

11281
13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS POR LA RADIACION
GAMMA EN EL METACESTODO DE *Taenia solium*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A:
MVZ. FERNANDO IVAN FLORES PEREZ

COMITÉ TUTORIAL:
Msc. ALINE S. DE ALUJA

TUTORA PRINCIPAL.
DRA. EDDA SCIOTTO CONDE
DRA. GLADIS FRAGOSO GONZALEZ

MEXICO, D.F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.
Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.
A la Facultad de Medicina.
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Al Instituto de Ciencias Nucleares.

Y especialmente a los MAESTROS por la formación obtenida

A mis asesores con respeto y admiración

A la Dra. Aline S. De Aluja por su incondicional apoyo en la realización del presente trabajo, pero sobre todo por las enseñanzas que a lo largo de siete años me ha transmitido ¡Gracias por ser mi maestra y amiga!.

A la Dra. Edda Sciutto Conde, por el privilegio de permitirme trabajar en su Laboratorio, por su apoyo y sugerencias a lo largo del desempeño del presente trabajo. ¡Gracias!.

A la Dra. Gladis Fragosó González, por sus comentarios sugerencias y tiempo dedicados a mi formación, desde la admisión del posgrado hasta la presentación del examen. ¡Gracias!

Al jurado

KAETHE WILLMS
ALINE S. DE ALUJA
PATRICIA TATO
RAFAEL BOJALIL
ABRAHAM LANDA
REGINA MONTERO
JOSE JUAN MARTINEZ MAYA.

Por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis y sus comentarios emitidos con la finalidad de mejorar el producto final. ¡Muchas gracias!

Al señor Aureliano Torres García por su asistencia en los sacrificios humanitarios.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 400370-5-35418-B y proyecto PAPIT IN206301 por el financiamiento otorgado para el presente trabajo.

TESIS CON
FALLA DE CENGEN

CONTENIDO

	PAGINA
I. RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN.....	3
III JUSTIFICACIÓN	10
IV OBJETIVOS	11
V METODOLOGÍA	12
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Cuadro 1. Metacéstodos de <i>T.solium</i> evaginados <i>in vitro</i> testigos e irradiados.....	20
Figura 1. Metacéstodos en estado vesicular.....	21
Figura 2. Metacéstodos evaginados irradiados con 0.3 KGy (izquierda) y testigos (derecha), después de permanecer 12 hrs incubados a 37°C.....	22
Figura 3. Escolices obtenidos de intestinos de hámsteres 21 días post infección utilizando metacéstodos irradiados con 0.3kGy.....	29
Figura 4. Tenias obtenidas a partir del intestino de un hámster 21 días post infección, que fue inoculado con metacéstodos testigo.....	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Tenias y escólices recuperados en intestinos de hámsteres 21 días post infección con metacéstodos de <i>T.solium</i> testigos e irradiados con 0.3 kGy.....	31
Figura 5. Células fragmentadas detectadas por TUNEL.....	34
Figura 6. Sección histológica practicada en una tenia (100X), en la cual se llevo acabo el TUNEL.....	36
Figura 7. Células positivas a TUNEL observadas en un escolex (100X).....	37
Figura 8. Fragmentación nucleosomal de ADN.....	39
VII CONCLUSIONES.....	42
VIII PRESPECTIVAS.....	43
IX LITERATURA CITADA.....	50
XI PUBLICACIONES.....	60
Carta de aceptación Parasitology research.....	61
Apoptos induced by gamma radiation of <i>T.solium</i> metacestodes.....	62
Inhibitory role of antibodies in the development of <i>Taenia solium</i> and <i>Taenia crassiceps</i> toward reproductive and pathogenic stages (publicación por colaboración).....	77

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

¿Es la muerte importante
para la vida?(artículo de
revisión).....

82

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Flores-Pérez Fernando Ivan. Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacéstodo de *Taenia solium*. Bajo la dirección de: MSc. Aline S. de Aluja, Dra. Edda Sciutto y Dra. Gladis Fragosó González.

La tecnología de irradiación de alimentos se considera como una alternativa para la prevención de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). En caso de la teniosis cisticercosis, estudios previos demuestran que una dosis de radiación de 0.3 kGy aplicada a carne de cerdo infectada con el metacéstodo de *Taenia solium* (*T. solium*) evita el crecimiento a parásito adulto. El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de evidenciar algunos efectos a nivel celular mediante los cuales la radiación gamma inhibe el crecimiento del parásito. Los metacéstodos se obtuvieron de varios cerdos infectados naturalmente y se irradiaron con una dosis de 0.3kGy. La viabilidad de los metacéstodos se evaluó por la prueba de evaginación *in vitro* y la inoculación en hámsteres, previamente inmunodeprimidos con acetato de metil prednisolona. Con los ensayos de fragmentación de ADN y TUNEL, se evaluó el fenómeno de apoptosis, en metacéstodos después de la irradiación, en los escólices y tenias obtenidas 21 días post infección a partir de intestinos de hámster. El fenómeno de apoptosis se observó únicamente en los escólices. El presente estudio aporta evidencias de la inducción de apoptosis en el metacéstodo de *T. solium* por la radiación gamma, y contribuye a explicar los posibles mecanismos biológicos por los que la radiación gamma puede interrumpir el crecimiento del

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

metacéstodo de *T. solium*. Asimismo, se confirma que la dosis de 0.3 kGy es efectiva para inhibir el desarrollo del parásito.

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son consideradas por la Organización Mundial de la Salud como una grave amenaza para la salud humana y una fuente considerable de pérdidas económicas y sufrimiento, al afectar a personas en edad económicamente activa (WHO,1998). Dentro de ellas, la teniosis cisticercosis por *T. solium* (*T. solium*), afecta entre un 3% a un 6% de la población humana en zonas endémicas, lo que representa 50 millones de personas, de las cuales mueren anualmente 50.000 de neurocisticercosis, sobre todo en países que son considerados en vías de desarrollo, en donde la falta de higiene favorece su transmisión (Castillo y col.1996, Sotelo y col.1996). Actualmente, la presencia del binomio teniosis cisticercosis ha sido ya documentada en 75 países pertenecientes a América, Asia y África, en Estados Unidos de Norteamérica también ha sido referida en inmigrantes (WHO 2000).

La teniosis cisticercosis es una enfermedad zoonótica cuyo ciclo parasitario involucra tanto al cerdo como al hombre (Acha y col.1986, Quiroz 1989). El peligro de esta enfermedad radica en que el ser humano también puede ser huésped intermediario al ingerir huevos de tenia y que éstos darán origen al metacéstodo que frecuentemente se localiza en el sistema nervioso central ocasionando la neurocisticercosis (Sotelo y col.1996, Castillo y col. 1996, Sciutto y col. 2000).

En México, se ha referido una alta frecuencia de morbilidad de cisticercosis humana del 2% en necropsias, 8% en pacientes de hospitales de neurología y hasta de un 12% en estudios seroepidemiológicos realizados en zonas rurales (Sist. Nac. De Vig. Epidem. 1996). Existen estudios del año 1988 que señalan que aproximadamente el 1% de las muertes al año se deben a neurocisticercosis (Villagrán y Olvera, 1988). Esta parasitosis además de ser un problema importante de salud humana, repercute de manera negativa en la porcicultura nacional al ser causante de pérdidas económicas por decomiso de canales de cerdo infectadas (Acevedo, 1982).

Para controlar esta enfermedad se han considerado varias propuestas entre las que figuran el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico y tratamiento (Sis. Nac. De Vig. Epidem. 1996), llevar a cabo una adecuada inspección en los rastros (Secretaría de salud 1988), la educación sanitaria, el formular normas y leyes, como la Norma de tenosis cisticercosis (Secretaría de Salud 1994), vacunación de cerdos con el objeto de controlar esta parasitosis (Molinari y col. 1983, 1993; Sciutto y col. 1995), selección de animales resistentes a esta parasitosis para interferir con el ciclo de transmisión (Fragoso y col. 1996), y el uso de radiación ionizante aplicada en la carne de cerdo infectada para impedir la transformación del metacéstodo a parásito

TESIS CON
FALLA DE CUBRER

adulto (Verster y col. 1976, Nuñez y col. 1991, Aluja y col.1993, Secretaria de Salud 1994 y Flores 1996).

El empleo de la radiación ionizante proporciona una herramienta alternativa para el control de esta parasitosis, ya que es factible irradiar carne infectada con el metacestodo de *T.sollum*, así como sus múltiples derivados, permitiendo mejorar su calidad sanitaria y además otorgando ventajas adicionales consistentes en aumento de vida de anaquel del producto y el control de otras parasitosis como: Triquinelosis y Toxoplasmosis (IAEA, 1989). El uso de la tecnología de la irradiación está autorizado en México desde 1994 en la Norma de Irradiación de Alimentos Dosis Permitidas. Materias Primas y Aditivos Alimentarios (Secretaria de Salud, 1994).

Se sabe que la radiación ionizante, es un agente físico capaz de inducir diversos efectos en sistemas biológicos, y que su efecto primario es el de transferir energía a componentes esenciales de la célula, en especial al ADN, produciendo alteraciones denominadas mutaciones (Lindahl y col.1999). Los efectos biológicos que la radiación induce son provocados principalmente por la ruptura de enlaces químicos, lo que induce alteraciones en los seres vivos que pueden ser: mutaciones, inhibición del crecimiento, letalidad, modificaciones en el desarrollo normal e incapacidad para reproducirse. En parásitos, se han referido efectos biológicos similares (Dubey y col. 1998, Gilbert y col.1998, Nuñez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991). El periodo de manifestación de estos efectos biológicos puede darse en lapsos que van desde horas, días, meses o años (Urgen 1995).

Los efectos de la radiación ionizante sobre el metacéstodo de *T.solium* han sido descritos desde 1976 por Verster utilizando las dosis de radiación gamma entre 0.2 y 1.4 kGy. Con estas dosis observó efectos negativos en la habilidad de la larva para evaginar *in vitro*. Sin embargo, refiere los metacéstodos siguen siendo infectivos para el hámster. Con dosis mas altas, sólo se encontraron escólices en el intestino del hámster, lo cual sugiere que la radiación provoca una atrofia de células de la región del cuello, impidiéndoles formar proglótidos (Verster y col. 1976). Posteriormente, Geerts en 1989 determinó que una dosis de 0.3 kGy es eficaz para inhibir el crecimiento de la larva de *T. seginata* en el intestino del hámster y para demostrar la no infectividad, dos miembros de su grupo de investigación ingerieron larvas irradiadas con 0.4 kGy, sin que se desarrollara la tenia en sus intestinos (Geerts y col.1989).

En 1991, Nuñez y Aluja irradiaron carne de cerdo infectada con el metacéstodo de *T. solium* y encontraron que la dosis letal para el metacéstodo era de 7 kGy , basando sus observaciones en que éstos ya no podían evaginar *in vitro* y que al ser inculado en hámster ya no crecía dentro de sus intestinos (Nuñez 1991). En 1993, se refiere que una dosis de irradiación de 0.7 kGy evita el desarrollo del metacéstodo de *T. solium* encontrando que éste

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conservaba su capacidad para evaginar y únicamente se recuperaron escolices en el intestinos del hámster (Aluja y col.1993). En 1996, se empleó una dosis de 0.3 kGy y se obtuvieron escolices de un diámetro de 1 mm, estas estructuras poseían movilidad y la capacidad de fijarse a la pared intestinal. Los metacéstodos irradiados también conservaron su capacidad para evaginar *in vitro*, pero en menor proporción que los no irradiados. En hámsteres que ingirieron metacéstodos sin irradiar, se recuperaron algunas tenias desarrolladas con una longitud máxima de 21 cm. que no llegaron en ningún caso a la madurez (Flores 1996) .En el presente estudio, se empleó una dosis de 0.3kGy ya que es la dosis mínima de radiación gamma para inhibir el crecimiento del metacéstodo de *T. solium* a parásito adulto.

Los efectos inducidos al ADN por radiación ionizante, pueden ser: el efecto directo, que consiste en la interacción directa de la radiación gamma con el ADN y el indirecto, que es el resultante de la interacción de los radicales libres generados por la radiación con el ADN (Hall 1994, Friedberg 1995, Urgen 1995). Ambos mecanismos provocarán daño en el ADN, procesos que implican cambios a nivel celular en eventos tales como la síntesis de ADN y división celular (Norbury y Hickson 2001). Estos efectos estarán básicamente relacionados con la energía que sea empleada o dosis de radiación y el sistema celular al que ésta sea aplicada. Cuando las dosis son bajas o subletales, un efecto evidente es la disminución en la proporción de división celular,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

existiendo la posibilidad de poder activar mecanismos de reparación de DNA que incluso son capaces de reparar fragmentación, estos mecanismos de reparación actúan cuando la progresión normal del ciclo celular es detenida en los puntos de restricción (Lindahal y col. 1999, Norbury y Hickson 2001).

Daños celulares de mayor magnitud pueden activar procesos que eventualmente provoquen muerte celular por apoptosis, que es un tipo específico de muerte celular que requiere de un programa genético para ser llevada a cabo, a diferencia de la necrosis que no precisa de un programa genético.(Burns y col. 1999, Coultas y Strasser 2000, Hacker 2000, Verheij 2000, Flores-Pérez 2002).

El daño que la radiación ionizante produce a una célula, no es selectivo y por tal motivo los radicales libres que ésta genera pueden afectar a otras moléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos, sin embargo, es necesario destacar que el daño de mayor magnitud e importancia a nivel celular será el que se produzca en la molécula de ADN, ya que es esta la depositaria de la información genética y las mutaciones que se producen pueden ser heredadas a células hijas (Hall 1994)

La radiación puede afectar a genes que desempeñen un papel vital en procesos de homeostasis celular, sin embargo, en los parásitos poco se sabe en relación con genes encargados de regular los procesos de desarrollo y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muerte celular, y específicamente en el metacéstodo de *T. solium*, no existen referencias al respecto.

Hasta hoy día no se ha propuesto una explicación satisfactoria de los fenómenos por los cuales la radiación gamma inhibe la transformación del metacéstodo de *T. solium* a parásito adulto. Su conocimiento permitirá comprender los procesos que participan en el propio desarrollo del parásito y la inducción de muerte celular.

El propósito de este estudio es evaluar y evidenciar algunos efectos biológicos inducidos por la radiación ionizante (gamma) a nivel celular en el metacéstodo de *T. solium*.

La evidencia obtenida en el mismo permitirá recomendar con un mayor margen de seguridad la utilización de una dosis de 0.3kGy como efectiva para evitar el desarrollo del metacéstodo de *T. solium*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

Las razones por las que se llevó a cabo el presente estudio fueron:

- 1.-La tenosis cisticercosis es un problema de salud pública en México.
- 2.-La tecnología de irradiación es una alternativa efectiva para su control, de ésta condición se desprende que al evaluar los efectos biológicos que la dosis mínima de 0.3kGy induce en el metacéstodo de *T. solium*, tenga la utilidad práctica de poder recomendar esta dosis como efectiva para interrumpir el ciclo parasitario
- 3.-Se desconocía si el fenómeno de apoptosis existía o no en el metacéstodo de *T.solium*., y si este fenómeno podía ser inducido por la radiación gamma en el metacéstodo de *T. solium*. y ser el responsable de inhibir el crecimiento de la fase de metacéstodo a parásito adulto.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

OBJETIVO GENERAL

Evidenciar y evaluar algunos de los efectos inducidos por la radiación gamma Co-60 en el metacéstodo de *T.solium* .

Objetivos específicos.

1.- Evaluar el efecto de una dosis de radiación de 0.3kGy en la evaginación *in vitro* y la inoculación en hámster.

2.-Evidenciar el fenómeno de muerte celular por apoptosis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGÍA.

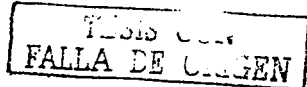
ANIMALES

Se utilizaron cincuenta y seis hámsteres dorados *Mesocricetus auratus*. Todos los animales tenían una edad de 6 a 12 semanas al inicio de cada experimento. Los hámsteres fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se obtuvieron siete cerdos infectados naturalmente con el metacéstono de *T. solium*, los cuales fueron transportados y mantenidos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Para obtener los parásitos los cerdos se sacrificaron humanitariamente con un bastón insensibilizador. Las espaldillas de cada cerdo fueron removidas, la izquierda fue irradiada con 0.3kGy y la derecha se empleo como testigo (no irradiada).

IRRADIACION

Las espaldillas infectadas fueron puestas en bolsas de plástico negras, las cuales se introdujeron en una caja de cartón, misma que se puso en una



base giratoria para garantizar la homogeneidad en la irradiación. La dosis empleada fue 0.3kGy, la cual fue previamente establecida como efectiva para inhibir el crecimiento del metacéstodo de *T. solium*.

IRRADIACIÓN

Las sesiones de radiación se llevaron a cabo en irradiador modelo Gammabeam 651 PT 60, el cual tiene una fuente de Co^{60} y se localiza en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. La dosis se determinó utilizando un dosímetro de Sulfato ferroso. Los cálculos de dosimetría se llevaron a cabo tomando en cuenta que la vida media del Co^{60} es de 5.27años.

