un lado, como transactivadores de la transcripción y, por otro lado, como agentes de immortalización celular (Weinberg, 1985). Además, se le ha propuesto un rol potencial en la transcripción y postranscripción de otros genes celulares y en la replicación del DNA (Marcu, *et al*, 1992; Watson J.D *et al*, 1987).

Considerando éstos antecedentes, en el presente trabajo se ha contemplado modificar el parásito con el uso de c-myc, como alternativa para favorecer la producción de líneas celulares parasitarias. Con este objetivo, en una primera etapa, se decidió valorar su presencia en el cisticerco de *T. crassiceps*; para acceder, en un siguiente paso, a la modificación génica del parásito.

### **III. OBJETIVOS**

Obtener a partir de cisticercos de *Taenia crassiceps* células parasitarias aisladas.

Evaluar la capacidad de crecimiento *in vitro* de las células parasitarias, en diferentes tiempos y circunstancias de cultivo.

Evaluar la capacidad de crecimiento *in vivo* de las células parasitarias, en diferentes tiempos y en hospederos genética y sexualmente diferentes.

Identificar secuencias homólogas al gen *c-myc* en el genoma del cisticerco de *Taenia crassiceps* a fin de considerar este gen como herramienta a utilizar para modificar genéticamente a las células parasitarias.



## IV. MATERIALES Y METODOS

### a. Obtención de las células parasitarias.

Las células parasitarias se obtuvieron a partir de cisticercos de *Taenia crassiceps*, variedad ORF, obtenidos a partir de la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa BALB/cAnN, de 4 a 6 semanas de edad.

#### a.1 Obtención de los cisticercos.

La obtención de los parásitos se realizó mediante los siguientes procedimientos:

a) Se sacrificó a los ratones por dislocación cervical aproximadamente a los 60 días posteriores a la infección (la infección se llevó a cabo con cisticercos que presentaban un diámetro aproximado de 1 a 1.5 mm y que no presentaran gemaciones). Los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos suspendidos en aprox. 0.5ml de PBS (0.15M NaCl, 0.01M de buffer de fosfatos de sodio, pH 7.2).

b) Se sumergieron a los ratones en una solución de Benzal por 10 minutos y posteriormente en una solución de alcohol al 70 %.

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

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

Después de haber obtenido los parásitos ( entre 450 y 500 cisticercos con un tamaño aproximado de 5 mm de longitud y 2 mm por su lado más ancho) se les dejó por una hora en una solución de agua/antibiótico (Penicilina 10.000 UI/ml / Estreptomicina 10.000 µg/ml) al 10 %. Este tratamiento se utilizó con el fin de lisar posibles células provenientes del ratón, que hubieran quedado adheridas a los parásitos.

Se lavaron los parásitos para eliminar el exceso de agua/antibiótico y se colectaron en 50 ml de RPMI 1640 complementado estéril.

Los parásitos fueron cortados con la ayuda de un bisturí, dejándolos en pequeños pedacitos. Posteriormente y con cuidado se pasaron a frascos de cultivo de 50 ml (FALCON); se les adicionó 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 complementado, el cual se encontraba enriquecido con diferentes nutrientes y mitógenos, incubándose a distintas temperatura a fin de identificar las mejores condiciones de crecimiento, mismos que nos permitieran realizar los cultivos en condiciones óptimas.

Toda la metodología anteriormente descrita se realizó bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar. Tanto el material quirúrgico, como las soluciones empleadas, se encontraban estériles.

### a.3 Preparación del Medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado fue el RPMI 1640 el cual se prepara y esteriliza por filtración 24 horas antes de ser utilizado.

Cada 87 ml de medio se complementaron con:

-Suero fetal bovino (Hy clone)	10 ml.
-Piruvato	1 ml.
-Penicilina/Estreptomicina	1 ml.
-Aminoácidos no esenciales	1 ml.
-L-glutamina (220 mM)	100 µl.
-β-mercaptoetanol (50mM)	3.25 µl.
-HEPES	2.5 µl.
-NaHCO <sub>3</sub>	2.0 g/l.

El medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) es un medio que fue desarrollado para el cultivo de linfocitos, aunque existen reportes en los cuales se ha utilizado para la incubación de cisticercos de *Taenia solium* (Laclette, *et al.*, 1981 y Bruckner, 1979).

#### **a.4 Condiciones experimentales evaluadas en cultivos celulares:**

##### **Temperaturas utilizadas:**

27°C.

37°C.

##### **Mitógenos:**

Concanavalina A (Con A) (1, 10, 100 µg/ml).

Acetato de Forbol Miristato (PMA) (10nM)-Ionóforo(5mM).

##### **Nutrientes adicionales al medio RPMI-1640:**

-Gonadotropina obtenida a partir de suero hembra preñada,

Folligon 1%.

-Gonadotropina obtenida a partir de suero hembra preñada,

Folligon 10%.

-Líquido peritoneal de ratón normal 10%.

-Líquido peritoneal de ratón parasitado 10%

-Suero ratona preñada 10%.

-Suero ratona normal (no preñada) 10%.

-Gonadotropina (suero hembra preñada Folligon)10%-

PMA-Ionóforo de calcio.

-Estradiol 1µg/ml

### **Tiempos de cultivo *in vitro*:**

1, 3, 5, 7, 9, 11 y 15 días.

#### **a.5 Parametros cualitativos evaluados en cultivos celulares.**

Con el fin de comparar el efecto de diferentes tratamientos en el cultivo, definimos un parámetro cualitativo: la presencia y la frecuencia de aparición de cúmulos celulares, que nos permitieran calificar las condiciones del cultivo. La alta frecuencia de cúmulos se definió con tres cruces ( +++ ), con (++) la mediana frecuencia de cúmulos celulares en el medio de cultivo y alrededor de los cisticercos cortados, la muy escasa presencia se calificó con una cruz (+), y con (N.E.) los parámetros no evaluados.

#### **a.6 Cultivos *in vivo* de células de cisticerco y evaluación de la capacidad de crecimiento de las células *in vivo*.**

A los cultivos de parásitos después de un tiempo de incubación de 7 días se les adicionó Tripsina-EDTA 1x (Gibco) y se les sometió a una agitación suave por 15 minutos; se eliminó todo resto de tripsina por medio de una centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. A continuación se lavó y resuspendió el botón 3 veces con medio RPMI estéril, procurando tener cuidado de que en el paquete celular no hubiera pequeños parásitos o restos de ellos. Una vez realizado este paso, se procedió a inocular  $4 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^6$

células en la cavidad peritoneal de ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J, los cuales se han descrito como susceptibles y resistentes a la parasitosis por *T. crassiceps*. El volumen final utilizado para inoculación fué de 0.5 ml. Por último treinta días más tarde se sacrificaron y se lavaron las cavidades peritoneales de los referidos ratones.

**a.7 Cinética de formación de parásitos a partir de células de cisticercos en ratones BALB/cAnN (susceptibles) y C57BL/6J (resistentes).**

Para observar la formación de parásitos a partir de las células de cisticercos, se realizó una cinética de crecimiento de células *in vivo* en ratones previamente definidos como susceptibles y resistentes a la infección parasitaria experimental, utilizando las células de cisticercos cultivadas durante 7 días *in vitro*.

Se utilizaron 6 lotes de animales, constituidos por 5 ratones-cada uno. En ratones BALB/cAnN se inocularon 400.000 células resuspendidas en 0.5 ml de medio RPMI, complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon) al 10 % por cada ratón. Se sacrificaron los animales a los 1, 3, 5, 7, 15 y 30 días después de la inyección respectiva de células y se procedió al conteo de la carga parasitaria. En ratones hembras C57BL/6J se utilizaron 3 lotes de animales, constituidos por 5 ratones cada uno; al igual que los ratones susceptibles, se inocularon con 400.000 células resuspendidas en 0.5 ml de medio RPMI complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon 10%).

Se sacrificaron los animales a los 10, 15 y 30 días respectivamente y se procedió al conteo de la carga parasitaria.

Todos los animales fueron sangrados previamente a blanco para colectar el suero y se tomaron muestras del contenido peritoneal, realizando extendidos en portaobjetos para observar los tipos de células presentes.

#### **a.8 Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN.**

Con el fin de descartar la posibilidad de que en las células utilizadas para la inyección, existieran fragmentos de parásitos (Bunge, 1991), procedimos a inyectar a un lote de 5 hembras BALB/cAnN, con células clonadas obtenidas a partir de un cultivo de células de 7 días en medio RPMI, complementado y adicionado con gonadotropina (Folligon) al 10 %, por medio de una dilución limitante. Esta se realizó colocando en cada pozo (de una placa de 96 pozos) la dilución adecuada para incluir 6 células parasitarias, estas se dejaron cultivando por tres días en el medio anteriormente mencionado. De 60 pozos en solo 3 de ellos se observó proliferación los cuales se colectaron y se inocularon en la cavidad peritoneal de los referidos ratones. Cada uno de los animales fue inoculado con un promedio de 5 a 10 células. Finalmente los animales fueron sacrificados a los 18 y 24 días posteriores a la inoculación y se colectó el contenido peritoneal.

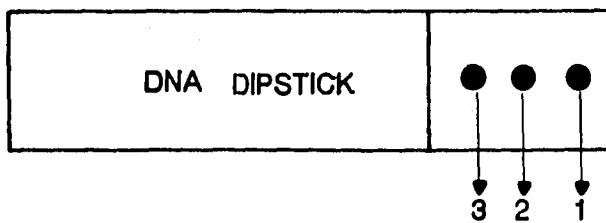


Figura 7. En la tira se coloca 1  $\mu$ l tanto de la muestra sin diluir como de cada dilución y se deja secar entre 5 y 10 minutos.