METACÉSTODOS

Después de la irradiación solo los metacéstodos de *T. solium* en estado vesicular, fueron extraídos de la carne. Los metacéstodos de las espaldillas testigo- sin irradiar-, fueron también extraídos y depositados en PBS.

En los todos los experimentos que se describen a continuación se utilizaron metacéstodos en estado vesicular.

TESIS CON
FALLA DE CALLEN

ENSAYO DE EVAGINACION *IN VITRO*

Este ensayo se llevó a cabo con el propósito de poder determinar el grado de viabilidad de los metacéstodos de *T. solium* irradiados con 0,3kGy y testigos. Cabe aclarar que la evaginación *in vitro* es considerada como un criterio de viabilidad mas no de infectividad.

El ensayo de evaginación *in vitro*, se hizo inmediatamente después de la irradiación. En este ensayo, se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 25% de bilis porcina. Los metacéstodos fueron incubados a 37°C durante 12 hrs, en una caja de petri, el número de metacéstodos evaginados se registro. Para no confundir las cajas de petri que contenlan a los metacéstodos irradiados y testigos se identificaron previamente.

Solo se consideraron como evaginados aquellos metacéstodos que presentaron una distensión del cuello y excolex visible. Para este ensayo únicamente se utilizaron metacéstodos en estado vesicular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INOCULACIÓN EN HAMSTERES

Con la finalidad de probar que tan capaces eran los metacéstodos de establecerse y crecer en intestino de hámsteres, se emplearon ocho hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) sin importar sexos, entre 6 a 12 semanas de edad.

Los hámsteres fueron inmunodeprimidos con 4mg de depomedrol (acetato de metil prednisolona. Lab Upjohn, México) administrada por vía intramuscular, simultáneamente fueron infectados por vía oral con metacéstodos vesiculares de *T.solium*.

De los ocho hámsteres, cuatro hámsteres fueron inoculados por vía oral, cada uno con cinco metacéstodos irradiados con 0.3kGy y los otros 4 hámsteres fueron inoculados cada uno con cinco metcéstodos testigos. Hay que considerar que en este huésped, los parásitos no llegan a la madurez sexual (Verster y col. 1974; Allan y col. 1991).

INSPECCION DE LOS INTESTINOS

Los hámsteres fueron sacrificados de manera humanitaria con CO₂ a los veintiún días postinfección y los intestinos fueron obtenidos para su inspección y localización de tenias. La mucosa de cada intestino fue observada al microscopio estereoscópico para detectar a los parásitos.

TESIS CON
FALLA DE CARGEN

ENSAYO DE TUNEL

El ensayo de TUNEL, se llevó a cabo usando un kit que permite la detección de los fragmentos 3' -OH que se generan, por medio de una reacción de tipo enzimática, en la cual estos fragmentos son el sustrato para una enzima cuyo nombre es TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal), la cual cataliza la polimerización de nucleótidos sin necesitar de una cadena templado; los nucleótidos utilizados se encuentran marcados con fluoresceína. Esta metodología permite llevar a cabo la detección de fragmentación de ADN *in situ* (Lab. Roche. México) (Gavrieli y col. 1992). Las preparaciones histológicas se elaboraron utilizando metacéstodos de *T. solium* irradiados, testigos, tenias y escolices. Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4%, para ser embebidos en parafina. Posteriormente, se llevaron a cabo secciones histológicas de 5 μ m de grosor, para luego ser procesadas siguiendo la técnica recomendada por el fabricante del Kit.

Las secciones histológicas fueron examinadas a 40X y 100X. Un total de diez campos visuales fueron tomados en cuenta. Únicamente las células con un color verde fluorescente y núcleo visible fueron tomadas como positivas.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

ELECTROFORESIS DE ADN.

Los esólices y tenias obtenidas a partir de los intestinos de los hámsteres infectados con metacéstodos de *T. solium* y metacéstodos irradiados y testigos extraídos de la carne de cerdo fueron depositados en PBS y se lavaron cinco veces, para ser digeridos en amortiguador de lisis (0.1 M Na Cl , 10mM Tris ph 8,25mM EDTA, 0.5% SDS, 0.3mg/ml Proteínasa K) e incubados a 50°C durante 20 hrs., posteriormente se llevo a cabo una extracción fenol / cloroformo. El ADN fue tratado con RNasa (20 µg/ml) por un periodo de 1h a 37°C, para llevar a cabo otra extracción fenol /cloroformo y finalizar con la precipitación del ADN con etanol. La concentración de ADN fue determinada por espectrofotómetro y se depositaron 15µg de ADN por pozo, en un gel de agarosa al 1% y el ADN se tiñó con bromuro de etidio y se visualizo en un transiluminador de luz U.V y se tomaron fotografías.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar el número de metacéstodos evaginados irradiados y testigos y obtener diferencias estadísticas se utilizó la prueba de χ^2 . El número de esólices y tenias obtenidas a partir de los hámsteres 21 días post infección fueron comparadas usando la prueba estadística de Mantel Haenzel, finalmente,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

los valores obtenidos de células fragmentadas se analizaron con la prueba de Wilcoxon.

Se considero que existieron diferencias significativas en los casos que P fue menor a 0.05.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de metacéstodos evaginados obtenidos en el grupo testigo e irradiado de 7 cerdos se presentan el Cuadro 1.

La proporción de metacéstodos de *T. solium* evaginados del grupo control fue mayor ($P < 0.001$). Esto indica que una dosis de irradiación de 0.3kGy tiene la capacidad de reducir el número de metacéstodos de *T. solium* que evaginan de manera *in vitro*.

La apariencia de los metacéstodos en estado vesicular y de los metacéstodos irradiados y testigos se muestran en la Figura 1y 2.

Esta observación coincide parcialmente con lo referido por Verster en 1976 únicamente en que la radiación gamma posee, la capacidad de afectar negativamente la evaginación *in vitro* del metacéstodo, sin embargo, en el trabajo de esta autora, las dosis empleadas fueron de 20,40,60, 80, 100, 120 y 140 kRads, y los días postirradiación en que los ensayos de evaginación *in vitro* se llevaron a cabo son los siguientes:0,3,6,9,12,16, 18, 21 y 24 días, el número de metacéstodos utilizados por ensayo de evaginación fue de 20, 10 fueron destinados a irradiación con las distintas dosis y los otros 10 fueron

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Metacéstodos de *T. solium* evaginados *in vitro* testigos e irradiados.

Cerdo	1	2	3	4	5	6	7		%
Testigo	*100/150	165/165	111/160	70/80	40/40	34/40	68/70	588/703	83
Irradiado	*74/150	134/165	87/160	61/80	29/40	21/40	50/70	456/703	64

*Numero de evaginados / Total de metacéstodos ($P < 0.01$). Cada cerdo representa un experimento distinto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

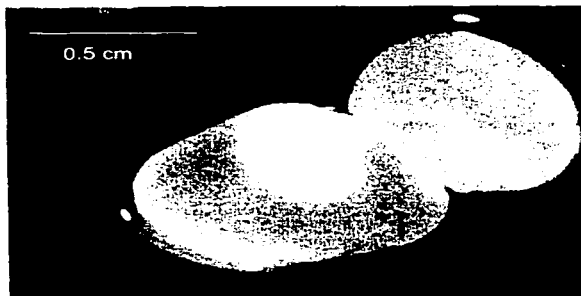


Figura 1. Metacístodos en estado vesicular

TESIS CON
FALLA DE CUBEN

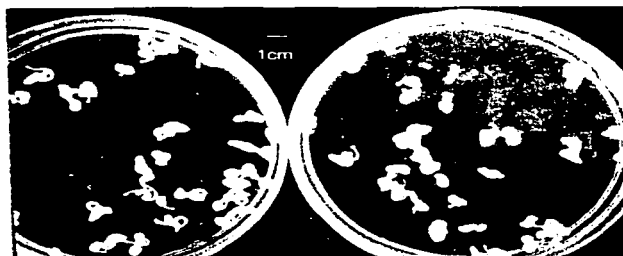


Figura 2. Metacéstodos evaginados irradiados con 0.3 KGy (izquierda) y testigos (derecha), después de permanecer 12 hrs incubados a 37°C.

TESIS CON
FALLA DE CARGEN

empleados como grupo testigo, el número total de metacéstodos sometidos al ensayo de evaginación *in vitro* fue de 170 (Verster y col. 1976).

Es necesario tener en cuenta que los metacéstodos empleados fueron obtenidos de canales altamente infectadas, y no se menciona si fueron irradiados estando en el interior de las masas musculares o se extrajeron para ser irradiados (Verster y col. 1974).

Los metacéstodos en el intervalo de tiempo que fueron conservados para llevar a cabo las pruebas de evaginación en los distintos tiempo fueron conservados a una temperatura dentro de 2 y 4 °C (Verster y col. 1974).

Un aspecto que merece atención es el hecho de que los resultados fueron expresados en porcentajes, y aunado a esto no se especifica de manera clara cual fue el criterio empleado para clasificar a un metacéstodo como evaginado (Verster y col. 1974).

Finalmente, los autores concluyen que de manera inicial la radiación no tiene efecto en la evaginación *in vitro*, en lo que se considera como tiempo cero y que a partir del día 6 post irradiación se observó una disminución del número de metacéstodos evaginados y que la disminución de la capacidad de evaginar en el metacéstodo guarda estrecha relación con la dosis de radiación gamma

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

empleada, y que el efecto de disminuir la evaginación es mas evidente cuando las dosis empleadas son de 100 kRad (1kGy) o mayores (Verster y col. 1974).

En otro estudio donde las dosis evaluadas fueron 0.5 y 0.7 kGy, se refiere que las dosis de radiación antes mencionadas no poseen el efecto de afectar negativamente la habilidad del metacéstodo de *T. solium* para evaginar, en dicho estudio se utilizo un numero total de 240 metacéstodos para la dosis de 0.5 kGy provenientes de 4 cerdos distintos y 120 metacéstodos provenientes de 2 cerdos distintos para la dosis de 0.5 kGy, también se precisa claramente el criterio que fue tomado en cuenta para clasificar al metacéstodo como evaginado: "Se consideraron como evaginados aquellos metacéstodos que tuvieron una distensión completa del cuello y donde los ganchos y las ventosas fueron claramente visibles con una lupa" (Aluja y col. 1993). Se menciona que el numero de metacéstodos evaginados irradiados con 0.7 kGy y los testigos fueron prácticamente similares y que en el caso de los irradiados con 0.5 kGy el 74% de los metacéstodos evaginó y para el grupo testigo la cantidad de evaginados fue de 82% (Aluja y col. 1993).

Algunos factores, a los que se les pudiera atribuir la diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo en comparación a otros (Verster y col. 1974, Aluja y col. 1993) son el grado de afectación del parásito provocado por la respuesta inmune del huésped (Aluja y Vargas 1988; Pérez-Torres y col. 2002), edad de infección, manejo del parásito durante los experimentos, fase de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

desarrollo pudieron haber afectado la capacidad del metacéstodo para evaginar o factores de tipo metodológico como pueden ser diferencias en los criterios para considerar al metacéstodo como evaginado, variabilidad en la cantidad de metacéstodos empleados, cambios en la técnica empleada para llevar a cabo la prueba de evaginación y divergencias en el análisis de los resultados obtenidos pueden ser los causantes de la diferencia de resultados y de las interpretaciones elaboradas a partir de los mismos, por lo cual se recomienda llevar a cabo estudios en donde estos factores se controlen.

En todos los experimentos de irradiación únicamente se utilizaron metacéstodos de *T. solium* en estado vesicular.

Cuando la radiación gamma es aplicada a sistemas biológicos -como las células- se puede producir daño al ADN básicamente de dos maneras: directa, que es la resultante de la interacción de la energía propia de las radiaciones con el ADN, y de manera indirecta cuando el daño al ADN es provocado por los radicales libres que se generan en el proceso de irradiación (Friedberg y col. 1995; Norbury y Hickson 2001; Jackson 2002), es precisamente la molécula de ADN el blanco más importante para la inducción de los efectos biológicos que la radiación ionizante puede causar en los seres vivos ya que es esta molécula es la encargada de transmitir la información genética, por lo que cualquier mutación que sea provocada en ella podrá dar como resultado modificaciones en el desarrollo y probablemente la muerte.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La radiación provoca dobles rupturas en las hebras de ADN; en respuesta a ello, diversos eventos ocurren a nivel celular, utilizando mecanismos específicos de reparación de ADN, deteniendo la progresión normal del ciclo celular ó induciendo muerte celular por apoptosis (Coultas y Strasser 2000; Noubury 1992; Noubury y Hickson 2001; Jackson 2001; 2002), que es un tipo específico de muerte que precisa de un programa genético para poder ser llevada a cabo (Hale 1996; Coultas y Strasser 2000; Flores-Pérez 2002). El proceso de apoptosis ha sido descrito en varios organismos, incluyendo a parásitos (Welburn y col. 1997; Narisuden y col. 2001) y se considera como altamente conservado desde un punto de vista evolutivo (Henson y col. 2001). Todas estas estrategias tiene como finalidad la preservación de la integridad y estabilidad del material genético, para evitar que las mutaciones puedan ser heredadas (Coultas y Stresser 2000; Jakson 2002).

Las rupturas de la doble hebra de ADN, son probablemente las lesiones mas peligrosas para el ADN (Jakson 2002), esto se debe a que si ambas hebras son afectadas, los mecanismos de reparación de ADN, que requieren de una cadena no afectada para funcionar, no pueden reparar el ADN de una manera adecuada. El potencial que poseen las dobles rupturas de las hebras de ADN para provocar mutaciones en el sitio de la lesión y la reparación incorrecta de las mismas puede dar lugar a translocaciones cromosómicas, que pueden

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

provocar cromosomas dicéntricos o fragmentos cromosomales acéntricos (Sadaie y col. 1989; Ludwików y col. 2002).

Cuando los sistemas de reparación y la señalización de daño al ADN son afectados, la célula o el organismo completo pueden ser no viables.

En algunos casos, las mutaciones en el ADN son toleradas pero causan anomalías en el desarrollo, degeneración de órganos y crecimiento descontrolado de algunos tejidos (Lindahl y Wood 1999; Jakson 2002).

La Inducción de apoptosis con radiaciones gamma ha sido documentada (Norbury y Hikson 2001; Radford 2002). La progresión del ciclo celular puede ser detenida por la radiación gamma en las fases G1-S y G2-M (Norbury 1992; Norbury y Hikson 2001). Se especula que los mecanismos de reparación de ADN que están presentes en el metacéstodo son eficientes para poder de manera parcial reestablecer la capacidad de evaginar, pero no para dirigir el desarrollo del metacéstodo a parásito adulto. Esto se puede deber a que posiblemente algunos genes, de vital importancia para la proliferación celular, diferenciación y metabolismo, sean afectados de una manera considerablemente grave.

Los metacéstodos de *T. solium* irradiados y testigos se recuperaron de los intestinos de hámster 21 días post infección. En el grupo irradiado, únicamente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

se recuperaron escólices de 1mm de diámetro como se observa en la Figura 3. En el grupo testigo se obtuvieron tenias que estaban adheridas al intestino Figura 4.

Es importante destacar que el número de escólices recuperados a partir de los hámsteres alimentados con metacéstodos irradiados fue inferior al número de tenias recuperadas en el grupo testigo (Cuadro 2).

En todos los casos, el crecimiento de los escólices se detuvo en la región del cuello; en esta zona se ha descrito la presencia de tejido germinal (Merchant y col. 1997) el cual podría ser afectado por la radiación gamma.

Las observaciones del presente trabajo indican que la radiación inhibe el crecimiento normal del parásito de la fase larvaria al estado adulto. Esta observación esta en concordancia con lo referido al utilizar dosis de 20 krad y 40 krad, ya que a los 21 días post irradiación e inoculación en hámsteres se produjo una disminución en el número de hámsteres infectados (Verster y col. 1976), sin embargo para este periodo no se reporta el número de tenias encontradas y las estructuras consistentes en escólices fueron observados en el intestino de hámsteres a los 25 días pos inoculación únicamente en los hámsteres infectados con metacéstodos irradiados con 40 Krad (Verster y col. 1976). En ese estudio, los escólices no fueron medidos argumentando que: "Fue difícil montarlos en posición lateral" (Verster y col. 1976).

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR



Figura 3. Escolices obtenidos de intestinos de hámsteres 21 días post infección utilizando metacestodos irradiados con 0.3kGy.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 4. Tenias obtenidas a partir del intestino de un hamster 21 días post infección, inoculado con metacéstodos testigo

TESIS CON
FALLA DE SCREEN

Cuadro 2. Tenias y escólices recuperados en intestinos de hámsteres 21 días post infección con metacéstodos de *T. solium* testigo e irradiados con 0.3 kGy.

Cerdos	Número de <i>tenias</i> encontrados en cada uno de los cuatro hámsteres (testigo)	* Número de escólices encontrados en cada uno de los cuatro hámsteres (irradiados)
1	1,2,5,3	1,0,0,2
2	1,2,5,3	3,3,1,5
3	5,4,5,5	2,2,1,2
4	1,2,2,5	2,1,0,1
5	3,3,5,5	1,0,1,3
6	0,2,3,1	1,2,2,2,
7	3,4,5,3	0,0,3,4
	§71/140	†45/140
%	±50.7	±32.14

*Cuatro hámsteres fueron infectados por vía oral cada uno con 5 metacéstodos .

§ Numero total de tenias recuperadas / numero total de metacéstodos no irradiados administrados.

Tenias recuperadas únicamente en hámsteres infectados por vía oral con metacetodos sin irradiar.

† Numero total de escólices recuperados / Numero total de metacéstodos irradiados inoculados.

En hámsteres infectados oralmente con metacéstodos irradiados con 0.3 kGy . únicamente se recuperaron escólices.

‡Prueba de Mantel Haenzel. Existió diferencia significativa ($P < 0.0016$).

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo descrito en 1996, estudio en el cual se prueban dosis de 0.3 kGy (Flores 1996) y con la dosis de 0.7kGy (Aluja y col. 1993).

Estas observaciones parecen indicar que la radiación no solo disminuye la capacidad de evagianción del metacéstodo, sino que también puede afectar la capacidad de crecimiento de los escólices en el intestino de hámsteres.

Existe la posibilidad de que algunos escólices mueran antes de los 21 días y en consecuencia puedan ser excretados en la materia fecal o digeridos por el huésped.(Verster y col. 1976), sin embargo una posibilidad mas simple no es considerada la cual radica en que no necesariamente todos los metacéstodos inoculados crecen.

Ha sido propuesto por algunos autores que la radiación inhibe la capacidad de la células para dividirse y originar nuevos proglótidos (Verster y col. 1976).Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que la ausencia de crecimiento puede ser atribuida a un proceso de apoptosis.

Es importante considerar que la pérdida de la capacidad para formar colonias solo implica que las células dejen de dividirse y no que dejen de existir (Held 1997).

TESIS CON
FALLA DE CRECIMEN

Con la finalidad de explicar los posibles mecanismos biológicos involucrados en afectar de manera negativa la capacidad de evaginar *in vitro* del metacéstodo, así como el efecto que tiene la radiación en su desarrollo de larva a parásito adulto, en el modelo de hámster. Se decidió detectar el fenómeno de apoptosis por dos metodologías ensayo de TUNEL y electroforesis.

La fragmentación del ADN fue evaluada con el ensayo de TUNEL. Esta técnica permite la detección de extremos 3' del ADN. En metacéstodos irradiados y no irradiados, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la cantidad de células fragmentadas, inmediatamente después de irradiar (Figura 5 AB).

El hecho de que células positivas sean detectadas por TUNEL tanto en metacéstodos irradiados y no irradiados puede ser atribuido a las características específicas de la muerte por apoptosis, la cual está genéticamente programada. La muerte celular por apoptosis no es inducida únicamente por radiaciones gamma, sino que este proceso también puede ocurrir de manera fisiológica como parte del desarrollo normal en los organismos (Flores-Pérez 2002, Hacker 2002).

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

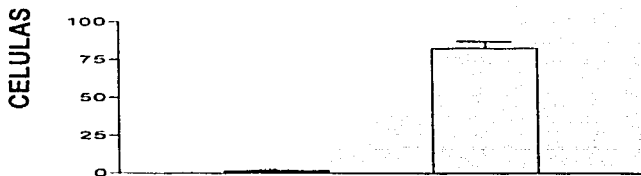
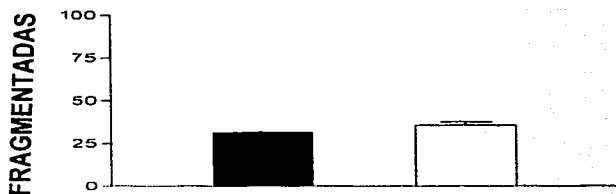


Figura 5A,B. Células fragmentadas detectadas por TUNEL \pm MEE. A metacístodos de *T. solium* inmediatamente después de irradiar. ($P=0.1484$) testigo (negro) irradiado (blanco). B. Células fragmentadas observadas en Tenias (testigo barra negra) y escolices (irradiado barra blanca) obtenidas de hámsteres 21 posteriores a la infección. Diferencia estadística significativa ($P=0.01$).

El ensayo de TUNEL es incapaz de discriminar entre la apoptosis fisiológica y la apoptosis no fisiológica.

En las tenias obtenidas 21 días post infección a partir de metacéstodos sin irradiar, no se detectó marcaje con TUNEL, lo que indica la ausencia de fragmentación de ADN (Figura 6). Por el contrario, en los escólices obtenidos a partir de las larvas irradiadas se encontró una cantidad considerable de células con ADN fragmentado (Figura 7). En principio se aceptó que la radiación ionizante tiene la capacidad de inducir apoptosis de manera relativamente rápida (períodos de unas horas) posterior a la radiación, incluso se propuso una clasificación para líneas celulares murinas, las cuales se clasificaron en tres categorías: células de muerte rápida, que son las que mueren entre 1 y 2 h, intermedias las cuales presentan apoptosis en un período entre 13 –17 h y por último las células de muerte lenta, que presentan apoptosis en un período post irradiación de 24hrs o más. Este fenómeno de apoptosis lenta se denomina apoptosis retrasada (Held 1997; Verheij y Bartelink 2000).

En algunos sistemas biológicos, la apoptosis puede ocurrir 20 días después de la irradiación. Los mecanismos por los cuales se retrasa no están comprendidos hasta la fecha. Sin embargo, se ha documentado la participación de factores como: el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor epidermal de crecimiento, en el proceso de retardamiento (Verheij y Bartelink 2000).

TESIS CON
FALLA DE C. TEN



Figura 6. Sección histológica practicada en una tenia (100X), en la cual se llevó a cabo el TUNEL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

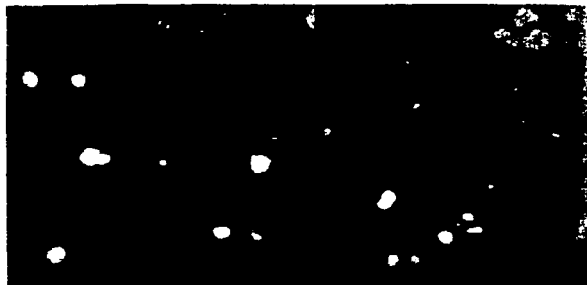


Figura 7. Celulas positivas a TUNEL observadas en un escolax (100X)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es necesario destacar que el proceso de apoptosis puede ocurrir en diversos periodos (minutos, horas y hasta días); y dentro de este lapso las células pueden experimentar una o varias divisiones (Held 1997; Verheij y Bartelink 2000). Una posible explicación a las diferencias encontradas con relación al número de células fragmentadas por el ensayo de TUNEL en los escolices obtenidos después de 21 días de la infección, puede ser atribuido al fenómeno de apoptosis retrasada.

La fragmentación de ADN en un patrón típico de escalera o nucleosomal en fragmentos de 200 pb y sus múltiplos, que se visualiza en geles de agarosa, es considerada como una característica distintiva de apoptosis.

El patrón nucleosomal o de escalera fue visualizado únicamente en el ADN de los escolices, como se observa en la Figura 8.

El ensayo de TUNEL fue positivo para los escolices y los geles de agarosa mostraron el patrón típico de fragmentación de ADN en escalera, criterio que puede ser utilizado para diferenciar necrosis de apoptosis, hay que tomar en cuenta que la apoptosis se diferencia de la muerte por necrosis por exhibir una condensación de cromatina en media luna o herradura, (Hacker 2000) además presenta una fragmentación de ADN consistente en múltiplos de 180-200 pb, que al ser visualizado en un gel de agarosa da la apariencia de una escalera. En la apoptosis no existe un proceso inflamatorio, se forman las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

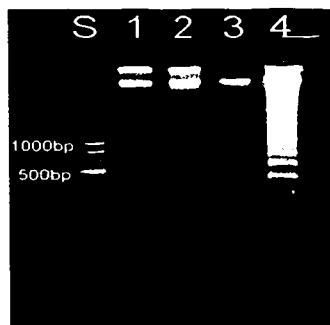


Figura 8. Fragmentación nucleosomal de ADN. (1) ADN de metacéstodos testigo (2) ADN de metacéstodos irradiados con 0.3 kGy (inmediatamente después de irradiar) (3) ADN obtenido de tenias extraídas de intestinos de hámsteres 21 días postinoculación con metacéstodos testigo. (4) ADN de escolices obtenidos 21 días post inoculación con metacéstodos irradiados. Marcadores de peso molecular, línea S. los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

vesículas conocidas como cuerpos apoptóticos. La apoptosis a diferencia de la necrosis puede darse en condiciones fisiológicas y patológicas(Kaufman 1997, Flores-Pérez 2002).

El patrón de fragmentación nucleosomal es un indicador de apoptosis y ésta a su vez es un efecto biológico asociado a la radiación.

El patrón de fragmentación de ADN obtenido a partir de los escólices coincide con el observado en *Leishmania amazonensis* (Barcinski y DosReis 1999), lo cual sugiere que el fenómeno de apoptosis es altamente conservado entre organismos uni y multicelulares.

Actualmente no existen estudios que caractericen a la maquinaria genética encargada de dirigir procesos vitales propios del metacéstodo de *T. solium* como lo son: la división celular, diferenciación y apoptosis. Los sistemas de señalización involucrados en mecanismos de reparación de ADN pertenecientes al metacéstodo de *T. solium* son un aspecto pendiente de estudiar. El entendimiento de estos procesos será necesario para comprender la biología básica del parásito, lo que permitirá de diseñar estrategias efectivas para el control y erradicación del mismo, asimismo se podría utilizar al parásito como un modelo en radiobiología.

TESIS CON
FALLA DE . GEN

Una aplicación práctica de los resultados registrados, se encuentra apoyada por el hecho de que la tecnología de irradiación puede ser utilizada para controlar diversas enfermedades parasitarias que constituyen un riesgo para la salud y causan pérdidas económicas (Urbain 1986, Farkas 1988; Northrop-Clewes y Shaw 2000). Se confirmó que la radiación gamma inhibe el desarrollo del metacéstodo de *T. solium* a parásito adulto. Por ello, se puede recomendar como una alternativa de control para esta enfermedad (Verster y col. 1976; Aluja y col. 1993; Flores 1996) que persiste aún en países en vías de desarrollo (Sciutto y col. 2000). Sin embargo, esta alternativa tecnológica que permite lograr una descontaminación de los alimentos, debe ser usada en conjunto con otras propuestas como: vacunación en cerdos, diagnóstico de portadores de tenia y campañas educativas (Sarti y col. 1997; Sciutto y col. 1998; Toledo y col. 1999). Alternativas que en su conjunto, podrán contribuir al control y futura erradicación de esta parasitosis.

TESIS CON
FALLA IN

CONCLUSIONES

Una dosis de 0.3 kGy reduce la cantidad de metacéstodos evaginados *in vitro*. Los metacéstodos irradiados con esta dosis son incapaces de crecer a parásito adulto.

El presente estudio aporta evidencias que indican la presencia del fenómeno de muerte celular por apoptosis, asimismo, se propone que ésta puede ser inducida por la radiación gamma en los metacéstodos de *T. solium*.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

PRESPECTIVAS

Una aplicación práctica de los resultados obtenidos en el presente estudio se podría centrar en la propuesta de construir un irradiador comercial que diera servicio a una comunidad y que pudiera estar instalado en las cercanías de rastros y centros de distribución de cárnicos, ya que el proceso de irradiación podría ser empleado en combinación con la inspección de rutina, aunque habría que considerar el costo inicial de la instalación.

Existen razones inherentes al impacto de la enfermedad, como es que esta parasitosis ha sido reportada en alrededor de 70 países (WHO 2000), incluso su importancia ha sido reconocida ya en la propuesta existente desde el año 2000 para declararla como enfermedad de notificación obligatoria a nivel mundial.(WHO 2000). En Latinoamérica, se estima que existen alrededor de 400000 individuos que padecen la infección y son asintomáticos, asimismo se informa que en Estados Unidos de Norteamérica se diagnostican aproximadamente 1000 casos nuevos por año, principalmente en inmigrantes. (Anil Khosia, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Alrededor del mundo se menciona que anualmente mueren 50000 personas a causa de neurocisticercosis, que es considerada como la parasitosis más frecuente del Sistema Nervioso Central (WHO2000).

En México, existen datos en los cuales se menciona a la neurocisticercosis como la causante del 1% de muertes que ocurren y se señala que el panorama de la enfermedad no ha variado en los últimos años.

El número de muertes en México en el año 2000 fue de 437667, de las cuales 18599 se debieron a enfermedades infecciosas y parasitarias- cabe destacar que esta categoría ocupa el primer lugar en nuestro país-, según datos de la Organización Mundial de la Salud, el 1% equivale a 4376 muertes aproximadamente(<http://www.who.int/research/en>).

En México y Brasil, 90 millones de dólares son destinados anualmente para cubrir los costos de curación de pacientes con neurocisticercosis y en Estados Unidos de Norteamérica se invierten por año para la curación de los pacientes de neurocisticercosis es de 9 millones de dólares (Anil Khosla, 2002); tomando en cuenta la erogación que en la actualidad lleva a cabo México probablemente si sería factible contar con irradiadores a nivel comercial que redujeran la inversión en los enfermos de neurocisticercosis y las pérdidas económicas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El impacto que la cisticercosis porcina tiene en México, con respecto a pérdidas monetarias, debidas al decomiso de cerdos en rastro y al decremento en su valor al momento de venta, es desconocido con exactitud, existen cifras en las cuales, las pérdidas por decomiso se han cuantificado en 43 310 526 dólares, sin embargo estas cifras se calcularon para el año de 1980 (Acevedo 1982).

La cantidad de cerdos portadores del metacéstodo que existen en México se desconoce, pero se ha documentado que alrededor de un 30% de la producción porcina es sacrificada en rastros no oficiales (Martínez 1999). En los rastros oficiales se ha informado de una frecuencia de entre 0.004 a un 12% para la cisticercosis porcina en los últimos 10 años (Martínez 1999). Hay información que señala una frecuencia hasta de un 13% en cerdos que habitan zonas marginadas del país y que son mantenidos en condiciones de semiconfinamiento (Aluja y col. 2000)

Los métodos para detección de cerdos parasitados consistentes en inspección de lengua al momento de la adquisición y la inspección sanitaria no son completamente efectivos (Aluja y col. 2000)

La radiación puede ser aplicada a canales porcinas infectadas, lo que implica que el ciclo parasitario sea interrumpido. La importancia de esto ha sido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ya reconocida por los grupos de investigación que trabajan en el diseño de vacunas contra la cisticercosis cuyo blanco principal es vacunar al cerdo, con el propósito de poder interrumpir el ciclo parasitario, estrategia que podría permitir un control y eventual erradicación del parásito.

Con una dosis de 0.3 KGy no solo se podría controlar al metacéstodo de *T. solium* sino a otros patógenos tales como: *Salmonella typhimurium*, *Staphilococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Taenia saginata*, *Entamoeba histolitica* , *Fasciola hepática* (Farkas 1998).

La tecnología de irradiación puede ser aplicada a una gran variedad de alimentos como lo son : carnes (pollo, res, cerdo) , huevo, frutas , verduras, bebidas como el te, con el propósito ya sea de eliminar algún patógeno específico o de aumentar su vida media de anaquel (Urbain 1986, Farkas 1998).

Con otros propósitos también se utiliza esta tecnología como pueden ser el irradiar bebidas alcohólicas con dosis de 0.1kGy , específicamente el brandy en barricas de roble para provocar un efecto de conferirle el sabor como si éste hubiera sido añejado por 3 años (Urbain 1986), se puede aplicar también esta tecnología a dietas para animales de laboratorio ya que ningún otro procedimiento garantiza el grado de esterilidad que se requiere en estas raciones para ser administradas a animales libres de patógenos, la utilización en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dietas para enfermos hospitalizados o inmunocomprometidos es también otra aplicación (Urbain 1986).

En la industria, posee diversas aplicaciones como puede ser la esterilización de material de laboratorio, cirugía, curación y cosméticos.

Se propone continuar con estudios moleculares cuya finalidad sea caracterizar el fenómeno de apoptosis en el metacéstodo de *T. solium*, con el objetivo de emplear esta información en el diseño de terapias efectivas y técnicas diagnósticas certeras en contra del binomio teniosis cisticercosis.

En este trabajo, se contribuye al conocimiento de la biología del parásito al aportar las primeras evidencias de la existencia del efecto biológico de apoptosis inducidas por la radiación gamma en el metacéstodo de *T. solium*, esto en virtud de que hasta la fecha la existencia de apoptosis no había sido ni documentada ni propuesta en el metacéstodo de *T. solium*.