Nº 1.- Muestra no diluida.

Nº 2.- Muestra diluida (1/10).

Nº 3.- Muestra más diluida (1/100).



## **b. Preparación de la sonda c-myc de ratón**

### **b.1 Obtención del plásmido.**

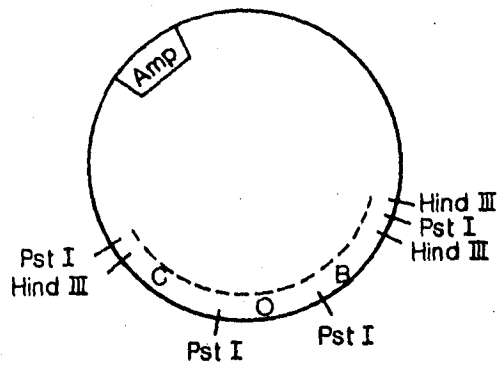
El plásmido pGEM 2 utilizado fue facilitado amablemente por el M. en C. Marco Bonilla.

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

Para la cuantificación de la concentración se utilizó el Kit DNA Dipstick (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido. El Kit determina la concentración de DNA mono o dicatenario, RNA u oligonucleótidos (de 6 bases o más) a concentraciones muy bajas (0.1 ng/μl). Los resultados visibles se producen a los 10 o 15 minutos y no se necesita fotografía pues el color de las tiras es permanente. El Kit consiste en realizar diferentes diluciones (las convencionales son 1/10 y 1/100) de la muestra de DNA, del cual se quiere medir las concentraciones. En las tiras se colocaron las diferentes soluciones y la muestra sin diluir (Figura. 7).

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

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



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

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

- d) Se pasó a la cubeta 3 por 2 minutos.
- e) Se lavó en la cubeta 1 por 20 segundos.
- f) Se dejó secar.
- g) Se comparó la intensidad de la muestra con el estandar del Kit.

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

Considerando lo descrito en la introducción y en el apéndice 2 se decidió utilizar como sonda la región del exón 2, la cual puede obtenerse por digestión con la enzima Pst I (10 U), permitiéndonos obtener un fragmento de 500 pares de bases (pb) (Figura. 8).

Para la digestión se utilizó el siguiente protocolo:

Agua destilada/ <u>desionizada</u> /estéril	31.5 µl
Sonda c-myc ( 1µg)	12.5 µl
Buffer (10 X)	5.0 µl
Enzima (PST 1)	1.0 µl ( 10 U/ µg)
	-----
	50.0 µl

Se incubó a 37°C durante 4 horas.

#### **b.4 Electroforesis en gel de agarosa:**

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

#### **Soluciones:**

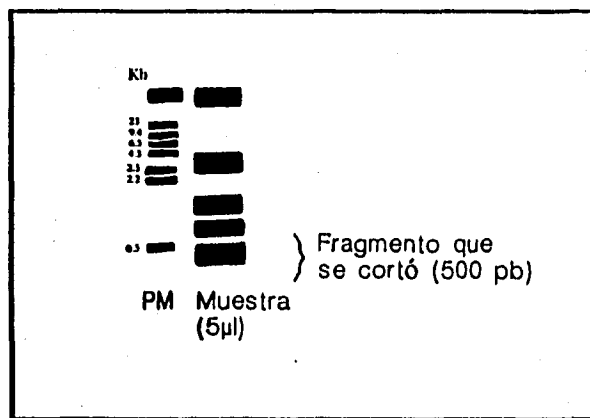
##### **TBE (Tris-Borato-EDTA)**

Trizina-base	0.4 M (Tris [hidroximetil] aninometano hidrocliclorídrico).
Acido Bórico	0.4 M.
EDTA 0.5 M, pH 8.0	10mM(Acidoetilendiamino-tetracético).

Aforar a 1 litro con agua bidestilada/desionizada/estéril.

#### **Procedimiento:**

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



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

## **b.5 Extracción de DNA de agarosa con bajo peso molecular :**

### **Soluciones:**

#### **TE**

Tris-HCL 1 M, pH 8.0

EDTA 0.5 M, pH 8.0

Solución A: Fenol, cloroformo y alcohol isométrico en una relación 5:4:1.

### **Procedimiento:**

- Se cortó el fragmento de 500 pb del gel y se colocó en un tubo eppendorf (Figura. 9).
- Se disolvió el gel (baño maría a 65°C).
- Se estimó el volumen y se agregó un volumen igual de fenol (equilibrado con 0.2 M de acetato de sodio pH 5.4.).
- Se agitó en el vortex y se centrifugó a 14,000 r.p.m., por 5 minutos.
- Se quitó el sobrenadante y se guardo.
- Se agregó TE (volumen a volumen).
- Se agitó en el vortex y se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 5 minutos.
- Se quitó el sobrenadante.
- Se juntaron los sobrenadantes.
- Se hicieron dos extracciones más con fenol.
- Se agregó la solución A en una relación volumen a volumen al

sobrenadante.

- Se agitó en el vortex y se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante.
- Se adicionó NaCl ( que quede 0.1 M con el DNA), y 2.5 x de volumen de etanol absoluto.
- Se deja a -70°C por una hora.
- Se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C.
- Se desechó el etanol absoluto.
- Se lavó el botón con etanol al 70 %, y se dejó secar.
- Se resuspendió en 10 a 20 ml de TE.
- Por último se cuantificó la concentración de la sonda utilizando el Kit DNA Dipstick, (Invitrogen).

**b.6 Extracción del DNA de los metacéstodos de *Taenia crassiceps*, variedad ORF e HYG:**

**Soluciones:**

SSC 20 x pH 7.6

Cloruro de sodio (NaCl) 3 M.

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

Se aforó a un litro.

Las soluciones y el material de cirugía utilizado fueron previamente esterilizados.

**Procedimiento:**

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

Para la obtención de los cisticercos se realizó el siguiente procedimiento:

- Se sumergió al ratón en benzal, se extrajeron los parásitos de la cavidad peritoneal con SSC 1x, y se lavaron varias veces para eliminar al máximo las proteínas murinas adheridas a su superficie. Posteriormente, se lavaron nuevamente, pero ahora con agua bidestilada/desionizada estéril; Se eliminó el agua y se colocó un volumen de 1.5 ml de cisticercos por cada tubo eppendorf.



### **b.7 Purificación del DNA.**

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

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

### **b.8 Extracción y purificación del DNA de Ratón BALB/cAnN.**

El DNA fue proporcionado amablemente por la M. en C. Gladis Fragoso. La concentración del DNA fue de 1.5 µg/µl.

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

El DNA purificado de *T. crassiceps* y de ratón BALB/cAnN fue digerido con las enzimas Eco RI, Pst I y Hind III respectivamente, con los protocolos siguientes:

DNA Ratón BALB/cAnN	13.3 $\mu$ l
Agua bidestilada/desionizada/estéril	9.7 $\mu$ l
Buffer (10 x)	3.0 $\mu$ l
Enzima	4.0 $\mu$ l
	-----
	30.0 $\mu$ l

Se incubó a 37°C durante 1 horas.

DNA <i>T. crassiceps</i> variedad ORF	78.0 $\mu$ l
Agua bidestilada/desionizada/estéril	6.0 $\mu$ l
Buffer (10 x)	10.0 $\mu$ l
Enzima	6.0 $\mu$ l
	-----
	100 $\mu$ l

Se incubó a 37°C durante 4 horas

DNA <i>T. crassiceps</i> variedad HYG	60.0 µl
Agua bidestilada/desionizada/estéril	9.0 µl
Buffer (10 x)	9.0 µl
Enzima	6.0 µl
	-----
	84.0 µl

Se incubó a 37°C durante 4 horas.

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

**Soluciones:**

Buffer alkali 0.5 M NaOH/ 1.5 M NaCl

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

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

**Procedimiento:**

Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con TBE. El gel se desnaturalizó después con el buffer alkali durante una hora a temperatura ambiente y con el buffer neutral durante otra hora. Después, el DNA se transfirió por capilaridad del gel al filtro de nitrocelulosa.(Southern, 1975); por último la transferencia se dejó por 20 horas y después se fijó el DNA a la nitrocelulosa por irradiación con luz ultravioleta.

Para marcar la sonda se usó el Kit "Random primed DNA labeling" (Boehringer Mannheim Biochemica), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El Kit se basa en la hibridización de una mezcla de todos los hexanucleótidos posibles del DNA que será marcado. La hebra complementaria es sintetizada desde el 3'OH terminal del primer hexanucleótido fortuito utilizando la enzima Klenow. Los deoxinucleótidos trifosfatos modificados ([<sup>32</sup>P]-, [<sup>35</sup>S]-, [<sup>3</sup>H]-, [<sup>125</sup>I]- o marcados con biotina) presentes en la reacción son incorporados en la nueva hebra complementaria sintetizada. La longitud de los fragmentos del DNA que es marcado, no influye en la reacción. La muestra

de DNA sirve como un molde para la síntesis del DNA marcado, y no se degrada durante la reacción, lo cual es posible por este método al marcar con una cantidad mínima de DNA (10 ng).

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



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

## IV. RESULTADOS

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

Con el fin de obtener células parasitarias se evaluaron diferentes procedimientos. Los primeros tratamientos no incluyeron tripsina y a consecuencia de esto, tal como se observa en la Figura 10, las células no alcanzaron a separarse de los fragmentos de parásitos, razón por la cuál se consideró un tratamiento adicional con tripsina.

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

Como se sabe, la Concanavalina A (Con A) es una de las tres lectinas más frecuentemente utilizadas, particularmente porque presentan tres propiedades fundamentales: a) unión específica a azúcares, b) aglutinación de células y c) estimulación de linfocitos. Por su parte, las lectinas tienen la propiedad de activar a un gran número de clonas de linfocitos T y B, sin importar la especificidad de unión al antígeno, por lo cual también son llamados activadores policlonales (Klein, 1990). Existen reportes en los cuales se describe que existe una reactividad entre la Con A y los antígenos parasitarios del cisticerco ( Vidal Tamayo, 1990 ). Se utilizó PMA-Ionóforo de calcio, ya

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

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

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

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



que se ha descrito que cuando se utilizan simultáneamente se activan linfocitos T, debido al aumento de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC). Por lo anterior decidimos utilizar la Con A y el PMA-Ionóforo de calcio a diferentes concentraciones, con el propósito de observar si éstos favorecían los cultivos de células parasitarias. Al respecto encontramos que la Con A y el PMA-Ionóforo de calcio inducían una mediana frecuencia de cúmulos celulares a una concentración de 1µg/ml para la Con A y 10nM/5mM para el PMA-Ionóforo de calcio a 27°C, aunque éstos no resultaron ser los factores que indujeron la mayor proliferación celular.

Considerando que los cisticercos se desarrollan óptimamente en la cavidad peritoneal de ratones, procedimos a utilizar líquido peritoneal de ratones normales y parasitados, con la esperanza de que existieran factores que ayudaran al desarrollo y mantención de las células parasitarias. En ambos casos se encontró escasa presencia de cúmulos.

Por otra parte, se ha reportado que en las infecciones causadas por *T. crassiceps* las hembras son más susceptibles que los machos (Sciutto, *et al.*, 1991). Por este motivo, y considerando que las hormonas sexuales se encuentran involucradas en el control de la infección parasitaria, procedimos a la utilización de suero de ratonas normales (no preñadas) y suero de ratonas preñadas. El suero de hembra normal indujo una escasa presencia de cúmulos, mientras que en el suero de hembra preñada, la presencia de cúmulos fue mayor. Estas variables sólo fueron evaluadas a 27°C, por ser la mejor temperatura encontrada para el desarrollo de los cultivos celulares parasitarios.

Al encontrar que el suero de hembra preñada mejoraba los cultivos, decidimos evaluar una de las principales hormonas asociadas al embarazo, para cuyo efecto se utilizó gonadotropina comercial purificada a partir de suero de hembra preñada (Folligon), obteniéndose los mejores resultados a una concentración del 10% a 27°C.

Al encontrar que el PMA-Ionóforo de calcio y la gonadotropina al 10% por separado mejoraban las condiciones de los cultivos celulares, procedimos a utilizarlos conjuntamente, a fin de mejorar las condiciones del cultivo; sin embargo, los resultados no indicaron efectos potenciadores.

Se evaluó la adición de estradiol al medio de cultivo, ya que ésta hormona también se ha descrito que participa en el control de la parasitosis. Se utilizaron diversas concentraciones (1.0, 0.4, y 0.2 µg/ml), encontrando que 1 µg/ml favorecía la presencia de cúmulos celulares.

En definitiva de las diferentes condiciones evaluadas en el cultivo de células parasitarias, encontramos que los mejores resultados consistieron esencialmente en el medio RPMI 1640, complementado y adicionado con gonadotropina purificada a partir de suero de hembra preñada (Folligon) al 10%, a 27° C, constatando también que las células en mejor estado se observaron a los siete días de cultivo.

#### **Cultivos *in vivo* de células de cisticercos y evaluación de su capacidad de crecimiento.**

Con el fin de evaluar la posibilidad de mantener las células en la cavidad peritoneal de los ratones, se inocularon  $1.5 \times 10^6$  células parasitarias en la

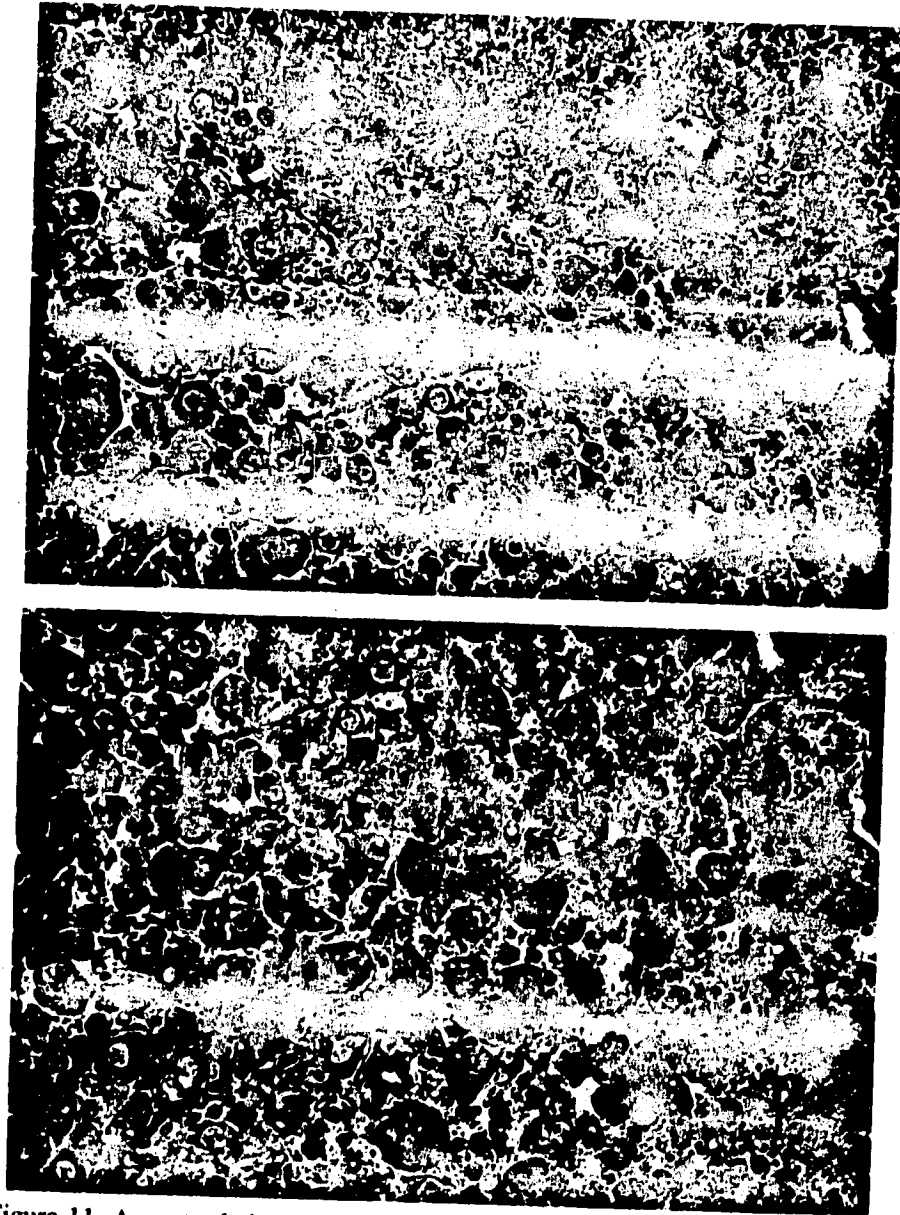


Figura 11. Aspecto de las células parasitarias obtenidas a los 7 días de cultivo *in vitro* en presencia de medio RPMI-1640 complementado y adicionado con gonadotropina al 10%, con el tratamiento tripsina-EDTA. Las células se encuentran libres de los fragmentos de cisticercos. Aumento 60x.

cavidad peritoneal de ratones hembras susceptibles BALB7cAnN. En la figura 11 se observa el aspecto de las células a los siete días de cultivo *in vitro* antes de ser inyectadas en la cavidad peritoneal de los ratones. Treinta días más tarde se sacrificaron los ratones y se lavaron las cavidades peritoneales de los mismos. Para nuestra sorpresa, encontramos un promedio de 120 cisticercos por cada ratón, resultado que nos sugirió que las células parasitarias se multiplicaron y se reconstituyeron en cisticercos. Con el propósito de confirmar este hallazgo, procedimos a repetir este procedimiento utilizando un número de células menor encontrando que con  $4 \times 10^5$  células también hubo desarrollo de parásitos con un promedio de 15 cisticercos a los 30 días posteriores a la inyección de las células.

#### **Cinética de crecimiento de células clonadas en ratones BALB/cAnN.**

Al sacrificar a los animales a los 18 días posteriores a la inoculación encontramos células de gran tamaño y en gran cantidad, agrupadas en cúmulos, medición compatible con la presencia de parásitos en formación. A los 24 días de infección, encontramos la presencia de 8 parásitos en promedio, macroscópicamente visibles. A este respecto, en la siguiente tabla se observa la cantidad de parásitos recuperados para diferentes cantidades de células inyectadas. En las figuras 12 y 13 se observa el aspecto de las células recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 24 días de ser inoculadas con células parasitarias clonadas.