La necesidad de buscar nuevas terapias antiparasitarias, destinadas a combatir agentes parasitarios que afectan a humanos, animales de compañía, animales de importancia económica ha sido ya identificada, razón por la cual la búsqueda de genes candidatos que sirvan a este propósito específico de diseñar terapias y métodos diagnósticos ha sido ya iniciadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Actualmente los genomas de organismos tal como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* han sido ya totalmente secuenciados, algunos parásitos patógenos de interés económico están en proceso de serlo tales como: *Toxoplasma gondii*, *Tripanosoma cruzi*, *Criptosporidium parvum*, entre otros (Gutiérrez 2000).

Otro aspecto que debe ser mencionado consiste en la utilización del metacéstodo de *T. solium* como un modelo en radiobiología, ya que si bien es cierto que la dosis de 0.3kGy es baja, específicamente para la utilización en alimentos (Urbain 1986, Farkas 1998), la dosis de 0.3kGy es una dosis demasiado elevada al ser comparada con la dosis letal para un ser humano que es de 5Gy, para alguien con un peso de aproximadamente 70 kg, por lo cual se propone investigar los mecanismos encargados de conferirle radioresistencia al parásito que pudieran estar basados en la presencia de mecanismos antioxidantes sumamente eficientes o en sistemas de reparación de ADN efectivos.

En síntesis, la solución al problema de teniosis cisticercosis es compleja rodeada de diversos factores económicos, sociales, educacionales y culturales, sin embargo, la radiación puede ser considerada como una alternativa. El poner o no plantas de irradiación en territorio nacional no es una decisión que únicamente compete a la ciencia, así como la solución del problema.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por ello, es que la futura erradicación de la teniosis cisticercosis dependerá de diversos sectores como son los miembros de la comunidad científica, las autoridades de salud, gobierno y empresarios, que al involucrarse y trabajar en conjunto serian capaces de lograr tan anhelado fin.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LITERATURA CITADA

Allan JC, García-Domínguez C, Craig PS , Rogan MT, Lowe BS and Flisser A
Sexual Development of *Taenia solium* in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol*
85:573-576.1991.

Acevedo HA.: Economic Impact of Porcine Cisticercosis in: Cysticercosis
Present State of Knowledge and Perspectives eds: Flisser A., Wilms K.,
Laclette JP., Larralde C., Ridaura C. and Beltrán F., 63-68 *Academic Press* New
York. 1982.

Aluja A S de, Núñez J F y Villalobos A N.: Efecto de la irradiación gamma Co60
sobre el metacéstodo de *Taenia solium*. *Vet. Mex.* 24:297-310 .1993.

Aluja AS de, Vargas G.: The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet*
Parasitol 28:65-77.1998.

Aluja AS de, Villalobos AN.:Cisticercosis por *Taenia solium* en credos de
México. *Vet Mex* 31:239-244. 2000.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Barcinski MA, Dos Reis GA.: Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Braz J Med Biol Res* 32:395-401.1999.

Castillo M, Salgado P, Rojas R, Sotelo J, Sánchez J, and Mukherji SK.: Unusual imaging manifestations of neurocysticercosis. *Int J of Neuroradiology* 2:168-175. 1996.

Coultas L, Strasser A .: The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 5: 491-507.2001.

Dubey JP, Thayer DW, Speer CA, Shen SK.:Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int J Parasitol* 28:369-375.1998.

Farkas J . Irradiation as a method of decontaminating food. *Int J Food Microbiol* 44:189-204.1998.

Flores FI.: Efectos de dosis bajas de radiación gamma Co-60 sobre el metacéstodo de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 1996.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Flores-Pérez FI.: ¿Es la muerte importante para la vida? *Vet Mex.* 33:161-171.

2002.

Fragoso G, Mellor A, Lamoyí E, Hernández M, Lomeli C, Govezensky G, Sciuotto E.: Increase Innate Resistance *T. crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa2 Transgenic Mice. *Parasitology* 112:119-24. 1996.

Friedberg E. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Pres. USA. 1995.

Gutierrez JA.: Genomics: from novel genes to new therapeutics in parasitology. *Int J Parasitol* 30:247-252. 2000.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson A.: Identification of programmed Cell death in situ specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biology* 119: 493-501. 1992.

Geerts S. and Borchgrave J.: Suceptibility of *Taenia saginata* metacestodes to gamma irradiation and shelf-life extension of the treated meat in: Second FAO/IAEA Research Coordination Meeting (RMC on the Use of irradiation to control infectivity of Food-Borne Parasites, 25 and 26 FAO/ IAEA Bangkok. Thailand 1989.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Gilbert JM, Fuller AL, Scott TC, McDougald LR.: Biological effects of gamma r-irradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia). *Parasitol Res* 84:437-441. 1998.

Hacker G.: The morphology of Apoptosis. *Cell Tissue Res* 301:5-17. 2000.

Hale J, Smith A, Sutherland C, Stoneman A, Longthorne L, Culhane C, Williams Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236:1-26. 1996.

Hall F.: Radiobiology for the Radiologist. Lippincott-Raven USA, 1994.

Heald K. : Radiation-induced apoptosis and its relationship to loss of clonogenic survival. *Apoptosis* 2:265-282. 1997.

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA.: Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11:795-805. 2001.

Höglund E, Blomquist E, Carlsson J, Stenerlöw B.: DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int J Rad Biol* 76:539-547. 2000.

Jackson SP.: Detecting, signaling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc. Trans* 29 :655-661. 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Jackson SP.: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 23: 687-696 .2002.

International Atomic Energy Agency: Workshop on the use of irradiation to ensure hygienic quality of food. Wageningen, The Netherlands, 14-25 March, 1988. *Food irradiation Newsletter*, 13: 24-33.1989.

Kosla A. Cysticercosis , CNS, 2002 (<http://www.emedicine.com/radio/topic203.htm>).

Lindahl T and Wood R.: Quality control by DNA repair *Science*. 286: 1987-1905 .1999.

Ludwików G, Yun Xiao, Hoebe RA, Franken NAP, Darroud F, Stap J, Van Oven CH, Van Noorden CJF, Aten JA.: Induction of chromosome aberrations in unirradiated chromatin after partial irradiation of cell nucleus. *Int J Radiat Biol* 78:239-247.2002.

Merchant M, Corella C, Willms K.: Autoradiographic Analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *J Parasitol* 3:363-367.1997.

Molinari JL, Meza R, Tato P.: *Taenia solium*: Immunity in hogs to cysticercosis. *Exp. Parasitol* 55: 340-357.1983.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Molinari JL, Soto R, Talo P, Rodríguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A.: Immunization against porcine cysticercosis in a endemic area in Mexico. A field and laboratory study. *Am J of Trop Med and Hygiene* 49: 502-512. 1993.

Nasrudeen A, Tan K, Singh M, Yap E. : Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* 123:235-246.2001.

Northrop-Clewes CA, Shaw C.: Parasites. *Br Med Bull* 56:193-208.2000.

Norbury CJ.: Cellular Responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-201.2001.

Norma Oficial Mexicana NOM-21-SSA., para La Vigilancia Prevención y Control del Complejo Teniosis Cisticercosis en el Primer Nivel de Atención Médica. Diario Oficial de la Federación. Tomo DXV No. 15 México D.F.1991.

Núñez JF.: Efecto letal de la irradiación gamma sobre el metacéstodo de la *Taenia solium* en carne de cerdo. Tesis de Maestría. *Fac. Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.1991.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

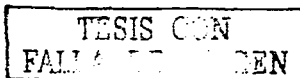
Perez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, Aline S.: *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res* 88:150-152.2002.

Quiroz R H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. *Limusa*, México D.F 1984.

Sadaie T and Sadaie Y Rad-2-dependent repair of radiation -induced chromosomal aberrations in *Caenorhabditis elegans*. *Mut Res* 218:25-31.1989.

Sari E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M,Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bonfman M, Wijeyaratne P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 56:127-132.1997.

Sciutto E, Aluja AS, Fragoso G, Rodarte L F, Hernandez M, Villalobos NM, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezenzky T, Díaz S, Larralde C.: Immunization of pigs against *Taenia solium* Cyscercosis: Factors related to effective protection. *Vet Parasitol* 60: 53-67.1995.



Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A S de, Vargas L, Larralde C.: *Taenia solium* disease in humans and pigs : an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 15:1875-1890.2000.

Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Kubli-Garfias C, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E.: Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 67:2522-2530.1999.

Secretaría de Salud. Norma de Irradiación de Alimentos y Dosis Permitidas en alimentos, Materiales Primas y Aditivos Alimentarios (publicado en el Diario Oficial de la Federación, el 23 de marzo de 1994).

Secretaría de Salud. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios (publicado en le Diario Oficial de la Federación el 18 de enero de 1988).

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Num 43, Vol V. 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sotelo J., Del Bruto O. and Roman G.: Cysticercosis. In current Clinical Topics in Infections Diseases. Remington J. S. and Swartz M.N. (eds) *Blackwell Sci.* Boston Ma.1996.

Urbain WM. Food irradiation. *Academic press*, Orlando.pp.1-328 .1986.

Ürgen K.: Biological Radiation Effects. *Springer-Verlag* U.K, 1995.

Verheij M, Bartelink. : Radiation-induced apoptosis .*Cell Tissue Res* 301:133-142. 2000.

Verster A.: The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata* . *Onderstepoort J Vet Res* 41:23-28.1974.

Verster A, Du Plessis T A, Der Heever LW.: The effect of gamma radiation on the cysticerci of *Taenia solium*. *Onderstepoort J Vet Res* 43: 23-26.1976.

Villagrán J, Olivera JE.: Cisticercosis humana Estudio Clínico y Patológico de 481 casos de autopsia. *Patologia* 26: 149-156 .1988.

Welburn S, Barcinski M.A, Williams G.: Programmed Cell death in trypanosomatids. *Parasitol Today* 13:22-26.1997.

TESIS CON
FALLA DE MEN

World Health Organization. Food Irradiation, A techniques for preserving and improving the safety of food. WHO, Geneva, Swizerland. 1988.

World Health Organization. Aproposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. WHO, 78(3).2000.

World Health Organization <http://www.who.int/research/en> . Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, con respecto a causas de muerte para el año 2000(<http://www3.who.int/whosis/mort/table1-process.cmf>)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PUBLICACIONES

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Parasitology
Research**

Form 3

Springer

(Date)

22.10.2002

To

Aline S. de Aluja
Dept. de Patología
Facultad de Med. Vet. y Zootécnica
Universidad Nac. Autónoma de México
CP 04510 México D.F. México

Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your contribution

Author(s): Ivan Flores-Pérez et al. No -209-02

Title: **Apoptosis induced by gamma irradiation on the Taenia solium metacestodes**

has been accepted for publication in Parasitology Research.

Your manuscript will go through the normal copy-editing process. If the corrections are extensive, the paper will be returned to you for outstanding questions to be resolved and if necessary for you to have the paper retyped.

Sincerely Yours

Parasitology Research
Prof. Dr. H. Mehlhorn
Institut für Zoophysikologie,
Zellbiologie und Parasitologie
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf (Geb. 2005, 60470)
D-40225 Düsseldorf, Germany

P.S. Please send me the ms on a computer disc. As soon as possible.
Thank you very much.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Parasitology Research

© Springer-Verlag 2003

DOI 10.1007/s00436-002-0819-9

Original Paper

Apoptosis induced by gamma irradiation of *Taenia solium* metacestodes

Ivan Flores-Pérez · Gladis Fragoso Gonzalez · Edda Scuitto · Aline S. de Aluja (✉)

A. S. de Aluja
Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, México D.F., México

I. Flores-Pérez
Departamento de Mortología, Laboratorio de Investigación en Biología Tisular de la Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, México D.F., México

G. F. Gonzalez · E. Scuitto
Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, México D.F., México

✉ A. S. de Aluja
Phone: +52-5-6225958
Fax: +52-5-6225958
E-mail: aline@servidor.unam.mx

Received: 20 August 2002 Accepted: Accepted: October 2002

Abstract. Gamma irradiation of food is considered a possible approach to control food-borne diseases. In cysticercosis, previous studies have shown that irradiating (with 0.3 kGy) pork infected with *Taenia solium* larvae completely inhibits growth of the parasite. This study was conducted to evaluate the mechanisms that induce the effect of gamma irradiation on metacestodes of *T. solium*. Metacestodes were obtained from several infected pigs and irradiated with a dose of 0.3 kGy. The viability of the metacestodes was evaluated by their capacity to evaginate in vitro and in vivo development to tapeworms after they were orally infected into prednisolone-treated golden hamsters. Using the typical ladder pattern of fragmented DNA and the TdT-mediated DUTP-nick-end labeling assay, apoptosis was evaluated in metacestodes after irradiation and in the scolices and tapeworms recovered

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

from infected hamsters at 21 days post-infection. Apoptosis was observed in the structure of scolices obtained from hamsters at 21 days post-infection with irradiated metacercariae. This study provides evidence of the existence of apoptosis in the irradiated metacercariae of *T. solium* and helps elucidate the possible mechanisms that are involved when gamma irradiation inhibits the normal development of the *T. solium* metacercaria into the adult worm.

Introduction

World-wide, the contamination of food with pathogenic microorganisms like bacteria and parasites constitutes a health risk that involves suffering of the population, economic losses in relation to medical care and loss of productivity (Farkas 1988).

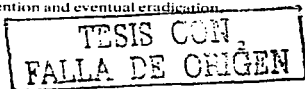
Considering the relevance of parasitic diseases related to food, preventive programs should receive a high priority from governments and private industry. The development and use of food-processing technologies, like food irradiation, are essential to eliminate or prevent food-borne diseases (Urbain 1986; Farkas 1988).

The effects of food irradiation have been studied in fresh and frozen meat, poultry and seafood since the late 1940s (Urbain 1986).

Irradiation or radiation processing is the exposure of food to ionizing radiation (gamma rays from ^{60}Co or ^{137}Cs high-energy electrons, or X-rays) in order to obtain either a desired benefit for the control of food-borne pathogens, like parasites and bacteria, or an extension of shelf-life of different products, like fruits and vegetables (Urbain 1986; Farkas 1988; Northrop-Clews and Shaw 2000).

It is accepted that the effects of gamma irradiation on parasites are associated with loss of infectivity, loss of pathogenicity, interruption of the life cycle and in some cases death (Farkas 1988). Doses of gamma radiation have successfully been used against *Angiostrongylus cantonensis*, *Anisakis* spp., *Chlonorchis* spp., *Cinathostoma spingierum*, *Opisthorchis viverrini* and *Paragonimus* spp., which are present in fish and crustaceans, and against *Cysticercus bovis*, *C. cellulose*, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis*, which infect meat (Farkas 1988).

In the developing countries of Latin America, Asia and Africa, taeniosis-cysticercosis caused by *Taenia solium* is still prevalent and is considered an important health problem and a source of economic losses (Aluja 1982; Sciutto et al. 2000). To interrupt the life cycle of *T. solium*, different strategies have been proposed to assist prevention and eventual eradication.



based on social development, educational programs and/or biological interventions. These interventions are oriented towards treating the tapeworm carriers or decreasing the prevalence of pig cysticercosis (Sciutto et al. 1995, 1998, 2000; Toledo et al. 1999).

Regarding this, it is of special interest to stress the high vulnerability of the *T. solium* metacystode. In fact, it is frequently found that, without any intervention, metacystodes can be spontaneously destroyed (Aluja and Vargas 1988; Pérez-Torres et al. 2002). Based on this information, it is reasonable to postulate that measures taking advantage of this vulnerability can contribute to the success of control programs.

Ionizing radiation has been demonstrated to effectively damage *T. solium* metacystodes (Verster et al. 1976; Aluja et al. 1993; Flores-Pérez et al. 1996). Two different criteria have been used to evaluate metacystode viability: the in vitro evagination assay and inoculation of metacystodes into immunodepressed hamsters (Verster et al. 1976). After exposing the metacystodes to different doses, a lethal dose of 7 kGy was found to completely inhibit both their capacity to evaginate and the development from metacystodes to tapeworm (Aluja et al. 1993). Further research confirmed that a dose as low as 0.3 kGy can effectively interrupt tapeworm development. In fact, after this treatment, metacystodes were used to infect hamsters orally and, at 21 days later, only scolices were recovered from their intestines (Flores-Pérez et al. 1996). With *T. saginata* metacystodes, a dose of 0.3 kGy was also effective in stopping the growth of the parasite in hamsters (Geerts et al. 1992).