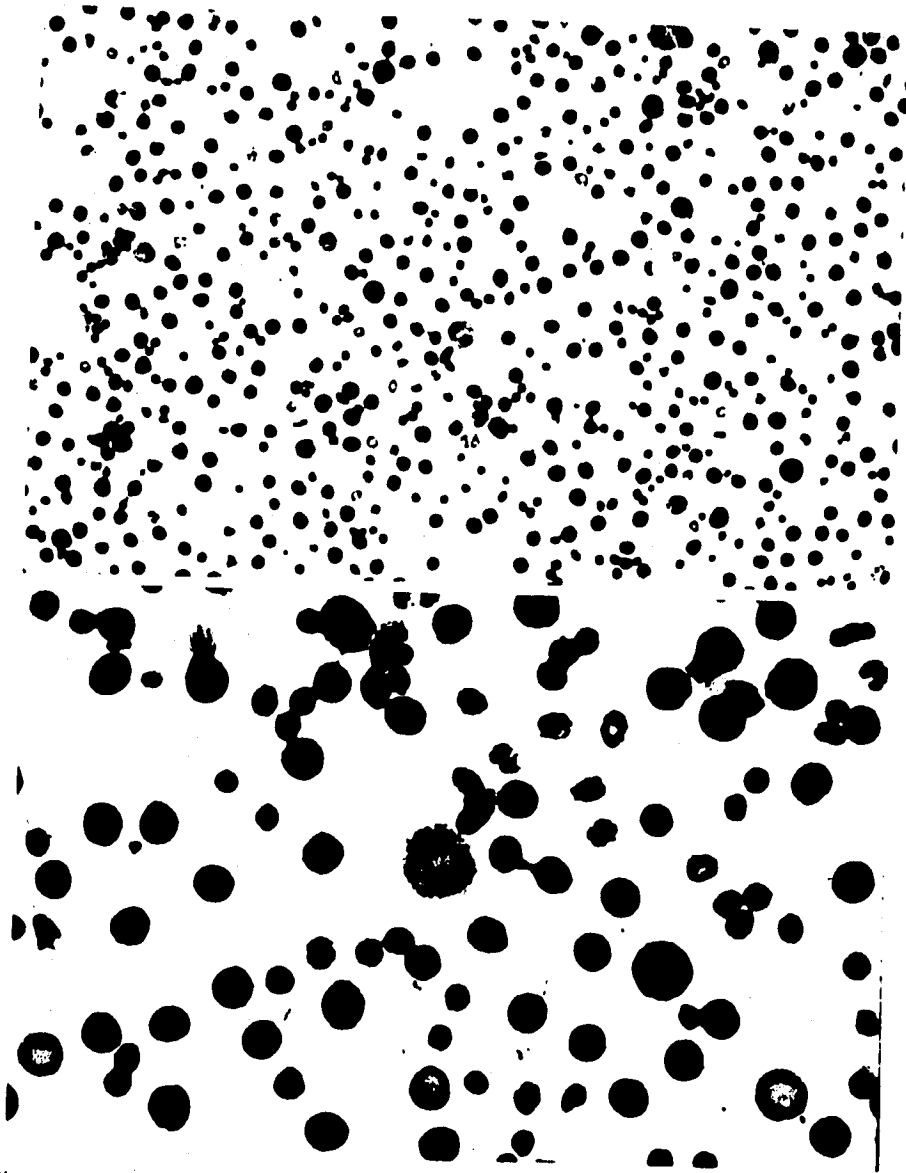


Figura 12. Aspecto de las células recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 24 días de haber sido inoculadas con las células de cisticercos clonadas. Se observan células binucleadas que aparentemente no pertenecen al hospedero ya que en la cavidad peritoneal de un ratón control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

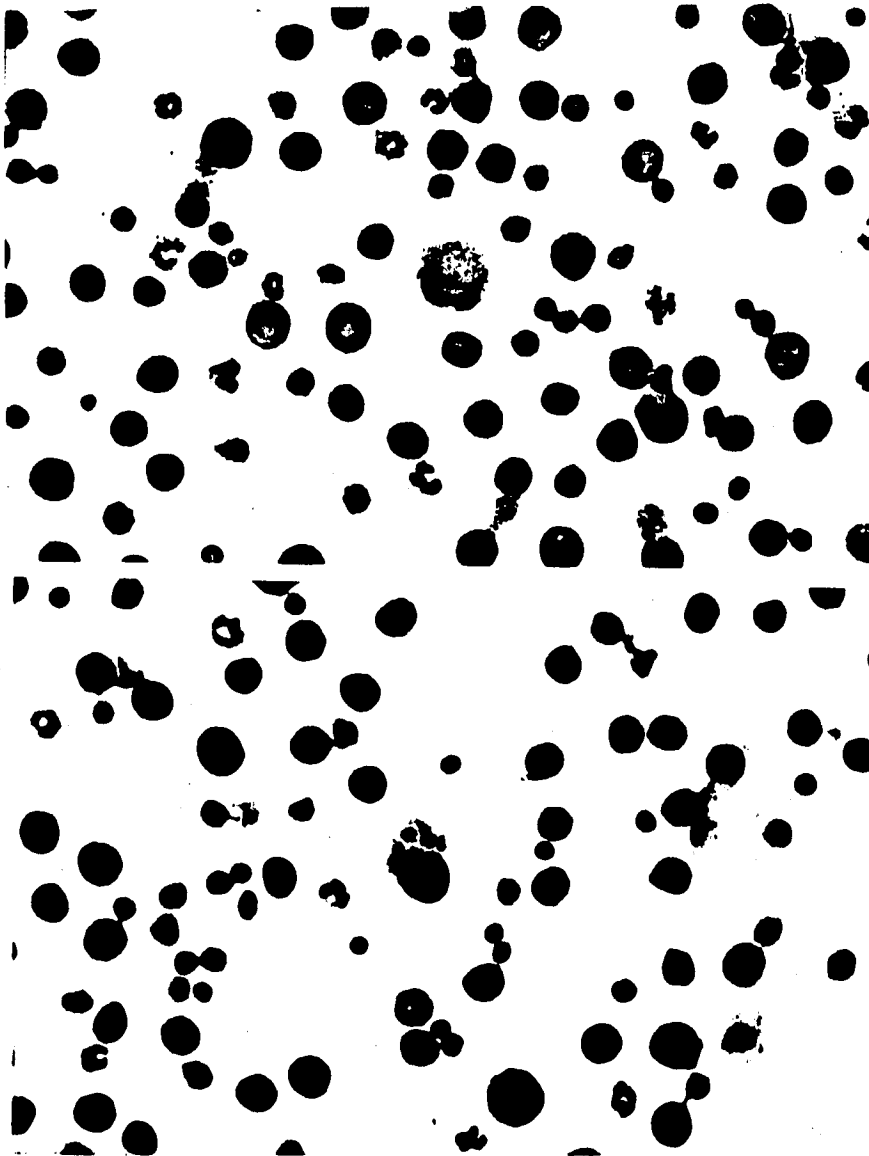


Figura 13. Aspecto de las células recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 24 días de haber sido inoculadas con las células de cisticercos clonadas. Se observan células binucleadas que aparentemente no pertenecen al hospedero ya que en la cavidad peritoneal de un ratón control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

Número de células parasitarias inyectadas por ratón	Promedio de número de cisticercos recuperados $\pm$ ds después de 30 días de inoculación
5 a 10	8.0 $\pm$ 2.82
4 x 10 <sup>5</sup>	15.8 $\pm$ 2.94
1.5 x 10 <sup>6</sup>	120 $\pm$ 28.28

Cabe señalar que entre las 4 x 10<sup>5</sup> y 1.5 x 10<sup>6</sup> células inyectadas por cada ratón, es muy probable que sólo algunas de ellas presenten la capacidad para regenerar parásitos completos. Mientras tanto cuando, se utilizan células clonadas se seleccionan aquellas con capacidad de crecer *in vitro* y si bien se inoculan una cantidad tan pequeña como 5 a 10 células por ratón, es probable que todas ellas puedan continuar dividiéndose y especializándose para formar un parásito.

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

C57BL/6J	
Días posteriores a la inoculación con $4 \times 10^5$ células parasitarias	Número de cisticercos recuperados por ratón.
10	0,0,0,0,0
15	0,0,0,0,0
30	0,0,0,0,0

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

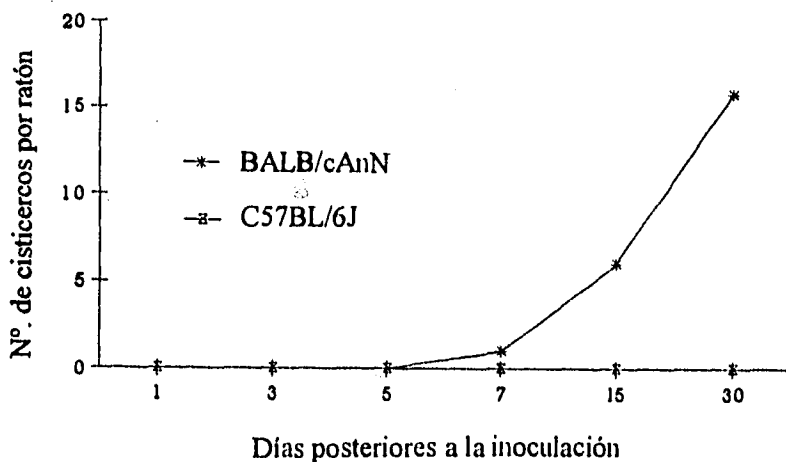


Figura 14. Cinética de formación de cisticercos después de inyectar ratones BALB/cAnN y C57BL/6J con  $4 \times 10^5$  células parasitarias por ratón.