In view of these results, we designed this study to evaluate the biological phenomena that cause this sublethal effect. In previous studies, ionizing radiation (gamma radiation, X-rays) was reported to induce DNA fragmentation (Jackson 2001) that eventually led to cell death, due to the apoptosis of cultured cells or whole organisms (Friedberg et al. 1995; Coultas and Strasser 2000; Rich et al. 2000; Jackson 2001; Mirzadeh-Joniani et al. 2002). It is generally accepted that apoptotic cell death is an evolutionary conserved process by which cells, following a genetic program, systematically inactivate, disassemble and degrade their functional and structural components (Hale et al. 1996; Flores-Pérez 2002). This cell death exhibits a characteristic pattern of morphological, biochemical and molecular changes. It is a normal mechanism of the development and growth of multicellular and some unicellular organisms and is considered a physiological cell death (Hale et al. 1996; Welburn et al. 1997; Nasirudeen et al. 2001).

In this study, evidence of apoptosis that can mediate crippling induced by irradiation of *T. solium* metacystodes is reported.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Materials and methods

Animals

Both female and male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*; $n=56$) were employed in this study. All animals were 6–12 weeks old at the start of the experiments. They were housed at the Institute of Biomedical Research at the Autonomous National University of México (UNAM). The experiments reported here were conducted according to the principles of the Guide for the care and use of laboratory animals.

Seven pigs naturally infected with *Taenia solium* metacestodes were transported to and housed in the Faculty of Veterinary Medicine Zootechnics, UNAM. The pigs were humanely killed with an electric stunner and metacestodes were obtained from them. The shoulders of each pig were removed, the left was irradiated with 0.3 kGy and the right was used as a control (non-irradiated).

Irradiation

The infected shoulders were placed in a black plastic bag, which was then placed in a cardboard box located under a gyratory table to be homogeneously exposed to irradiation. The dose used was 0.3 kGy, which was previously established to effectively inhibit *T. solium* development (Flores-Pérez et al. 1996).

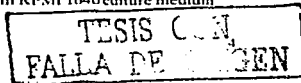
The irradiation was carried out in a Gamma beam 651 PT 60, utilizing a ^{60}Co source located at the Institute of Nuclear Science, UNAM. The dose rate was determined with a ferrous sulfate dosimeter and the calculation of the dose rate at the center of the chamber at the time of dosing was based upon a ^{60}Co half-life of 5.27 years.

Parasites

After irradiation, the *T. solium* metacestodes were removed from the meat. The metacestodes from the control shoulders were also removed and both types were placed in PBS. Only metacestodes that exhibited a vesicular appearance were used.

In vitro evagination assay

The viability of irradiated and non-irradiated metacestodes tested by their ability to evaginate in vitro immediately after irradiation. The assay was performed in RPMI 1640 culture medium.



(Gibco) supplemented with 25% pig bile. Metacystodes were then incubated at 37 °C for 12 h in a Petri dish and the evaginated metacystodes were counted.

Evaluation of in vivo infectivity using the golden hamster taeniosis model

Eight golden hamsters (*M. auratus*) of both sexes, aged 6–12 weeks, were used to test the infectivity of the metacystodes recovered from each pig. Hamsters were immunosuppressed with 4 mg of Depomedrol (methyl prednisolone acetate; Upjohn, México City) injected intra-muscularly, at the same time as they were orally infected with metacystodes.

Four hamsters were orally inoculated, each with five irradiated metacystodes; and four animals each received five non-irradiated parasites. Infection was carried out, following the protocol described elsewhere (Verster 1974; Allan et al. 1991).

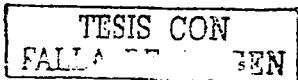
Post-mortem studies

At 21 days post-infection, hamsters were humanely killed with CO₂ and their intestines were removed for inspection and were searched for tapeworms. The mucosa of each intestine was observed under a stereoscopic microscope, to search for parasites.

In situ nick-end labeling of internucleosomal cleavage fragments

TUNEL (TdT-mediated DUTP-nick-end labeling) was performed using an in situ POD cell death detection kit (Roche Molecular Biochemicals, México City). In order to detect the 3'-OH ends that are generated during DNA fragmentation, slides were prepared using irradiated and non-irradiated *T. solium* metacystodes and both scoleces and tapeworms. Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and sections of 5 µm were obtained. Then, tissue sections were processed, following the technique provided by the kit manufacturer.

Sections were examined with 40x and 100x objective lenses. A total of ten microscopic fields were evaluated. Only cells showing green fluorescence staining and visible nuclei were counted as positive.



DNA gel electrophoresis

Scolices and tapeworms obtained from the intestine of hamsters infected with *T. solium* metacestodes (irradiated with 0.3 kGy, or non-irradiated) obtained from pork shoulders were washed with PBS five times, placed on digestion buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 25 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 0.3 mg Proteinase K/ml) and incubated at 50 °C overnight, followed by extraction, first with phenol/chloroform and then with chloroform. DNA was then treated with RNase (20 µg/ml) for 1 h at 37 °C, followed by phenol/chloroform and chloroform extractions and was purified by ethanol precipitation. The concentration of DNA was determined by measuring the optical density at 260 nm; and 15 µg of DNA/lane were run on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, visualized on a UV light box and photographed.

Statistical analysis

The statistical significance of evaginated metacestodes between non-irradiated and irradiated with 0.3 kGy were calculated with the χ^2 test. The total number of tapeworms and scolices obtained at 21 days post-infection were compared using the Mantel Haenzel test; and finally the fragmented cell counts were analyzed by the Wilcoxon test. Differences were considered significant when *P* values were less than 0.05.

Results and discussion

The numbers of evaginated metacestodes in the control and irradiated groups of seven pigs are presented in Table 1. The proportion of evaginated *Taenia solium* metacestodes was statistically higher in the control group ($P < 0.01$). This result indicates that irradiation at 0.3 kGy decreases the ability of *T. solium* metacestodes to evaginate in vitro. In addition, it coincides with previous results obtained by other authors (Verster et al. 1976; Flores-Pérez et al. 1996). The same effect was induced with a dose of 0.7 kGy (Aluja et al. 1993).

[Table 1. will appear here. See end of document.]

Gamma irradiation, when applied to biological systems like cells, can basically induce DNA damage in two ways: (1) direct effects resulting from the interaction of radiation energy with DNA and (2) indirect effects from the DNA damage caused by the free radicals that are generated during the process (Friedberg et al. 1995; Norbury and Hickson 2000; Jackson 2002). In addition, it produces DNA double-strand breaks (DSBs) and, as a consequence,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a complex and diverse response must be triggered by the cell, using specific DNA repair mechanisms, stopping the cell cycle progression and inducing cell death by apoptosis (Norbury and Nurse 1992; Coultas and Strasser 2000; Jackson 2001, 2002; Norbury and Hickson 2001), a particular way of cell death that involves a genetic program to be executed (Hale et al. 1996; Coultas and Strasser 2000; Flores-Pérez 2002). This has been described in several organisms, including parasites (Welburn et al. 1997; Narisudeen et al. 2001), and is considered highly conserved (Henson et al. 2001). All of these strategies have the objective of preserving the genome integrity and stability to avoid transmission of mutations (Coultas and Strasser 2000; Jackson 2002). The DNA DSBs are probably considered the most dangerous DNA injuries (Jackson 2002), because both strands are affected and, therefore, the DNA repair mechanisms that need an unaffected strand in order to act cannot repair the DNA in an effective way. DSB possesses the potential to induce mutations at the site of injury; and incorrect DSB repair could lead to chromosomal translocations that produce unstable dicentric chromosomes or acentric chromosomal fragments (Sadaie and Sadaie 1989; Ludwikow et al. 2002).

When the DNA repair systems and DNA damage signal pathways are affected, inviability could result, either at the cellular level or throughout the complete organism. In some cases, the DNA mutations are tolerated but lead to developmental abnormalities, organ degeneration and accelerated rates of tissue growth (Lindahl and Wood 1999; Jackson 2002).

The induction of apoptosis with gamma irradiation has been reported (Norbury and Hickson 2001; Radford 2002). The cell cycle can be arrested by gamma irradiation at G1-S and G2-M gaps (Norbury and Nurse 1992; Norbury and Hickson 2001).

We speculate that the DNA repair systems which are present in metacestodes are efficient for partially restoring the ability to evaginate, but not to direct the development from metacestode into tapeworm. This may be attributed to the possibility that some genes, essential for cell proliferation, differentiation and metabolism, become affected to a considerable degree.

Different factors, like the size and age of the metacestodes, immune response of the host (Aluja and Vargas 1988; Pérez-Torres et al. 2002), age of infection, handling during experiments and the degenerative and developmental phases could influence the capacity of the metacestodes to evaginate. In all experiments, only vesicular metacestodes were collected for irradiation.



T. solium metacestodes were recovered from hamsters at 21 days post-infection with irradiated and non-irradiated parasites. In the controls, tapeworms of several centimeters were obtained. In contrast, in the irradiated group, only scolices of 1 mm were recovered, as seen in Fig. 1.



Fig. 1. Scolices obtained from the intestine of a hamster at 21 days post-infection with metacestodes irradiated with 0.3 kGy

It is interesting to note that the number of scolices recovered from the hamsters fed with irradiated metacestodes was less than the number of tapeworms in the non-irradiated group (Table 2). In all cases, it can be stressed that growth stopped at the neck zone; and, in this zone, generative tissue has been described (Merchant et al. 1997) which could be the target for the gamma radiation.

[Table 2. will appear here. See end of document.]

These findings indicate that irradiation inhibits the normal growth of the parasite from the larval to the adult stage and they are in accordance with the observations reporting the use of doses of 0.2-0.4 kGy (Verster et al. 1976; Flores-Pérez et al. 1996) and of 0.7 kGy (Aluja et al. 1993). It shows that irradiation not only decreases the evagination of the metacestodes, but it has also the effect of reducing the capacity of the scolices to grow in the intestine of the hamsters. It is possible that some scolices die before 21 days and, as a consequence, are ejected with feces or digested by the host.

Previous authors proposed that irradiation inhibits the ability of cells to divide and thus form new proglottids (Verster et al. 1976). However, the results of this research show that the lack of growth can be attributed to an apoptotic process.

It is important to consider that the loss of clonogenicity only requires that cells stop dividing, not that they cease to exist (Heald 1997).

In order to explain the possible biological mechanisms that are responsible for adversely affecting the *in vitro* evagination of the metacestodes and the effect on the development

from metacystode to worm, in the hamster model, we decided to detect apoptosis, using the TUNEL assay and DNA gel electrophoresis.

DNA fragmentation was evaluated with the TUNEL assay. This technique allows the detection of 3' -OH ends of DNA. In non-irradiated and irradiated *T. solium* metacystodes, no statistical difference was found in the number of fragmented cells (Fig. 2A).

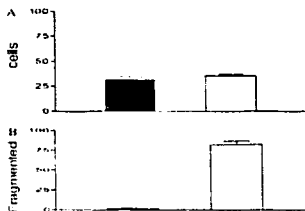


Fig. 2A, B. Mean number of fragmented cells detected by TUNEL assay (see Materials and methods) and or SEM. A Metacystodes of *Taenia solium* immediately after irradiation ($P=0.1484$; black control, white irradiated). B Fragmented cells observed in tapeworms (black control) and scoleces (white irradiated) obtained from hamsters at 21 days post-infection. A statistical significance was found ($P=0.01$)

The fact that positive cells were detected by the TUNEL assay in irradiated and non-irradiated metacystodes could be explained by the specific characteristics of apoptosis, which is a genetically programmed way of cell death. Apoptosis is not only induced by gamma irradiation, it is also a physiological process that is essential for the development of normal organisms. The TUNEL assay cannot distinguish between physiological and non-physiological apoptosis.

In tapeworms obtained at 21 days post-infection from non-irradiated metacystodes, no TUNEL labeling was detected, indicating the absence of DNA fragmentation. In contrast, the scoleces from irradiated larvae exhibited extensive DNA fragmentation (Fig. 2B). Initially, it was assumed that the ionizing radiation induced apoptosis, which then occurred relatively quickly (within hours) after irradiation. A classification of mouse cells was even proposed, divided into three categories: (1) rapidly dying cell lines, which die in 1-2 h after irradiation, (2) intermediates that exhibit apoptosis after 13-17 h and (3) slowly dying cells, which undergo

apoptosis at 24 h or later. This phenomenon of slow apoptosis is termed delayed apoptosis (Heald 1997; Verheij and Bartelink 2000).

In some life systems, apoptosis can occur 20 days after irradiation. The mechanisms that produce this slow effect are not totally understood. However, some evidence that factors like the fibroblast growth factor and epidermal growth factor can contribute to this retarded effect has been reported (Verheij and Bartelink 2000).

It is relevant to note that apoptosis can occur over different time-scales (minutes, hours, days); and, during this period of time, the irradiated cells can have one, two or more mitotic cycles (Heald 1997; Verheij and Bartelink 2000). One possible explanation of the differences in fragmented cells detected by TUNEL on the scolices at 21 days post-infection can be attributed to the phenomenon of delayed apoptosis.

DNA fragmentation and the nucleosomal (ladder) pattern of 200 bp multiples, observed in agarose gel electrophoresis, are considered a distinctive feature of apoptosis. The typical DNA ladder pattern was detected only in scolices, as shown in Fig. 3. The TUNEL assay was positive for the scolices and the gel electrophoresis exhibited the typical DNA fragmentation pattern that can be used to differentiate apoptosis from necrosis.

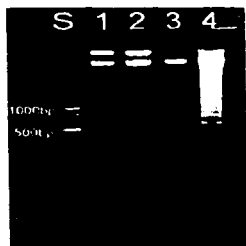


Fig. 3. Internucleosomal DNA fragmentation. *Lane 1* Non-irradiated metacystode DNA, *lane 2* metacystode DNA treated with 0.3 kGy (immediately after irradiation), *lane 3* DNA obtained from tapeworms recovered from hamsters at 21 days post-infection with non-irradiated metacystodes, *lane 4* DNA of scolices obtained at 21 days post-infection with irradiated metacystodes. Molecular weight standards are shown in *lane S*. Results are representative of four independent experiments

The oligonucleosomal laddering pattern is a hallmark of apoptosis and is a biological effect associated with gamma irradiation. Our observations coincide with the DNA fragmentation pattern obtained from *Leishmania amazonensis* (Barcinski and Dos Reis 1999), which again suggests that apoptosis is a highly conserved mechanism between mono- and multicellular organisms.

Until now, there have been no studies that show what genetic program could orchestrate vital processes like: cell division, differentiation and apoptosis in *T. solium* metacystodes. The signal transduction cascades that constitute the DNA repair mechanisms are another important field to be explored in *T. solium* metacystodes. They are needed for understanding the basic biology of the parasite, in order to design effective strategies to eradicate it in future and possibly to use this parasite as a model organism to study radiobiology.

A practical approach of the reported results is based on the fact that food irradiation technology has the unique potential to be used against several parasitic diseases that constitute a health risk and a source of economical losses (Urban 1986, Farkas 1988; Northrop-Clewes and Shaw 2000).

We confirm that gamma irradiation inhibits the development of the *T. solium* larval stage into the infective adult. Therefore, it can be recommended as an effective alternative to control the disease (Verster et al. 1976; Aluja et al. 1993; Flores-Perez et al. 1996), which is still prevalent in developing countries (Sciutto et al. 2000). In addition, this process of decontaminating food should be used together with other alternatives, like vaccination, diagnosis and educational programs (Sarti et al. 1997; Sciutto et al. 1998; Toledo et al. 1999), strategies that eventually will contribute to eradicate the parasite.

This study, in summary, provides evidence that apoptosis is present and could be induced by gamma irradiation of the metacystodes of *T. solium*. Future studies must be performed to elucidate whether differences exist between physiological apoptosis and that induced by genotoxic stress, like irradiation.

Acknowledgements. The authors thank the International Atomic Energy Agency and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for financial support through grants 400 310-5-35418-B and G25-955 M. The authors wish to acknowledge the technical support of Aureliano Torres Garcia and Maribel Nieto and the scholarship provided by CONACYT for the I.F.-P. Special thanks are due to Jose Juan Martinez Maya PhD, for his help with statistics. The experiments carried out comply with the current laws of México.

References

- Allan JC, García-Domínguez C, Craig PS, Rogan MT, Lowe BS, Flisser A (1991) Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol* 85:573-576
- Aluja AS de (1982) Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Flisser A, Willms K, Laelette JP, Larralde C, Rialaura C (eds) *Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York, pp 53-62
- Aluja AS de, Vargas G (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 28:65-77
- Aluja AS de, Núñez F, Villalobos N (1993) Efecto de la irradiación gamma Co-60 sobre el metacestodo de *Taenia solium*. *Veterinaria (Mexico City)* 24:297-301
- Barckinski MA, Dos Reis GA (1999) Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Braz J Med Biol Res* 32:395-401
- Coulhas L, Strasser A (2000) The molecular control of DNA damage induced cell death. *Apoptosis* 5: 491-507
- Earkas J (1988) Irradiation as a method of decontaminating food. *Int J Food Microbiol* 44:189-204
- Flores-Pérez FI (2002) Is death important for life? *Veterinaria (Mexico City)* 33:161-172
- Flores-Pérez FI, Villalobos N, Archundia C, Aluja AS de (1996) Efecto de dosis bajas de irradiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium*. UNAM, Mexico City
- Friedberg E, Walker C, Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C., pp 19-29
- Geerts S, Borchgrave Jde, Brandt JR, Kumar V, De Deken R, Falla S, Van Brabant R (1992) Infectivity of irradiated and non-irradiated metacestodes of *Taenia saginata*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 4:421-422
- Hale J, Smith A, Sutherland C, Stoneman A, Longthorne L, Culhane C, Williams W (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236:1-26
- Heald K (1997) Radiation-induced apoptosis and its relationship to loss of clonogenic survival. *Apoptosis* 2:265-282
- Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11:795-805
- Jackson SP (2001) Detecting, signaling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* 29:658-664
- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696
- Lindahl T, Wood R (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286:1897-1905
- Ludwicko G, Yun X, Hoebie RA, Franken NAP, Darrouf F, Stap J, Van Oven CH, Van Nooorden CJJ, Aten JA (2002) Induction of chromosome aberrations in unirradiated chromatin after partial irradiation of cell nucleus. *Int J Radiat Biol* 78:239-247
- Merchant M, Corella C, Willms K (1997) Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *J Parasitol* 3:363-367
- Mirzaz-Jomani H, Eriksson D, Sheikhoaezin A, Johansson A, Loftholm PG, Johansson L, Stigbrand T (2002) Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer* 94:1210-1214
- Nasrudeen A, Tan K, Singh M, Yap F (2001) Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* 123:235-246
- Norbury CJ, Hickson ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:267-401
- Norbury CJ, Nurse P (1992) Animal cell cycle and their control. *Annu Rev Parasitol* 61:441-470
- Northern-Cleaves CA, Shaw C (2000) Parasites. *Br Med Bull* 56:193-208
- Pérez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, Aline S (2002) *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res* 88:150-152
- Radtford IR (2002) DNA lesion complexity and induction of apoptosis by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 78:457-466

TESIS CON
FALLA DE COPIEN

- Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* 407:777-783
- Sadaie T, Sadaie Y (1989) Rad-2-dependent repair of radiation induced chromosomal aberrations in *Caenorhabditis elegans*. *Mutat Res* 218:25-31
- Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Planearie A, Avila G, Allan J, Craig P, Bonfiman M, Wijesaratne P (1997) Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 56:127-132
- Sciutto E, Aluja AS de, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos N, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Gówezensky T, Díaz S, Larralde C (1995) Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol* 60:53-67
- Sciutto E, Hernández M, García G, Aluja AS de, Villalobos N, Rodarte L, Parkhouse M, Harrison I. (1998) Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological test for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet Parasitol* 78:185-194
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclere JP, Sotelo J, Aluja AS de, Vargas L, Larralde C (2000) *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 15: 1875-1890
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Mamouchian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Kubli-Galinas C, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E (1999) Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 67:2822-2830
- Urban WM (1986) Food irradiation. Academic Press, Orlando
- Verheij M, Barclink H (2000) Radiation induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 301:133-142
- Verster A (1974) The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *Onderstepoort J Vet Res* 41:23-28
- Verster A, Duplessis T, Van Den Heever I. (1976) The effect of gamma radiation on the cysticercer of *Taenia solium*. *Onderstepoort J Vet Res* 43:23-26
- Welburn S, Barcinski MA, Williams G (1997) Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitol Today* 13:22-26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Irradiation decreases the ability of in vitro evagination of *Taenia solium* metacystodes. The data given are the number of evaginated/total number of metacystodes ($P < 0.01$). Each pig represents a different experiment

Pig	1	2	3	4	5	6	7	Total	%
Control (non irradiated)	100/150	165/165	111/160	70/80	40/40	34/40	68/70	588/705	83
Irradiated	73/150	134/165	87/160	61/80	29/40	21/40	50/70	456/705	64

TESIS CON
 FALLA EN
 EN

Table 2. Tapeworms and scolices recovered from hamsters at 21 days post-infection with irradiated and non irradiated metacystodes. Four hamsters were each infected orally with five metacystodes

Dig number	Number of tapeworms found in each of four hamsters (non-irradiated metacystodes)	Number of scolices found in each of four hamsters (irradiated metacystodes)
1	1, 2, 5, 3	1, 0, 0, 2
2	1, 2, 5, 3	3, 3, 1, 5
3	5, 4, 5, 5	2, 2, 1, 2
4	1, 2, 2, 5	2, 1, 0, 1
5	3, 3, 5, 5	1, 0, 1, 3
6	0, 2, 3, 1	1, 2, 2, 2
7	3, 4, 5, 3	0, 0, 3, 4
Total number recovered total number of metacystodes administered	71/140	45/140
χ^2	50.7	32.14

* Mantel-Haenszel test: a statistical significance was found ($P < 0.0016$)

TESIS CGN
FALLA DE ORIGEN

INHIBITORY ROLE OF ANTIBODIES IN THE DEVELOPMENT OF *TAENIA SOLIUM* AND *TAENIA CRASSICEPS* TOWARD REPRODUCTIVE AND PATHOGENIC STAGES

Gemma García, Edda Selutto, Gladis Fragozo, Carmen Cruz-Revilla, Andrea Toledo, Nelly Villalobos*, Iván Flores*, Aline Aluja*, Marco V. Josa, and Carlos Larralde

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

ABSTRACT.—Treated *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs vary notably in their capacity to develop into mature worms in praguinosone-treated hamsters, whereas cells derived from *Taenia crassiceps* cysticerci after 2 mo of infection almost always develop to maturity in the peritoneal cavity of susceptible BALB/c mice. Production of whole cysticercal or parasite cysts with high immunoglobulin raised against an 18-mer peptide epitope (GK-1) common to both parasites significantly interferes with both transformations. These cysting effects of antiparasitic antibodies suggest new forms of immunological interference with parasitic biology other than simple drug. Antibodies that cripple biological functions of the parasite, e.g., their development to reproductive or pathogenic stages, make their important protagonists in humans cysticercosis disease as classic parasitocidal antibodies. Different serum levels of cysting antibodies on the infected pigs could be responsible for the varied ability of cysticerci to convert to tapeworms. Serologic analysis of circulating cysting antibodies, e.g., GK-1, could be useful as a seroprevalence tool in order to reduce parasite transmission.

Taeniasis cysticercosis caused by *Taenia solium* is a very important public health problem in several parts of the world (Fleming et al., 1988), leading to great suffering in the form of human neurocysticercosis (Mach et al., 1990) and important economic losses in pig breeding (Aveledo-Hernández, 1982). In some geographic areas in Mexico, this endemic disease may affect more than 20% of the naturally bred pigs, and human seroprevalence levels vary from 0.06 to 2.7% (Ramírez et al., 1992). Other developing countries may be affected to the extent that Mexico is, or worse (García et al., 1996).

Considering the essential role of pigs as intermediate hosts in the life cycle of *T. solium*, several research groups are trying to develop effective preventive strategies to reduce cysticercosis as ways to reduce transmission to humans and pigs (Nascimento et al., 1995; Scariato et al., 1995). We have recently reported a B- and T-cell response to an 18-mer peptide epitope (GK-1) by the Tst-Tst-Pro-Ser-Asp-Pro-Asn-Ile-Phe-Tyr-Met-Pro-Phe-Ser-Arg, synthesized by the proteolytic recombinant protein antigen K1-L1 (Mansourchian et al., 1996), that induces a high level of protection against murine cysticercosis concomitant with specific antibody and immune cellular responses (Toledo et al., 1999). This and other immunogens of potential interest in the design of an effective vaccine against porcine cysticercosis have been identified and tested with some degree of success (Mojtani et al., 1993; Nascimento et al., 1995), but little is known about the molecular targets and mechanisms involved in their effectiveness. An important direction of molecular research in taeniasis cysticercosis is the need for experiments *in vitro* and *in vivo* laboratory models in which to explore vulnerability to immune attack for different developmental stages of cestodes. The use of *T. solium* eggs and encysted pigs as targets to evaluate the effect of antibodies on immune cells (Frankel, 1992), or both, is limited by the difficulty of obtaining eggs at an appropriate time, manner, and number for experimentation. Evaluation of the effectiveness of immune attacks upon cysticerci is further complicated by their surviving times of residence against in target organs (brain, skeletal mus-

cles) that may go unnoticed (Abita et al., 1996). Additional difficulties in exploring the parasite transformation from encysted to metacysticercal to tapeworm stage because of changes occurring when parasites are requested inside solid tissues or in the bowel's lumen. In other infectious diseases (Uraya, 1993), particularly in schistosomiasis, the use of parasite cell lines has allowed for considerable scientific advance (Ottome et al., 1992), and has been used to various immunodeficient or amputated hosts in studying viral disease (Cotter et al., 1993; Harlow et al., 1998). We have undertaken similar experimental approaches to study more closely the role of immunological responses and cells in taeniasis cysticercosis.

We have recently developed procedures to obtain cells from *Taenia crassiceps* cysticerci capable of infecting naive mice and developing into cysticerci (Toledo et al., 1997). Also, we adapted the immunodeficient hamster model of *T. solium* taeniasis (Cervera, 1994) to study the role of transformation of cysticerci to tapeworms in the presence of antibodies against GK-1 antibodies upon both transformants, as reported herein.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used female and male 4-week-old BALB/c ANS mice, third-instar adult hamsters by middle size (about 170 g), female golden hamsters, 4-week-old, bred in our animal facilities, were also used.

Synthetic peptide (GK-1)

The linear peptide GK-1 (1-18), Tst-Tst-Pro-Ser-Asp-Pro-Asn-Ile-Phe-Tyr-Met-Pro-Phe-Ser-Arg, corresponds to the P1-mer amino acids 95 to 108 of the K1-L1 precursor and antigen of *T. crassiceps* (Mansourchian et al., 1996) plus a terminal Met from the cyst. The peptide was synthesized by multiple peptide synthesis using the method described elsewhere (García et al., 1999). The synthetic peptide was dissolved in water when characterized by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. The same procedure also rendered the correct amino acid composition and sequence.

Immunization of mice and collection of sera

Groups of 10 male BALB/c ANS mice were immunized subcutaneously with 100 µl of 100 µg of the 18-mer GK-1 in adjuvant or 100 µg of antigen (Sigma) in normal CFA. Six weeks later, sera were collected where (García et al., 1999). Two weeks later, the mice were given a s.c. booster with the same immunizing dose of the peptide and with the same adjuvant as used previously. Sera were obtained from each indi-

Received 19 March 1999; revised 17 January 2000; accepted 18 March 2000.

* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, AP, 01100 México D.F., México.

vidual mouse 15 days after the last immunization and stored at -70°C until tested for the presence of specific antibodies.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies

Whole *T. crassiceps* soluble antigens obtained as previously described (Llanos et al. 1989) were used as antigen in an ELISA to measure serum antibody levels induced by immunization following the procedure of Rosas et al. (1989). Simple sera were used at a 1:100 dilution in phosphate-buffered saline (PBS), bovine gamma globulins (1%) were used as the final dilution factor, and the following phospholipase (Boehringer, diluted 1:1000 in PBS containing 1% bovine serum albumin and 1% CaCl_2 Tween 20 for 1 hr at 37°C). The enzyme activity was detected with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody prepared at 400 $\mu\text{g/ml}$ of a Horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Miles) and 4-hydroxy-1-naphthol (4-HNP) as substrate. Color was measured at 492 nm.

Taenia solium cysticerci

Whole *T. solium* cysticerci were dissected from skinned muscles of 10- to 100-day-old highly inbred mice (crosses 2, 4 or their slaughter in an abattoir at Zacatecas, Mexico). Cysticerci used for infection were extensively washed with sterile PBS and placed in RPMI-1640 at 37°C for 1 hr before use in infection experiments.

Cyst transformation to tapeworms in hamsters

To estimate the rate of transformation of infected cysticerci into tapeworms, cysticerci from 10 different infected pigs were separately collected as described above. Cysticerci from each pig were orally administered to each of 4 or 8 *S. typhimurium*-infected golden hamsters following the procedures described elsewhere (Cyster, 1981; Allan et al. 1991). Hamsters were treated with 200 mg of Diphenhydramethyl piperazine maleate (Naloxone) 1 month before infection (Hawley and Schiller 1984; et al. 1991). Five weeks after infection the hamsters were killed and the number of tapeworms found in their intestines was counted.

Effect of anti-GK1 antibodies on cysticercus-tapeworm transformation

Tapeworms from cysticerci from each of 5 different pigs (ages 1, 2, 3, 4, and 5) were incubated under sterile conditions at 37°C for 48 hr in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 100 units/ml of RPMI-1640 for 3 hr at room temperature. After incubation, 8 cysts were fed to groups of 4 or 8 *S. typhimurium*-infected golden hamsters. Hamsters were killed 5 weeks after the number of tapeworms was counted.

Taenia crassiceps cysticerci

The HRI strain of *T. crassiceps* isolated by Freeman (1967) and supplied by H. E. Underhill (Birmingham, Malaysia, Malaysia) has been maintained by serial autoinoculation of *P. polyacris* in ICM II ANS. Cysticerci from 10 to 12 *S. typhimurium*-infected golden hamsters were harvested from the peritoneal cavity of experimental infected mice following the culture procedures described elsewhere (Llanos et al. 1989).

Cell isolation

Isolated *T. crassiceps* cysticerci were obtained as previously described (Llanos et al. 1989). The cysticerci were cleaned from peritoneal sacs and after 24 hr of incubation were mechanically washed with sterile Ca^{++} -free PBS supplemented with penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 units/ml), and nystatin (40 units/ml). The cysts were transferred to 50 ml RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). RPMI-1640 medium (pH 7.4) was supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin, 40 units/ml nystatin, 20 μM CaCl_2 , and 2 μM NaH_2PO_4 . Cysts were then cultured in serum-free medium with or without antigen and placed in 50 ml culture flasks of Corning-Costar, New Jersey with 4 ml of culture medium. After 7 days of *in vitro* culture at 37°C , the fragments were transferred to fresh medium to which was added 1:1 trypsin-DNAse (Gibco BRL, Grand Island, New York) and maintained at room temperature with constant shaking for 25 min. The trypsin digest was washed 3 times after

10 min centrifugation of the lysate at 800 g, and the pellet was resuspended in culture medium. Viability of cells was tested using the trypan blue stain (Bjornli) and counted using an optical microscope and a hemacytometer.

Mouse inoculation with cells

Cells from parasites were collected after 7 days of *in vitro* incubation of the cysticerci in culture medium as previously reported (Llanos et al. 1989). Susceptible ICM II ANS female mice (Llanos et al. 1989) were infected *in vivo* with 1×10^6 cells in RPMI-1640 suspension, containing 10 cells and fed ad libitum. Mice were killed 30 days after infection, and the number of cysts in their peritoneal cavity were counted as described by Llanos et al. (1989). To evaluate the capacity of cyst regeneration from cells of *T. crassiceps* cysticerci, mice were infected with cells from cysticerci obtained at different times after infection of donor mice (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100).

Effect of anti-GK1 antibodies on cyst regeneration

Serum from immunized with GK1 plus purified supernatant from control hamsters (Llanos et al. 1989) were used to isolate purified total Ig following standard procedures that include thorough dialysis against PBS to free the preparation from remaining and potentially toxic immunoglobulin, as tested by precipitation with dialyzed bovine serum albumin (Saurito et al. 1993). Purified IgG were adjusted to a concentration of 10 mg/ml and incubated with 100 *T. crassiceps* parasitized cysts in 1 ml of RPMI-1640 during 48 hr at room temperature under sterile conditions. After incubation of cells with RPMI-1640 or with purified IgG from GK1 animals, 200 control mice were infected into the peritoneal cavity of ICM II ANS mice. After 30 days, mice were killed and the number of cysticerci recovered from their peritoneal cavity was counted.

Statistical analysis

The rate of transformation of infected *T. solium* cysticerci into tapeworms is expressed as the quotient of the number of cysticerci administered to each group of hamsters and the number of tapeworms that developed in the same group (H). Statistical analysis required a non-parametric test (Mann-Whitney U-test). The response variable is a variable and the response variable is estimated by 4 \times 8 independent replicates considered as groups. Thus, the between-group variation would be the effect of all different replicates of hamsters. As usual, the probability of not observing tapeworms, whereas the variation within pig subgroups that from sampling cysticerci of the same pig and that from hamster differences is accepted. The effect of antibody on transformation of both *T. crassiceps* and *T. solium* was tested for significant differences by 2-way non-parametric ANOVA tests being the 4 different treatments (cysticerci, purified IgG with culture medium, control IgG, and anti-GK1) and the other was being the collection of cysticerci from 8 different pigs (crosses). The response variable *H* was estimated in 4 different replicates of hamsters. As usual, the 95% confidence level was taken as statistically significant but, because of the intrinsic variation in these experimental procedures, statistical significance at our confidence level is greater was 5% to strengthen the inferences.