**Cinética de producción de parásitos a partir de células de cisticercos en ratones BALB/cAnN (susceptibles) y C57BL/6J (resistentes).**

Como puede observarse Tabla VII, Figura 14 en los ratones susceptibles, durante los primeros 5 días no se observó recuperación de parásitos, pero al día 7, se observaron los primeros parásitos macroscópicamente identificables y a los 30 días de infección recuperamos un promedio de 15.8 parásitos por ratón. Por su parte en la cinética de ratones resistentes no se observaron parásitos macroscópicamente identificables en ninguno de los tiempos evaluados, hasta que a los 15 días, después de la inyección de las células, observamos la presencia de agregados celulares compatibles con imágenes de parásitos en formación. En la Figura 15 se muestra el aspecto de células de parásitos de cisticercos de *T. crassiceps*, recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J a los 30 días de inyección. En ambas cepas se puede apreciar la formación de agregados celulares de diferentes tamaños, así como células aisladas.

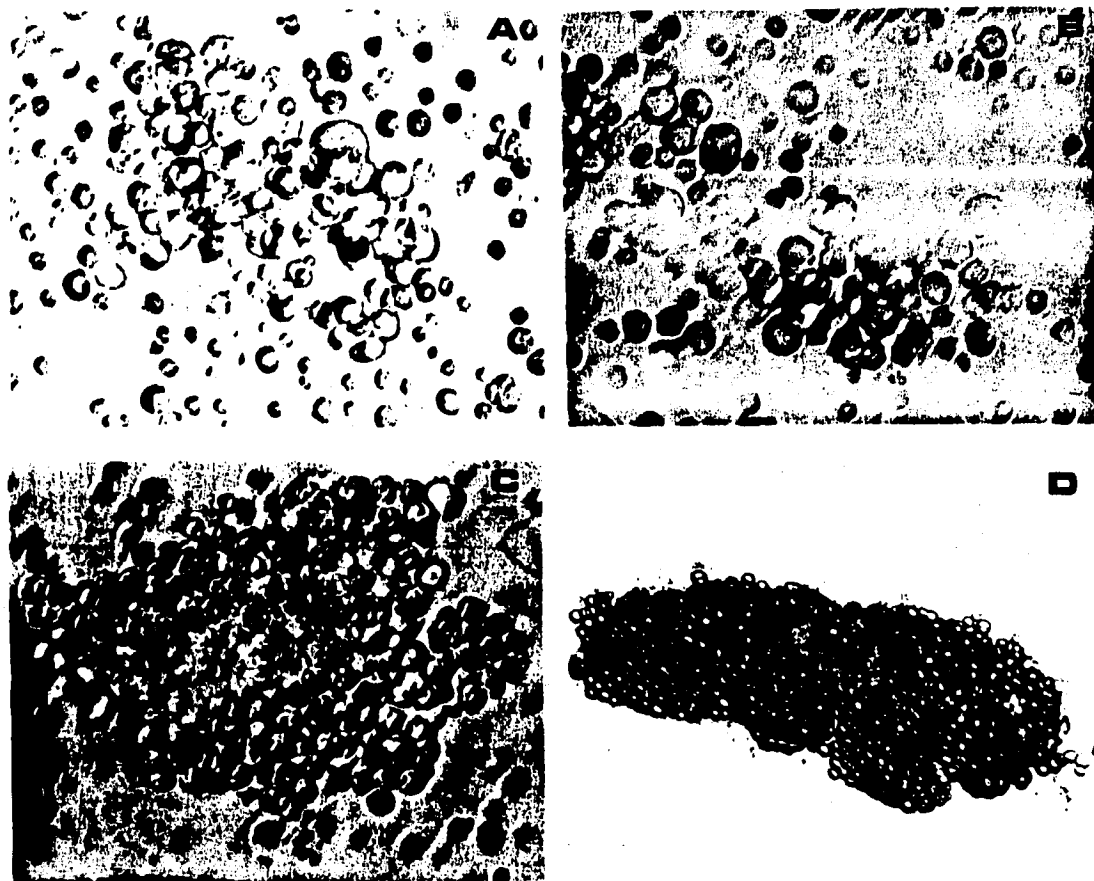


Figura 15. A, B, C.- Aspecto de las células de cisticercos de *Taenia crassiceps* recuperadas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN a los 30 días de inyección con  $4 \times 10^5$  células parasitarias. Aumento 40 x.

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

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

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

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

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

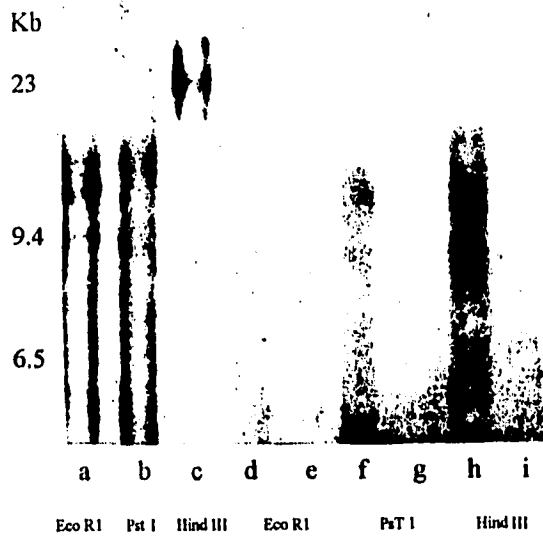


Figura 16. Hibridización de DNA de ratones BALB/cAnN (a, b, c) y del cisticerco de *Taenia crassiceps* ORF (d, f, h) e HYG (e, g, i) con la sonda c-myc, se muestra la hibridización de este oncogen en los genomas respectivos.

## V. DISCUSION

Como se ha dicho anteriormente, el presente trabajo de tesis consistió en el diseño de un blanco sensible y apropiado para la identificación de factores inmunológicos asociados a condiciones de resistencia o susceptibilidad en la cisticercosis experimental murina. Para ello, cisticercos murinos se trataron utilizando diferentes procedimientos con el fin de obtener células parasitarias, considerando que células del parásito podían modificar su viabilidad o crecimiento en forma más sensible que el parásito completo. El tratamiento de los parásitos por medio de un procedimiento mecánico, cortándolos a fin de reducirlos a pedazos pequeños, aunado a un tratamiento posterior (7 días) con tripsina, resultó ser el procedimiento adecuado para la obtención de células.

Las células producidas permanecieron viables durante los 15 días posteriores a su obtención. Curiosamente, tras la realización de dichos procedimientos se observaron mejores resultados cuando las células se cultivaban a 27 °C, que es una de las temperaturas ideales para el cultivo de células de insectos (Hink, 1979), que a los 37 °C, donde los resultados fueron muy poco alentadores. Se constató además que las células requieren de la presencia de suero fetal bovino para su producción. Con el fin de optimizar este procedimiento consideramos la adición de diferentes sustancias reportadas como mitógenos para células de mamíferos, entre las cuales evaluamos: Con A (1,10,100 µg/ml) y PMA- Ionóforo de calcio (10 nM/5 mM), mismos que se han reportado como activadores de una gran variedad de tipos celulares en diferentes especies, incluyendo células T y B de mamíferos (Truneh, *et al*,

1985., Dexler, et al, 1990., Liu lin, *et al*, 1992.). Al respecto, se ha descrito que el PMA-Ionóforo de calcio tiene un papel muy semejante al que realizan el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el 1,2-diacilglicerol (DG). Estas moléculas tienen función de segundos mensajeros intracelulares, por una parte el IP<sub>3</sub> participa movilizando el calcio intracelular, incrementando, la concentración de calcio citoplasmático, y el DG activa a la proteína cinasa C (PKC). Ambas señales actúan sinérgicamente fosforilando diferentes proteínas celulares que regulan la función y proliferación celular. Específicamente el PKC estimula la expresión de genes *c-myc* y *c-fos*, los cuales estarían involucrados en la transición de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en el ciclo celular (Hoshijima, *et al*, 1988).

La Con A, en la dosis de 1 µg/ml y el PMA-Ionóforo, resultaron ser los que indujeron mejores resultados, lo cual sugiere que las células parasitarias presentan en su superficie glicoproteínas capaces de ser reconocidas por Con A. La presencia de este tipo de glicoproteínas no es un hallazgo original, pues existen reportes de una extensa reactividad entre esta lectina y los antígenos parasitarios de cisticercos (Vidal Tamayo, 1990). Sin embargo, este hallazgo constituye una primera evidencia de la posibilidad de favorecer el crecimiento o mantenimiento de algunas o todas las células parasitarias, a través de la fijación a esta glicoproteína; por su parte, la respuesta a PMA-Ionóforo (10nM/5mM) sugiere que, al menos, algunas de estas células parasitarias poseen mecanismos de activación compartidos con células de mamíferos.

En la consideración de posibles candidatos para optimizar los cultivos celulares, tuvimos en cuenta la información previa acerca de la relevancia de las hormonas sexuales en el crecimiento parasitario (Reddinator *et al*, 1981.,

Schuurus y Verheul, 1990., Huerta, *et al*, 1992 ). En efecto, las hormonas sexuales tienen un papel importante tanto directo, como indirecto, en la regulación de la respuesta inmune y por ello probablemente se encuentren involucradas en el control de la infección parasitaria.

Se acepta generalmente que los machos son más susceptibles que las hembras para las infecciones parasíticas, aunque la referida susceptibilidad aumenta en varias parasitosis durante el embarazo. Así, mientras que en algunas parasitosis como en la malaria, tripanosomiasis y toxoplasmosis, los estrógenos y progesterona son los mediadores asociados a la inmunosupresión durante el embarazo (Alexander y Stimson, 1988), se ha reportado que en infecciones causadas por *T. crassiceps* las hembras son mas susceptibles que los machos en un extenso conjunto de cepas de ratones utilizadas (Sciutto, *et al*, 1991). Incluimos suero de hembras preñadas y suero de hembras normales, encontrando que los cultivos se mejoraban en presencia de suero de hembra preñada. Evaluamos entonces la utilización de una de las principales hormonas asociadas al embarazo, como lo es la gonadotropina purificada a partir de un suero de yegua preñada Folligon. Esta substancia es una glicoproteína capaz de ser substituída por la gonadotropina foliculo estimulante de la glándula pituitaria anterior tanto de hembras como de machos, participa estimulando el desarrollo del foliculo ovárico en hembras y en la actividad espermatogénica de los machos, la cual se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. Utilizando esta hormona obtuvimos los mejores resultados, lo que sugiere la capacidad de las células para interaccionar específicamente con ella. En consecuencia la identificación de receptores capaces de reconocer específicamente esta

hormona sería de gran interés para profundizar en el conocimiento del componente endócrino participante en la relación huésped-parásito.

Junto con los procedimientos anteriores, se evaluaron también los contenidos de la cavidad peritoneal de ratones susceptibles infectados en la esperanza de que en este compartimento se encontraban factores de crecimiento producidos por los propios parásitos; sin embargo, los resultados no indicaron efectos positivos.

También evaluamos si la presencia de estradiol en los cultivos favorecía el desarrollo de las células parasitarias, encontrando que el estradiol en una concentración de 1 µg/ml produjo una frecuencia mediana de cúmulos celulares en el medio de cultivo y alrededor de los cisticercos cortados. Aunque la respuesta a estradiol no fue tan favorable como la respuesta a gonadotropina, resultaría interesante evaluar los mecanismos de interacción entre esta hormona y las células parasitarias. Se ha observado que en cultivos *in vitro* de cisticercos de *T. crassiceps* las hormonas sexuales como el-17 β estradiol, la testosterona y la progesterona no afecta la reproducción y crecimiento de los mismos (Huerta, *et al*, 1992).

Los resultados anteriormente expuestos constituyen la primera documentación de que los cisticercos pueden disgregarse hasta células parasitarias viables en cultivos de hasta 15 días de duración y señalan algunos factores que podrían favorecer su crecimiento y reproducción.

Considerando previamente que el cisticerco de *T. crassiceps* crece naturalmente en el ratón y que experimentalmente se ha demostrado que hasta un cisticerco inyectado intraperitonealmente puede dar lugar a un centenar de



cisticercos después de un mes de inyección (Freeman, 1962), evaluamos la capacidad de crecimiento de las células producidas *in vivo*, inyectándolas en su huésped natural. Para ello, inyectamos aproximadamente  $1.6 \times 10^6$  células (resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo) en la cavidad peritoneal de ratones. Sorprendentemente, 30 días después recuperamos entre 100 y 140 parásitos por ratón inyectado. Ante dicho resultado, repetimos el experimento controlando la posibilidad de que en la inyección no incluyéramos parásitos completos. Con este fin, y a partir de un cultivo celular, se aislaron células individuales, considerando que algunas de éstas podían incluir a las probables células capaces de reconstituir a un parásito y no incluir parásitos pequeños o fragmentos. A continuación, se mantuvieron *in vitro* durante 48 horas con el fin de reproducir un conjunto de células provenientes de cada célula aislada, que tuvieran así mayores probabilidades de establecerse en el ratón. Los resultados fueron satisfactorios, mismos que quedan expuestos en las siguientes dos mediciones:

1. De 360 células parasitarias aisladas (60 pozos de placa de cultivo con 6 células parasitarias cada uno) solo el 5 % del total fueron capaces de proliferar.
2. A los 18 días después de haberlas inoculado en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN, susceptibles a la infección con parásitos completos, recuperamos una gran cantidad de células aisladas y agregados celulares, sugerentes de la existencia de un mecanismo de reagrupamiento y proliferación probablemente en camino de formar un parásito completo.

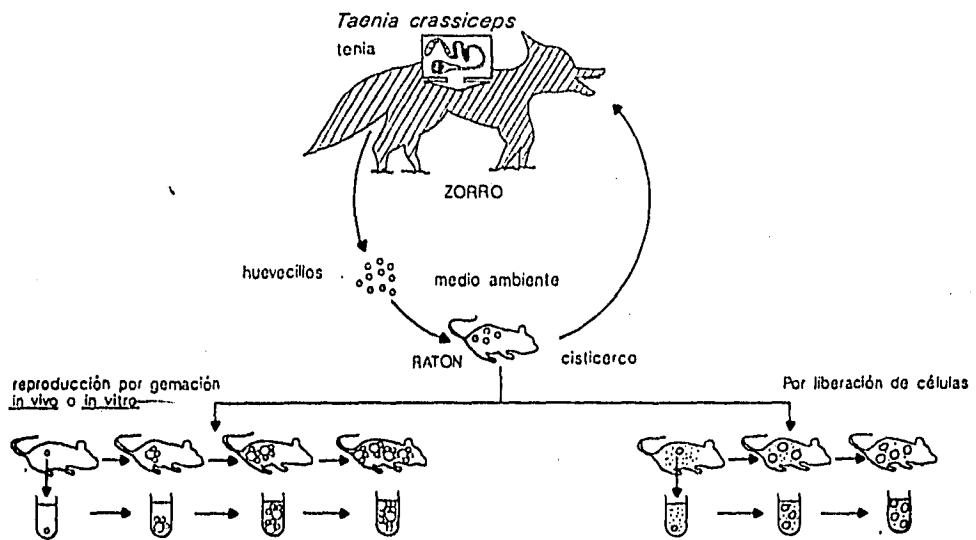


Figura 17. Propuesta de un nuevo modelo del ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

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

Este resultado no sólo nos señala que en el cisticerco existen células capaces de proliferar y especializarse, a fin de formar un parásito completo, sino que nos permite proponer una forma adicional de reproducción del parásito a través de la liberación de estas células. Consecuentemente, proponemos una nueva versión del ciclo de vida de *T. crassiceps*, como se puede observar en la Figura 17.

A fin de confirmar en forma categórica la referida propuesta, queda por identificar si células parasitarias existen en el contenido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con parásitos completos, estudios que se encuentran actualmente en proceso. En este sentido y considerando la relevancia biológica de esta importante observación procedimos a realizar un estudio cinético después de la inyección de las células parasitarias. Observamos en primer lugar la capacidad de formación de parásitos a partir de células parasitarias en animales de diferente composición génica, considerando información previamente reportada por nuestro grupo de investigación en la que se señalan importantes diferencias de susceptibilidad en distintas cepas de ratones. A continuación, y con el propósito ya señalado, seleccionamos, ratones previamente identificados como resistentes (C57BL/6J) y susceptibles (BALB/cAnN) ante un desafío con diez parásitos por ratón, fueron inoculados con 400.000 células parasitarias por ratón. La cinética de crecimiento realizada en estos ratones nos permitió observar que en animales susceptibles

(BALB/cAnN), los primeros parásitos aparecen tan pronto como al séptimo día después de inyectadas las células, mientras que en los ratones definidos previamente como resistentes (C57BL/6J) a la cisticercosis no se recuperaron parásitos macroscópicamente observables; sin embargo, se observaron células aisladas de gran tamaño y agrupamiento de cúmulos celulares, indicándonos la posible formación de parásitos. Esto señala que la diferencia de susceptibilidad podría deberse a mecanismos diferenciales o de distinta eficiencia entre resistentes y susceptibles, que se ejercen en el control del crecimiento parasitario a través de la liberación de células. Entre dichos mecanismos podrían figurar el control a través de anticuerpos fijadores de complemento específicos contra antígenos, tempranamente expresados por las células parasitarias e importantes para su división, así como el tipo de respuesta celular asociada a la presencia de estas células en el peritoneo. Estos diferentes mecanismos posibles pueden ahora estudiarse cuidadosamente, utilizando las células parasitarias como blancos.

Por otra parte, llamó nuestra atención la poca variabilidad en el número de parásitos recuperados de cada ratón inyectado con células, respecto a las diferencias observadas en el número de parásitos recuperados cuando los ratones son infectados con parásitos (Tabla III). Estas diferencias podrían deberse a la existencia de más de un fenómeno de reproducción, cuando se desafían los ratones con parásitos. Ahora bien, con base en este tipo de desafío analizamos un fenómeno de reproducción más complejo mismos que incluyó: el crecimiento de fragmentos de parásitos producidos por el pasaje de los mismos a través de la aguja de inyección, la reproducción por gemación de los parásitos

que se establecieron, la liberación de células capaces de transformarse en parásitos y, por último el proceso de muerte de cada una de las partes mencionadas, que probablemente tenga lugar como resultado de su enfrentamiento con el huésped o como parte de un proceso natural.