RESULTS

Taenia solium

Transformation of uninfected cysticerci to tapeworms in hamsters. Table I shows the rate of tapeworm transformation of uninfected cysticerci (i.e., 1 number of tapeworms in bowel of each group of hamsters). A total number of cysticerci administered per group derived from 19 different collections of cysticerci, each collection from a different infected pig, and each collection tested in 4-5 different hamsters with 5 cysticerci per hamster. There is a very large and statistically significant variation between groups ($P < 8 \times 10^{-10}$). As usual, some pigs bearing cysticerci having a transformation *H* index of 50% and

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE I. Ratio of tapeworm transformation in hamsters of untreated cysticerci derived from 19 different naturally infected cysticercotic pigs.

Pig number	Individual number of tapeworms found in each hamster*	Ratio (%) ^b	Cysticerci were incubated with	
			*Purified lgs from	Gk1-Immatured mice
1	1, 1, 3, 3	(8/20)	40	
2	2, 2, 4, 4	(12/20)	60	
3	0, 4, 0, 3	(7/20)	35	
4	0, 0, 0, 0	(0/20)	0	
5	2, 3, 0, 0	(5/20)	25	
6	3, 2, 4, 4	(13/20)	65	
7	2, 1, 2, 0	(5/20)	25	
8	2, 0, 2, 1	(5/20)	25	
9	5, 3, 1, 4	(13/20)	65	
10	4, 3, 4, 5	(16/20)	80	
11	0, 3, 1, 0	(4/20)	20	
12	3, 2, 1, 0	(6/20)	30	
13	0, 0, 0, 0	(0/20)	0	
14	4, 0, 4, 3, 4	(18/25)	72	
15	0, 0, 1, 1, 0	(3/25)	12	
16	4, 5, 4, 4, 4	(21/25)	84	
17	1, 0, 0, 0, 0	(1/25)	4	
18	5, 5, 4, 4, 4	(22/25)	88	
19	4, 4, 4, 3, 4	(19/25)	76	

* Four to 5 hamsters were orally infected each with 5 cysticerci.
^b Percentage of transformed cysticerci (Ovaceas, ANOVA, between pig pair = 1% and 2.7% Mag. $P < 0.1$, within pig pair = 60, 50, 7% Mag. $P < 0.1$, total cell = 50, Mag. $P < 0.06$, $P < 0.001$).

several with none (0%) or low (15%) rate, the median was about 40%. The within-pig variation is also considerable, but because it confounds the sources of variation due to differences in hamsters, cysticerci, and sampling errors, no reliable reference can be drawn from it other than its magnitude being suggestive of several factors being involved.

Effect of anti-Gk1 antibodies on *in vivo* cysticercus tapeworm transformation. Table II shows the effect of preincubation of the cysticerci with anti-Gk1 antibodies on the development of *T. solium* cysticerci into tapeworms inside the intestine of immunosuppressed hamsters. Statistical analysis revealed statistically significant sources of variation based both on the preincubation procedure ($F = 73.3$, d.f. = 2, $P < 0.05$) and on the different pigs from which the cysticerci were collected ($F = 7.7$, d.f. = 4, $P < 0.05$). The variance due to interaction was also significant ($F = 13.1$, d.f. = 8, $P < 0.05$) and thus points to the effect of preincubation not being the same for all pigs.

Taenia crassiceps

Effect of anti-Gk1 antibodies on cysticercus regeneration. To optimize cyst regeneration from the cell lines, we first estimated the time of infection at which the collected cysticerci best developed in recipient mice. Cyst cells were recovered from cysticerci 1, 2, 3, 4, or 5 mo after infection and were injected (2 mg) into BALB/c mice (40 cells per mouse). Cells from cysticerci harvested from 1- and 2-mo-old infections best reproduced in the majority of the recipients, with parasite incidences of 84.7% \pm 5.2 and 84.7% \pm 6.0 cysts/mouse, respectively. As for the effects of preincubation with anti-parasite lgs, Table III shows the number of cysticerci recovered from mice injected

TABLE II. Effect of anti-Gk1 antibodies on *Taenia solium* cysticerci.

Exp	Cysticerci were incubated with		*Purified lgs from	
	IPM1 In10	Control mice	Gk1-Immatured mice	Gk1-Immatured mice
1	10, 1, 1, 1, 0	2, 0, 1, 0, 1	0, 0, 0, 0, 0	
2	4, 5, 4, 4, 4	4, 4, 5, 3, 4	3, 1, 2, 3, 1, 9	
3	1, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0	
4	4, 5, 5, 4, 4	4, 2, 3, 1, 1	0, 0, 0, 1, 0	
5	4, 4, 4, 3, 4	3, 3, 2, 2, 2	1, 1, 0, 0, 0	

* Lgs were purified from immature mice, separated by 13 days with saponin treatment of saponin (10 mg/ml) and purified by gel permeation chromatography.

^b Number of tapeworms found in each hamster (total infected with *T. solium* cysticerci in each experiment) from a different pig (4 cysticerci were preincubated in solution with medium of purified, immunized hamster serum as in Exp. 2).

^c Significantly different from control (Student's *t* test) or immunized ANOVA test ($P < 0.05$).

with cysticercus cells harvested from a 2-mo-old infection previously incubated with either culture medium, lgs from saponin-injected mice (mean 11.8% \pm 0.2%), or lgs from mice immunized with Gk1 in saponin (mean 14.1% \pm 0.6%). Although a statistically significant protective effect upon parasite intensity is caused by non-specific lgs from adjuvant-treated mice (66.8% \pm 24.4, $P < 0.01$), specific anti-Gk1 antibodies purified from Gk1-immunized mice more effectively reduced the parasite intensity expected from control values (60.8% \pm 8.6, $P < 0.01$).

DISCUSSION

A most striking finding was the great variation between pigs of their untreated cysticerci's ability to transform into tapeworms, i.e. from 0 to 100%. Thus, in spite of the great variation within pigs, one work firmly establishes that not all infected pigs, and perhaps not all cysticerci within the same pig, equally participate in transmission. This fact is of great consequence for understanding the epidemiology of cysticercosis, as it points to one of the most difficult of the stable cysts or the maintenance of seasonally normal, but irrelevant, clumped cysts; for example, a classic riddle in *T. solium* epidemiology is the difficulty in finding the tapeworm carrier in localities with high (10–20%) endemic levels of pig cysticercosis (Keelebach et al. 1969) and in regions or countries with high levels of cysticercosis (Ovaceas, Barja, and Gutierrez et al. 1988; Toralado et al. 1992). A number of explanations have been proposed for the tapeworm's comparatively low epidemiological profile. Some have suggested that the large number of eggs produced by a single tapeworm is responsible for the high prevalence of cysticercosis (Gammell et al. 1985). The long life span and resistance of infective eggs (Adelle et al. 1982), coupled to the geographically expansive migratory habits of definitive hosts that contaminate extensive areas with viable eggs (Gammell et al. 1985) are also invoked. The differential detectability of stages of pig cysticercosis and human fasciolosis (Keelebach et al. 1969) may also contribute to the tapeworm's apparently low prevalence. Some of these reasons are mutually exclusive. The new clumped cysticercus node would explain such an intra-annual ratio of metacestode:adult numbers by proposing that only a few of the seemingly

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE III. Effect of anti-GK-1 antibodies on *Trinoma cysticercus* cyst regeneration from isolated cysticercal cells

Cysticercal cells incubated with	*Individual parasite load	Mean number \pm SD
RPMI-1640	67, 45, 70, 65, 60, 73, 88, 59, 71, 70	66.8 \pm 11.114
Immunoglobulins purified from ^b		
Control mice (0.2 \pm 0.02) ^c	45, 46, 30, 10, 28, 0, 23, 21, 15, 36	24.4 \pm 13.507
GK-1 immunized mice (0.6 \pm 0.03) ^c	0, 7, 12, 0, 18, 15, 9, 0, 13, 12	8.6 \pm 6.609

* Number of cysticercal cells found in each mouse after infection with 10⁷ *T. cysticercus* cysticercal cells previously incubated with medium or purified immunoglobulins (1 \times 10⁶ cells/ml).

^b Igs were purified from mice immunized with separated by 15 days with saponin from either a saponin (100 μ g/ml) plus GK-1 peptide (100 μ g/ml) or saponin (100 μ g/ml).

^c Typical density (1.118 g/ml) of the saponin (immunized and control) saponin (GK-1).

^d Total labeled with anti-GK-1 antibody and saponin (control) saponin (GK-1) saponin (control) saponin (GK-1).

viable cysticercus are indeed capable of transforming into tapeworms, even if ingested by an susceptible host. The impact of the crippled excystercus motion upon control programs based only on meat inspection or treatment is obvious: such programs would need to confiscate and/or destroy all infected cysticercus lest a few viable ones escape and reproduce by the millions.

A potentially very important and novel finding is the blocking effect of anti-GK-1 antibodies upon *T. solium*'s transition from cysticercus to tapeworm in prednisolone-treated presumably immunosuppressed hamsters used as hosts (data not shown) (Verster, 1974). The issue was studied here using 8 different collections of cysticercus, each from a different infected pig. Experiments proved that anti-GK-1 Igs significantly reduce the ability of cysticercus to transform to tapeworms and, to a lesser extent, as do Igs from adult immunocompetent, control mice. The specific antibodies must act very fast in vivo, as they performed their crippling function within an hour of incubation before being exposed to the acidic conditions of the stomach of the hamster. Of note, the antibodies are potentiated or localized sites are accessible to degradation by the specific infective cysts of the cysticercus, e.g., the spiral chamber (Rivas et al., 1998; Toledo et al., 1999). The comparatively smaller but significant effects of Igs from saponin-treated control mice most probably derive from polyclonal expansion. The ELISA values of pre-immunization *T. solium* of these same experimental mice being somewhat lower than after 1 or 2 saponin injections (0.15 vs. 0.18 and 0.23, respectively) (Toledo et al., 1999) support this possibility. The fairly frequent immunoprecipitates reactivity of this GK-1 peptide (Kovacs et al., 1999) could also be involved in the adjuvant effect. We assume that under natural conditions, since the antibodies would perform their parent crippling function during the prolonged months of cysticercal residence of the metacestodes within the skeletal muscle and other tissues of the intermediate host. This could in part explain the variability of affected cysticercus in transforming to tapeworms.

Thus, one may speculate that the antibody-mediated crippling effect could have significant biological and epidemiological consequences, as not all infected pigs and perhaps not all cysticercus within the same pig, would equally participate in transmission. Also, antibody crippling effects may have important applications in endemic areas as an additional way to reduce the transmission potential of *T. solium* cysticercus. Thus, immunotherapies with GK-1 of the infected pigs, directed at raising the serum levels of crippling antibodies, might lower the transmission potential of the infected pigs.

Results also show that anti-GK-1 Igs can block the regeneration of cysticercus from *T. cysticercus* cells. This finding adds to the significance of the GK-1 epitope in the biology of this parasite. GK-1 is an 18-mer peptide corresponding to a L-amino acid stretch of KLEK²⁷ with an additional alanine, KLEK²⁸, a protein shared by both *T. cysticercus* and *S. stenocephali* (Rivas et al., 1999). Also, GK-1 has considerable sequence homology with the family of extensins and has been proposed as an effective candidate antigen for a preventive vaccine against pig cysticercosis (Hernandez, 1999). GK-1 is expressed in all life cycle stages of *T. solium* including eggs, cysticercus, and adults, and is quite accessible for targeting anti-GK-1 antibodies in solution (Toledo et al., 1999). Thus, the interest in GK-1 epitope is furthered by our finding that it is also related to the development of isolated *T. cysticercus* cells into cysticercus.

ACKNOWLEDGMENTS

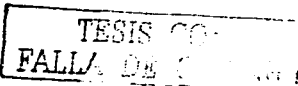
The authors thank Mariela Hernandez, Gonzalo Aceto, and Mercedes Hava for their technical support, Felipe Maza for performing the peptide sequence analysis, Isabel Perez-Montiel for her aid in correcting the English version of the manuscript, and the students, Merack Haron Vazquez, Rebecca Carrillo Escobar, Sergio Garcia Lara, Ma. Elena Gonzalez Romo, Zuley Pacheco, Juan Pablo Lira Sponzo, Sylvia Motaiz Hartz, Efra Romero Martinez, Dulce Susen Hillmonte, Ximca Sepura Mancilla, and Angélica Zaldívar Reyna of the school of Biology of the Universidad Simón Bolívar who helped with the field and laboratory work. This investigation was partially supported by Consejo Nacional de Investigación Científica, Fundación Miguel Alemán, México, and Dirección General de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, IN208305, IN212705.

LITERATURE CITED

- ALLEN, J. D., and S. C. 1962. Economic impact of porcine cysticercosis. *Proceedings of the 10th International Conference on Parasitology*, p. 107. Ed. by C. F. D. Leffler, C. F. D. Leffler, and C. F. D. Leffler, Academic Press, New York, New York, p. 107.
- ALLEN, J. D., C. F. D. LEFFLER, and S. C. 1962. The biology of *Trinoma solium* in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 56: 115-119.
- ALLEN, J. D., F. E. NAYLOR, and S. C. 1963. Efecto de la irradiación gamma en el control del metacestodo de *Trinoma solium*. *Revista Veterinaria de México* 24: 297-301.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

- 002, and P. SUTTILO. 1998. *Toxaria solium* cysticercosis in pigs: Characteristics of the infection and antibody response. *Veterinary Parasitology* 81: 40-59.
- HANSE, C., J. F. S. MATHIAS, D. J. HODGINS, and D. W. HENNESSY. 1994. *In vitro* cultivation of cells from larval *Trichinella murrelli*. *Journal of Parasitology* 80: 29-31.
- HODGINS, D. J., L. LAMONT, A. MILLER, C. LAMONT, M. HENNESSY, and J. SUTTILO. 1998. Increased resistance to *Toxaria crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66: 760-768.
- HOLMES, R. N. 1962. Studies on the biology of *Toxaria crassiceps* (Zed. et. 1800). *Revue (1910) Canadian Journal of Zoology* 40: 989-990.
- HOTTA, K. 1991. An established cell line of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella*. *International Journal of Parasitology* 21: 233-240.
- GRANT, W. P., J. C. NEALON, C. FLETCHER, J. MERRIS, J. D. MAYER, A. R. TOWNS, H. S. ALVARO, P. VIGOREA, M. H. HILL, J. C. MERRIS, and P. S. CLAY. 1999. Epidemiology of *Toxaria solium* (Trematoda) and cysticercosis of swine in the Great Plains communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 282-289.
- GUERARDI, M., Z. MANSOURI, Z. PEKAROVIC, J. S. SUTTILO, J. F. SUTTILO, R. S. NATHAN, and H. ROOS. 1998. Anticercarial and anticysticercosis prevention and control of humanis cysticercosis. *WHO* 93. *World Health Organization Geneva, Switzerland.*
- GUYERSON, G. K., K. MERRIS, J. HODGINS, C. LAMONT, M. HENNESSY, J. F. SUTTILO, M. V. MERRIS, J. SUTTILO, J. F. SUTTILO, and J. S. SUTTILO. 1990. Immunomodulation with the peptides of *Toxaria crassiceps* murine and human cysticercosis. *Immunology Letters* 24: 185-189.
- GUTH, A. J., R. H. HALL, S. LIND, J. K. LIND, R. D. LIND, and P. J. LAMONT. 1993. Immunogenicity of human tapeworms (type 1, 2, 3, and 4) in response to various antigens with alterations of surface carbohydrate and differentiation. *Journal of Virology* 67: 1771-1784.
- HANSE, C., D. W. HENNESSY, M. GUYERSON, J. SUTTILO, and P. SUTTILO. 1995. Transgenic mice expressing human and rodent antigens as a type of transgenic vaccine against swine *Trichinella* disease. *Journal of Virology* 69: 131-132.
- HENNESSY, M. 1998. Antigenic determinants of *Toxaria crassiceps*: Identification, characterization and antigen reactivity in the murine and porcine systems. M.D. Thesis, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico. 231 pp.
- KALISH, S. J., S. A. S. SUTTILO, and J. SUTTILO. 1991. An appropriate vaccine against humanis cysticercosis (*T. solium*). *Proceedings of the Mexican Academy of Sciences* 72: 181-189.
- LAMONT, C. P., J. SUTTILO, M. LAMONT, M. E. MERRIS, and D. W. HENNESSY. 1992. Characterization of the surviving envelopes of *Toxaria solium* stages in cysticercosis: Physical state of knowledge and perspectives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46: 222-229.
- LAMONT, C. P., R. M. MERRIS, J. SUTTILO, M. E. MERRIS, J. GUYERSON, and J. C. SUTTILO. 1990. Decapsulating western hosts of tapeworm antigens in *Toxaria solium* (*Trichinella spiralis*). *Toxaria crassiceps* murine cysticercosis with sera from neurosarcocystic and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 282-293.
- , and A. P. PIERRE, M. HENNESSY, J. GUYERSON, J. SUTTILO, G. G. HODGINS, R. T. PEKAROVIC, H. S. ALVARO, and J. SUTTILO. 1992. Seroprevalence of humanis cysticercosis in Mexico. *Salud Publica de Mexico* 34: 195-210.
- MANSOURI, Z., G. K. MERRIS, M. HENNESSY, G. LAMONT, A. MILLER, K. MERRIS, J. F. SUTTILO, and J. SUTTILO. 1990. *Canine* cysticercosis. Identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* 81: 250-254.
- MERRIS, J. F., R. SUTTILO, P. TATE, D. HODGINS, A. R. SUTTILO, J. SUTTILO, and A. P. PIERRE. 1993. Immunization against porcine cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 602-612.
- NATHAN, R. J., J. O. GINS, M. H. MERRIS, and A. TANNIR. 1992. Efficacy in murine protection of pig tapeworm cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45: 127-137.
- ROBERTS, M. D. 1982. Immunization against infection with larval farm animal cestodes using oncoprostatic antigens. In *Cysticercosis: Physical state of knowledge and prospects*, ed. A. HALL, K. WILLIAMS, J. P. FLETCHER, J. F. LARADE, and J. Holman (eds.), Academic Press, New York, New York, pp. 63-74.
- ROUSSEAU, C., A. J. PIERRE, and J. GUYERSON. 1993. *Toxaria solium* (Trematoda) cysticercosis: Immunogenic, immunoreactive and protective effects by DNA immunization. *Journal of Parasitology* 83: 519-523.
- SUTTILO, J. F., J. P. SUTTILO, J. H. SUTTILO, R. SUTTILO, H. GUYERSON, HANSE, and A. TANNIR. 1988. *Toxaria solium* (Trematoda) and cysticercosis in a Mexican village. *Tropical Medicine and Parasitology* 39: 294-298.
- SUTTILO, J. F., A. J. PIERRE, J. F. ROBERTS, M. HENNESSY, M. SUTTILO, J. GUYERSON, S. P. SUTTILO, R. SUTTILO, M. HANSE, J. GUYERSON, and J. H. SUTTILO. 1990. Immunization of pigs against *Toxaria crassiceps*: Factors related to effective protection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43: 67.
- , M. HENNESSY, J. GUYERSON, S. P. SUTTILO, A. SUTTILO, J. F. ROBERTS, J. F. ROBERTS, and J. HODGINS. 1998. Diagnosis of porcine cysticercosis: A comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Veterinary Parasitology* 78: 189-194.
- SUTTILO, J. F., G. H. HODGINS, J. F. ROBERTS, 1996. *Cysticercosis*. *Current Clinical Tropical Infectious Diseases* 16: 240-250.
- TATE, A. J., J. F. SUTTILO, and J. SUTTILO. 1997. *In vitro* culture of *Toxaria crassiceps* larval cells and cyst regeneration after infection into mice. *Journal of Parasitology* 86: 119-121.
- , C. LAMONT, C. P. SUTTILO, G. LAMONT, K. MERRIS, HANSE, M. HENNESSY, J. GUYERSON, J. ROBERTS, J. F. ROUSSEAU, G. K. MERRIS, R. SUTTILO, J. H. SUTTILO, and J. SUTTILO. 1999. Towards a *Toxaria solium* cysticercosis vaccine: An approach based by *Toxaria crassiceps* and *Toxaria solium* porcine murine antigenic experimental cysticercosis. *Infection and Immunity* 67: 252-259.
- VIGOREA, A. 1974. The golden hamster as a definite host of *Toxaria solium* (*Trichinella*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 41: 23-27.