Los resultados obtenidos nos permitieron también proponer un nuevo modelo experimental a utilizar, con el fin de identificar mecanismos inmunológicos asociados a resistencia. A este respecto, sabemos por trabajos anteriores que la respuesta inmune participa en el control de la parasitosis, por un lado, mientras la vacunación con distintos antígenos parasitarios incrementa la resistencia del huésped (Sciutto, *et al.*, 1990); por otro la infección induce una depresión inmunológica en los ratones, la cual parece favorecer el crecimiento del parásito. A pesar de poder inducir por vacunación una respuesta inmune protectora, aún no se han encontrado diferencias en mecanismos inmunológicos asociados a estas condiciones de resistencia, ni a condiciones de susceptibilidad. Es probable que la dificultad en encontrarlos se deba, al menos en parte, al blanco al que está dirigido el mecanismo inmunológico en estudio. Así, el cisticerco resulta un blanco macroscópico complejo con capacidad para evadir y recuperarse de los daños ocasionados por la respuesta inmune.

En definitiva, el contar con este nuevo modelo experimental basado en la reconstrucción de parásitos a partir de células parasitarias, parece factible, y de gran utilidad, pues nos permitirá evaluar la identificación de diversos componentes inmunológicos involucrados en el control del crecimiento parasitario. Además, la producción de células parasitarias probablemente nos

permitirá conocer más acerca de la biología celular y molecular del cisticerco de *T. crassiceps* y con ello también profundizar en el conocimiento de la cisticercosis por *T. solium*. El hallazgo y constatación del hecho de que unas células puedan generar un parásito completo, resulta además de un gran interés biológico, tanto en el estudio de este parásito, como en su empleo como un modelo de diferenciación.

Por otra parte, nuestras observaciones *in vitro* sugieren que las células parasitarias pierden viabilidad a partir de los 15 días de cultivo, fenómeno que probablemente se deba a que los cultivos carezcan de algunos de los componentes que le brinda el ratón y que permitan la producción de líneas celulares. Entre los intentos por prolongar su supervivencia ensayamos la adición de líquido peritoneal de ratones al medio de cultivo, lo cual no modificó la viabilidad de las células. De allí que, probablemente existen otros componentes del hospedero que podrían ser importantes en el desarrollo de las mismas, o bien que la muerte de algunas de las células durante la reproducción *in vitro*, podrían llegar a afectar el desarrollo de las células capaces de continuar desarrollándose. El crecimiento de células aisladas indicó que existen, por lo menos, algunas células capaces de proliferar y poder reestructurar un parásito *in vivo*. Con el propósito de desarrollar cultivos más prolongados a partir de estas células aisladas, iniciamos experimentos que se encuentran actualmente en proceso.

El disponer de células parasitarias abre también la posibilidad de modificar genéticamente el cisticerco, al menos en alguna de sus células; posibilidad que a la fecha no ha sido factible realizar utilizando el parásito

completo. De allí que para comenzar a evaluar la posibilidad de inducir líneas celulares a través de modificación génica, consideramos la incorporación en las células del parásito de genes involucrados en la proliferación celular, como es el caso de c-myc.

Secuencias homólogas de oncogenes en el DNA de vertebrados se encuentran muy conservadas en *Drosophila melanogaster* (Shilo y Weinberg , 1981) y en varias especies de *Entamoeba* (Leyva, *et al.*, 1993). Al respecto, debemos recordar que la identificación de secuencias homólogas de oncogenes vertebrados en invertebrados demuestra un alto grado de conservación de estos genes en una gran diversidad de especies; en vertebrados se ha reportado que el proto-oncogene c-myc participa en procesos de proliferación y diferenciación celular (Marcu, *et al.*, 1992) y se ha propuesto que éste pueda participar en la regulación de otros genes celulares. En definitiva, se ha propuesto que c-myc puede jugar un papel importante en lo que se refiere al metabolismo de metazoarios, como es el caso de *T. crassiceps*.

En el plano de las verificaciones, para que este oncogen se incorpore eficientemente al genoma de parásito en un alto número de copias, simulando un estado del gen activado, buscamos si se encontraba presente normalmente en el genoma de *T. crassiceps*. Al respecto la hibridización realizada, utilizando una sonda específica de c-myc, indicó la presencia de este oncogene en el genoma de *T. crassiceps*; sin embargo, falta por descartar que se trate de contaminación con material génico del huésped. Esta posibilidad se descartará identificando las clonas correspondientes en una librería de cDNA de *T. crassiceps* producida en nuestro laboratorio (Manoutcharian, K. *et al.*, 1995).

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



## VI. CONCLUSIONES

Culminando el proceso de verificación y análisis de resultados de nuestra investigación, arribamos a las siguientes conclusiones:

En primer lugar, se obtuvieron células individuales a partir de cisticercos completos de *Taenia crassiceps*. En concordancia con tal fenómeno, las células parasitarias se evaluaron en su capacidad de mantenerse *in vitro*, encontrándose que las condiciones óptimas de mantenimiento son en medio RPMI 1640, complementado y adicionado con gonadotropina purificada al 10%, a una temperatura de 27°C.

En segundo lugar se constató que las células parasitarias son capaces de mantenerse viables, al menos 15 días después de su obtención, y que también son capaces de mantenerse *in vivo* en la cavidad peritoneal de ratones susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (C57BL/6J). En esta misma línea, se constató que las células parasitarias son capaces de agregarse y formar un parásito completo.

Por último, se identificó la presencia de secuencias homólogas a la sonda c-myc en el genoma del cisticercos de *Taenia crassiceps* tanto en la variedad HYG como en la ORF.

## **VII. Apéndice I: Cultivos celulares.**

### **A. CULTIVO DE CELULAS DE VERTEBRADOS**

#### *Establecimiento de células en cultivo.*

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

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

Ninguna de estas células nutrientes tenían la capacidad de multiplicarse, pero se encontraban en un estado metabólicamente activo, permitiéndoles esto liberar una gran cantidad de nutrientes para que las células primarias en cultivo pudieran mantenerse, una vez logrado el proceso de establecimiento las células son llamadas células secundarias.

Es conocido el hecho de que generalmente las células no tienen una multiplicación infinita y que pueden dividirse un número de veces finitas antes de morir, por ejemplo las células provenientes de tejidos de pollo se pueden multiplicar de 20 a 40 veces antes de morir; cultivos de piel humana usualmente se dividen no más de 50 a 100 veces antes de morir, además si contamos con el hecho de que las células de piel o fibroblastos provenientes de individuos viejos tienen tiempos de vida más cortos. Afortunadamente, no todas las células provenientes de cultivos animales mueren, ya que algunas de ellas pasan el periodo llamado "crítico" y adquieren la habilidad de multiplicarse indefinidamente. A estas células que tienen la capacidad de crecer indefinidamente, se les refiere frecuentemente como inmortales (Watson, 1987), existe un número considerable de líneas celulares que han sido derivadas de tumores. La posesión de un fenotipo cancerígeno a menudo permite una más fácil adaptación de las condiciones de un cultivo celular. Esta propiedad puede deberse a que tanto las células cancerígenas, como las células normales, pueden adaptarse permanentemente en cultivos debido a un incremento en el número de cromosomas, frecuentemente cerca del doble del número diploide normal, un ejemplo son las líneas celulares cancerígenas HeLa las cuales tienen alrededor de 70 a 80 cromosomas, comparado con un número

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

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

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

### ***Requerimientos nutricionales.***

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

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

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

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

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

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

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

## **B. CULTIVO DE CELULAS DE INVERTEBRADOS**

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

### ***Mantenimiento de las líneas celulares.***

Las líneas celulares de invertebrados crecen más rápidamente en un rango de temperatura entre los 25°C y 30 °C, generalmente se acepta que una

temperatura de 28°C es la adecuada para el cultivo y desarrollo de todas las células de invertebrados (Hink, 1979). Como se sabe muchas de las líneas celulares de vertebrado crecen en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> de aire, a diferencia de las células de invertebrados que son capaces de crecer en condiciones atmosféricas normales.

Las células pueden mantenerse en frascos o botellas de cultivo teniendo aproximadamente 5 ml de medio de cultivo por cada 25 cm<sup>2</sup> de superficie de crecimiento, los subcultivos se realizan traspasando una alícuota de células a un nuevo frasco que contiene medio fresco. Las células de invertebrados al igual que muchas otras células deben ser subcultivadas en la fase exponencial de crecimiento o justo antes de que las células entren en su estadio estacionario; para poder determinar el momento en el cual deben ser subcultivadas se debe realizar una curva de crecimiento.

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

Si las células se dañan con alguno de los procedimientos anteriormente descritos, pueden utilizarse enzimas, tales como la tripsina la cual es una de las más comúnmente utilizadas, a una concentración de 0.1 a 0.2%, las células



junto con la tripsina son incubadas durante 2 a 5 minutos, dependiendo de la línea celular de que se trate, agitando suavemente para así poder lograr una adecuada separación de células; para detener la acción de la tripsina se sugiere añadir suero fetal bovino inactivado.

### ***Medios de cultivo para células de invertebrados.***

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

Los antibióticos generalmente utilizados son la penicilina G en una concentración de 100 U/ml y la estreptomina en una concentración de 100  $\mu$ g/ml.

Por ejemplo las células de mosquito generalmente tienen la capacidad de crecer en el medio de Mitsunashi, el cual está constituido entre otras cosas de un medio basal formado por sales de fosfatos y cloruros, azúcares, penicilina,

estreptomicina, FBS, e hidrolizado de lactoalbúmina; pero también se han adaptado a crecer en un medio desarrollado para cultivos de células de vertebrados como lo es el medio Eagle, con un 1% de aminoácidos no esenciales, 10% de FBS y 1% de hidrolizado de lactoalbúmina.

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

### **C. CULTIVO DE CELULAS DE PARASITOS.**

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

*Taenia pisiformis*, la cual ha sido cultivada *in vitro* obteniendo

metacéstodos a partir oncosferas (Voge, 1978), y más recientemente cultivos de cisticercos a formas adultas (Osuna y Mascaró, 1982).

*Taenia taeniformis* ha sido mantenida *in vitro*, con el propósito de determinar la naturaleza de las sustancias que se liberan al medio de cultivo, dentro de las que se encuentran, factores de crecimiento que estimulan el desarrollo de células gástricas de rata y de perro, e inhiben la producción de testosterona de las células de Leydig.

En el año de 1982 Morales y Canedo intentaron cultivar *in vitro* metacéstodos de *Taenia solium* con el propósito de obtener el parásito en su forma adulta. El medio de cultivo utilizado fue, un medio mínimo esencial, el cual estaba complementado con glucosa, penicilina, estreptomina y gentamicina. Los cisticercos fueron seleccionados a partir de músculo de pierna de cerdo; la incubación se llevo a cabo a 37°C, en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. El crecimiento máximo obtenido fue de 39 mm de longitud en 31 días, después del cual ya no hubo crecimiento.

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

Los recientes avances en la parasitología molecular han permitido desarrollar líneas celulares provenientes de parásitos, tal es el caso de los cultivos de *Schistosoma mansoni*, basandose en técnicas de cultivo ya desarrolladas con anterioridad (Weller y Wheeldon, 1982; Newport y Weller,

1982; Clemens y Basch, 1989; Blair, *et al*, 1991), Hobbs y colaboradores establecieron protocolos para la obtención y mantenimiento de células a partir de formas juveniles de *S. mansoni*, permitiéndoles mantener a los cultivos por periodos de 6 meses o más, estos cultivos presentaban las características y propiedades del organismo a partir del cual fueron originados, las células aisladas fueron de una gran variedad teniendo células en flama, células con formas alargadas las cuales tienen un fino flagelo, células en racimos, células con formas poligonales y células germinales, estas últimas con características que hacen facil su identificación ya que presentan un gran núcleo y su citoplasma es rico en mitocondrias y ribosomas. Los cultivos a partir de *S. mansoni* son uno de los primeros reportes que se tienen en cuanto al desarrollo de cultivos celulares a partir de parásitos, de ahí su importancia y trascendencia en el conocimiento de la biología y fisiología de los parásitos.

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

## VIII. Apéndice II: Oncogen c-myc

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

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

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

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

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

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

Cada una de las tres familias de genes myc de mamíferos tienen las mismas características en la estructura de los tres exones. El primer exón de myc no es conservado, pero posee funciones regulatorias. El gen c-myc codifica para dos polipéptidos (Myc-1 y Myc-2) de 453 y 439 aminoácidos con un peso molecular de 68,000 y 65,000 respectivamente. Los polipéptidos Myc-1 y Myc-2 solamente difieren su amino terminal por 14 aminoácidos. Myc-1 es la proteína ligeramente más grande, su sitio de iniciación es en el codón CUG cerca del extremo 3' terminal del primer exón del gen. El resto del primer exón



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

La proteína c-Myc presenta localización nuclear, capacidad de unión al ADN y una amplia distribución en diferentes tejidos y tipos celulares (Persson y Leder, 1984; Stone, *et al*, 1987; Eisenman, *et al*, 1985; Keath, *et al*, 1984; Schmid, *et al*, 1989) y por si sola es suficiente para la inducción de re-entrada al ciclo celular. Además se encuentra implicada en la inducción del programa de muerte celular (apoptosis), mientras que el gen supresor de tumores p53 es un regulador negativo que arresta a las células en la fase G1, así la expresión desregulada de c-*myc* y la pérdida de la función del tipo silvestre de la proteína p53 se ha encontrado en muchos tipos de tumores (Hermeking y Eick, 1994).

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

Se han encontrado secuencias homólogas a c-myc en diferentes especies de invertebrados como el parásito protozoario *Entamoeba* (Leyva, *et al*, 1993), en *Drosophila* (Bishop, 1983; Shilo y Weinberg, 1981) y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Bishop, 1983), por lo que la proteína Myc se encuentra conservada evolutivamente. También la fosfoproteína nuclear Myc-2 se expresa temprano en el desarrollo (Persson y Leder, 1984), se produce a niveles bajos en células normales (Eisenman, *et al*, 1985), tiene una vida media corta y una actividad de unión no específica al ADN (Blackwood y Eisenman, 1991). El proto-oncogen celular myc es el homólogo al gen transformante del retrovirus agudo en aves MC29 (Corcoran, *et al*, 1984; Shilo y Weinberg, 1981; Dalla, *et al*, 1982; Vennstrom, *et al*, 1982) y juega un papel crítico en la

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

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

El gen c-myc se encuentra en la categoría de los oncogenes inmortalizadores como Ela, p53 y la proteína grande del virus del simio 40 (SV40), los cuales pueden transformar parcialmente células primarias en cultivo pero no inducen un fenotipo tumorogénico. Una expresión anormal de myc puede alterar la regulación de genes celulares, lo cual implica que la célula sea más susceptible a la transformación hacia un fenotipo maligno. La acción de otro oncogen o la pérdida de un gen supresor tumoral puede promover o acelerar la tumorigénesis. Se han descubierto genes supresores tumorales, como el gen de la susceptibilidad al retinoblastoma (pRB) lo cual sugiere la presencia de mecanismos relacionados a estos genes supresores (Marcu, 1992). Existen evidencias de que la expresión de RB actúa en G1 y previene la progresión del ciclo celular y se encuentra regulada su función por TGF-B. RB puede actuar por unión y secuestro de los factores de transcripción necesarios para la progresión de G1 a S y reprimir de esta forma la inducción del gen c-myc (Hunter, 1991). De esta manera se ha propuesto que los productos de estos genes supresores pueden interactuar directa o indirectamente con genes celulares normales involucrados en el crecimiento y/o proliferación. Los genes supresores podrían regular la actividad de estos genes asociados a resistencia. La pérdida de la función de estos genes supresores tumorales propuestos a través de una gran deleción o algunas otras mutaciones pueden perturbar la autoregulación normal de estos genes asociados al ciclo celular, como c-myc, llevándolos a una expresión inapropiada o a una posible progresión tumoral (Marcu, 1992). El oncogen c-myc no produce un foco de formación en los primeros pases en las células de FR3T3 (10 generaciones) pero puede dar lugar

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

la proteína específica del gen c-myc tienen un promedio de vida relativamente corto (Kelly, 1986).

Los oncogenes celulares (ej. myc, jun, fos) son rápidamente inducidos cuando las células en reposo son tratadas con mitógenos (Hunter, 1991). La forma en que myc induce el establecimiento de líneas celulares de fibroblasto ha sido muy estudiado, se ha demostrado la activación de c-myc en respuesta al factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y otras sustancias que mimetizan los efectos del PDGF en fibroblastos incluidos en el suero (el factor de crecimiento fibroblástico y el promotor de tumores 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetato o TPA ). La inducción de c-myc por una estimulación mitogénica no es única en células fibroblásticas (Marcu, 1992). En otros trabajos se ha amplificado la expresión de c-myc en sublíneas celulares de BALB/c-3T3 por la adición de PDGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o insulina en el medio de cultivo (Armelin, *et al*, 1984). Niveles abundantes de ARNm c-myc puede reemplazar los requerimientos de PDGF al medio de cultivo mediando la respuesta de crecimiento de la célula. Las células que expresan c-myc y c-myb pueden crecer en medio de cultivo libre de suero en ausencia de factores de crecimiento exógenos (Armelin, *et al*, 1984; Hunter, 1991). El ARN mensajero (ARNm) de c-myc también se puede inducir por agentes que inician la primera fase de la respuesta proliferativa en linfocitos (Concanavalina A y lipopolisacáridos, mitógenos específicos para células B o mitógenos linfocitario), además los niveles de ARNm de c-myc se encuentran modulados en células primarias por factores de crecimiento como EGF e interleucina 2 (IL-2) (Kelly, 1986). La pérdida en la expresión de c-myc ocurre en las células que

se encuentran en estados terminales de diferenciación. Alternativamente, decrementos importantes en la síntesis de ADN puede estar asociada con un supresión de c-myc.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. I-III.

Manson, M.M. (1992). *Immunochemical protocols*. Human Press, New Jersey. 480 pp.

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

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

Morales, E y Canedo, L. (1982). *In vitro* study of the early transition of *Taenia solium* from metacestode to adult. In Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives (A. Flisser, et al., eds), pp 495-498. Academic Press, New York and London.

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

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

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



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

QIAGEN genomic DNA for cell culture DNA kits.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ***AGRADECIMIENTOS.***

Agradezco muy especialmente a:

A la Q.F.B. Mercedes Baca.

A la Bióloga exp. Marisela Hernández.

A la Dra. Gladis Fragoso Gonzales.

Al M. en C. Alejandro Padilla.

A Marie Therese Merchant.

Al Dr. Andres Castell Rodriguez.

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

A Carmen Cruz Revilla por su muy importante colaboración en la realización de este trabajo de tesis.