Is death important for life?

Fernando Ivan Flores-Pérez*

Abstract

Programmed cell death (apoptosis) is one of the most studied phenomena in the context of biomedical science. The relevance of it is supported by the fact that several diseases which could affect both human beings and animals are caused by alterations of this physiological mechanism of death. In fact, it is proposed in this study that "Without the existence of programmed cell death, life as we know now, could not be possible". The aim of this paper is to provide a general overview about programmed cell death, and also to define and show its own regulation. Alterations of programmed cell death, and the relationship with different diseases are also described, as well as the most common techniques to detect programmed cell death.

Key words: APOPTOSIS, PROGRAMMED CELL DEATH, REVIEW.

Resumen

El fenómeno de muerte celular programada, o apoptosis, es actualmente uno de los más estudiados en el campo de la biomedicina; su importancia radica en que varias enfermedades, que afectan tanto al hombre como a los animales, son causadas por una alteración en este mecanismo fisiológico tan relevante, a tal grado que sin la existencia de este fenómeno fisiológico, la vida, como actualmente se conoce no sería posible. El propósito del presente trabajo es definir el fenómeno de apoptosis, describir, como se regula y dar cuenta de algunas enfermedades causadas por su alteración, así como de las técnicas de detección.

Palabras clave: APOPTOSIS, MUERTE CELULAR PROGRAMADA, REVISIÓN.

Introduction

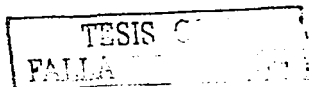
In order to understand how a living being is capable of maintaining the balance in its vital processes, one must ask the following questions: How does it prevent and regulate the size of his organs? In what conditions do the cells that have fulfilled their specific function that have grown old? What mechanisms allow the formation and differentiation of various tissues and organs during different developmental stages? How can physiological death intervene in the processes that defend against external pathogenic microorganisms? In order to be able to answer to some of these questions it is necessary to recognize what pro-

Introducción

Para comprender cómo un ser vivo es capaz de mantener un equilibrio en sus procesos vitales, cabe preguntarse: ¿Cómo conserva y regula el tamaño de sus órganos?, ¿de qué manera remueve las células que han cumplido con una función específica o han envejecido?, ¿qué mecanismos hacen posible la formación y diferenciación de los diferentes tejidos y órganos en las distintas etapas del desarrollo?, ¿cómo puede la muerte fisiológica intervenir en los procesos que actúan en contra de microorganismos patógenos externos? Para dar respuesta a estas preguntas es necesario reconocer cómo funciona

*Revista del Departamento de Biología, Vol. 13, No. 2, pp. 82-92.

* Departamento de Biología, Facultad de Estudios Superiores "Chalchicomula", Universidad Nacional Autónoma de México, Av. del Ejército Nacionalista s/n, San Andrés Bello, México D.F.



grammed cellular death means since, it allows this balance to be possible.

The present study explains the cellular death phenomenon caused by apoptosis and describes some of the mechanisms that are involved in its execution and regulation.

What is apoptosis?

It is a mechanism that is part of cellular homeostasis and is involved in events such as cellular differentiation and the development of diverse organisms¹ that belong to different species, and is therefore, considered to have been preserved during evolution.

It is known that during this process cells actively participate in their death when carrying out a genetically regulated program² in order to maintain cellular renewal, and consequently preserve cellular architecture.

Cells die by apoptosis during certain processes such as embryonic development, during morphogenesis and in adult stages during the renewal of tissues as well as during the immune response.

The term apoptosis (to separate and to fall) was proposed and employed in 1972 with the purpose of describing the death that was observed during embryonic development, in hepatic regeneration and the relationship between proliferation and death that existed in murine tumor models^{3,4,5}, that is different from that which is caused by intoxications and in certain pathologies.

The observations of programmed cellular death (apoptosis) carried back to the beginning of the 19th century when it was observed in embryos, where it was interpreted as the elimination of certain cell populations that showed aberrations. It was first studied in chicken embryos and Ley⁶ with quantitative studies in chicken embryos, demonstrated that approximately 50% of the neurons and motoneurons formed during embryogenesis died before birth. Nevertheless, the term of Kerr^{7,8} was the proposal that in this type of death the cells are active participants and that this process was of vital importance for the preservation of the cellular structure of the tissues.

Programmed cellular death or apoptosis has been described in the nematode *Caenorhabditis elegans*⁹, in organs of fish, humans, and plants.

A great variety of studies done in this field suggest that in almost all human cells one can find the capacity of undergoing apoptosis^{10,11} that in turn allows us to suppose that this phenomenon has been a cellular level response created in order to be activated by intracellular as well as extracellular stimuli.

Death against death

There is a type of death called necrosis that is characterized by the fact that it is not regulated by

te celular programada, la cual permite que este equilibrio sea posible.

El presente trabajo explica el fenómeno de muerte celular por apoptosis y describe algunos de los mecanismos que se involucran en su ejecución y regulación.

¿Qué es apoptosis?

Es un mecanismo que forma parte de la homeostasis celular y que está involucrado en eventos tales como la diferenciación celular y el desarrollo de diversos organismos¹ pertenecientes a distintas especies, por lo cual se considera evolutivamente conservado.

Se sabe que en este proceso las células participan activamente en su muerte al llevar a cabo un programa genéticamente regulado² con la finalidad de mantener el recambio celular que por consecuencia conserva a la arquitectura de los tejidos.

Las células mueren por apoptosis en algunos procesos como el desarrollo embrionario durante la morfogénesis y en etapas adultas en el recambio de tejidos y en la respuesta inmune.

El término apoptosis (to separate and to fall) fue propuesto y empleado en 1972 con el propósito de describir la muerte que se observaba durante el desarrollo embrionario, en la regeneración hepática y la relación entre proliferación y muerte existente en modelos de tumores murinos^{3,4,5}, diferente a la que se ocasiona por intoxicaciones y algunas patologías.

Las observaciones de muerte celular programada (apoptosis) se remontan a principios del siglo XIX, practicadas en embriones, en los cuales se interpretó como la eliminación de ciertas poblaciones celulares que presentaban aberraciones. No fue sino hasta 1949 cuando Hamburger y Ley⁶ con estudios cuantitativos en embriones de pollo demostraron que aproximadamente 50% de neuronas y motoneuronas formadas durante el embriogénesis morían antes del nacimiento. Sin embargo, el término de Kerr^{7,8} fue proponer que en este tipo de muerte las células participaban activamente y que este proceso era de vital importancia para conservar la estructura celular de los tejidos.

La muerte celular programada o apoptosis ha sido actualmente descrita en el nematodo *Caenorhabditis elegans*⁹ y en otros modelos de organismos y plantas.¹⁰

Una gran variedad de estudios en este campo sugieren que en casi todas las células humanas existe la capacidad de sufrir apoptosis^{11,12} la cual permite suponer que este fenómeno ha sido una respuesta a nivel celular creada para ser activada tanto por estímulos intracelulares y extracelulares.

Muerte contra muerte

Existe un tipo de muerte denominada necrosis, que se caracteriza por no estar regulada por genes, producto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

genes and is the product of cellular lesions caused by biological, physical or chemical means.¹⁷

During this type of death, a set of cells are affected by an inflammatory process,¹⁸ there is also a degradation of DNA at the nuclear level, but it is not a defined pattern as occurs in apoptosis, that is made up of 200 base pairs (bp) and their multiples.¹⁹

During death by necrosis, the cellular organelles swell causing an increase in cellular volume, which does not occur during apoptosis, since in this case there is a cytoplasmic condensation that is accompanied by a reduction in cell volume.

A variety of changes have been associated with death by necrosis, for example, loss of osmotic balance, and therefore the membrane potential is altered due to a lowering of ATP, this increasing its permeability.

The final phase of death by necrosis consists of the fusion of the organelle membranes and the loss of integrity of the cell membrane. Additionally, the cytoplasmic content is liberated into the interstitial space creating an inflammatory response.²⁰

Death by apoptosis is characterized by the lack of liberation of cellular material into the interstitial space, which avoids the inflammatory process, furthermore in this type of cell death the organelles practically remain whole, however, they may be altered.²¹

In order to achieve the absence of inflammatory processes, evaginations of the cell membranes are formed, and these end up forming vesicular structures, that in their interior have cytoplasmic material and organelles called apoptotic bodies that neighboring cells or macrophages phagocytose.²²

The enzymes that are contained in the lysosomes that are present in the dying cell after the cellular structures during necrosis. During apoptosis this does not happen, since the cellular components are primarily acted by a family of proteases called caspases.²³

A common event in both types of cell death is chromatin condensation, nevertheless, in the case of apoptosis it has an appearance that is similar to a half moon or a horseshoe,²⁴ this does not occur during necrosis, where the condensation is much more compact but less homogeneous and less dense.

It is evident that there are key differences between apoptosis and necrosis that must be taken into consideration in order to understand apoptosis and the important physiological role that it has (Table 1).

Death, architect of development

At the cell level and during the development of the embryo, there are events such as genesis, migration, differentiation, maturity and death, that constitute the peak of the differentiation process.²⁵

de lesiones celulares provocadas por causas biológicas, físicas o químicas.¹⁷

En este tipo de muerte se afecta regularmente a un conjunto de células mediante un proceso inflamatorio, también a nivel nuclear se da una degradación de ADN,

pero no en un patrón definido como en la apoptosis, que es de 200 pares de bases (pb) y sus múltiplos.

Durante la muerte por necrosis, los orgánulos celulares se hinchan, lo que provoca un aumento en el volumen celular, que no sucede en la apoptosis, ya que en esta existe una condensación citoplasmática, acompañada de una disminución en el volumen celular.

Una variedad de cambios se han asociado con la muerte por necrosis, por ejemplo, pérdida del equilibrio osmótico, por la cual el potencial de membrana se ve alterado a causa de una baja en ATP, de esta manera se incrementa su permeabilidad.

La fase final de la muerte por necrosis consiste en que las membranas de los orgánulos se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular, además se libera el contenido citoplasmático al espacio intersticial, y se induce así una respuesta inflamatoria.²⁰

La muerte por apoptosis se caracteriza por no liberar material celular al espacio intersticial, lo que evita el proceso inflamatorio, también en este tipo de muerte celular los orgánulos prácticamente permanecen íntegros, sin embargo, pueden tener alteraciones.²¹

Para lograr la ausencia de proceso inflamatorio se forman evaginaciones en la membrana celular, las cuales terminan por formar estructuras vesiculares, que en su interior contienen material citoplasmático y orgánulos, denominadas cuerpos apoptóticos (o apoptosomas) que son fagocitados por células vecinas o macrofagos.²²

Las enzimas que están contenidas en los lisosomas presentes en la célula que está muriendo. En apoptosis esto no sucede así, ya que primordialmente los componentes celulares son afectados por una familia de proteasas denominadas caspasas.²³

Un suceso común en ambos tipos de muerte celular es la condensación de cromatina, sin embargo, en el caso de apoptosis tiene un patrón de apariencia que semeja una media luna o herradura,²⁴ lo que no sucede en necrosis, ya que en ella la apariencia de la condensación se observa mucho más compacta, pero es menos homogénea y menos densa.

Es evidente que existen diferencias clave entre apoptosis y necrosis que deben tomarse en cuenta para comprender la apoptosis y el importante papel fisiológico que esta desempeña (Cuadro 1).

La muerte, arquitecta del desarrollo

A nivel celular y durante el desarrollo embrionario, existen eventos tales como la genesis, migración, dife-

TESIS CON
FALLA DE
EEN

Cuadro 1
DIFERENCIA ENTRE NECROSIS Y APOPTOSIS
DIFFERENCES BETWEEN NECROSIS AND APOPTOSIS

Necrosis	Apoptosis
No tiene un programa regulado por genes	Esta controlada por un programa regulado por genes
Incremento en el volumen celular	Reducción en el volumen celular
Fragmentación del ADN nuclear variable	Fragmentación del ADN nuclear en longitudes de 200 pares de bases (p) y sus múltiples copias de escalar o internucleosomal
Los organelos aumentan de volumen	Los organelos los reducen, cambios en su tamaño
Exposición del plasma al espacio intercelular provocando inflamación	El citoplasma se encierra en cuerpos apoptóticos, no provoca inflamación
Activación de proteasas inespecífica asociada con los lisosomas	Activación de proteasas específicas (apoptina)
No depende de energía (ATP)	Depende de energía (ATP)

Apoptosis is responsible for the development processes in some living beings, such as the loss of interdigital membranes in the superior vertebrates, palate fusion, intestinal mucosal and retinal development.¹⁷

Some amphibians show a regression process of certain larval organs that is caused by apoptosis.¹⁸ In the *C. elegans* nematode, that has been used as a study model for apoptosis, this process has been observed as a normal part of the development and even the genes that regulate this are known.¹⁹

Apoptosis during embryogenesis originates the necessary plasticity for the creation of structures that have limited and transitory functionality, that later disappear or are transformed into differentiated structures.²⁰

In adult tissues it is known that certain types of cells, such as the epithelium, hepatocytes, the intestinal epithelium, spermatozooids, the lactating mammary gland and processes such as the selection and involution of the thymus are regulated by apoptosis,²¹ which in turn maintains a balance that determines how many cells a tissue must have and therefore form this organ in the same manner. In plants, the apoptosis process is responsible for sexual dimorphism differentiation.²²

Apoptosis, works by steps?

Cellular death by apoptosis has been divided, for study purposes, in three stages, so that the phenomenon can be better understood. In each stage the most important morphological and biochemical characteristics are mentioned.

An external or internal stimulus to the cell is in charge of the activation of the cell death program; this can be hormones, endogenous proteins, gamma radiation, hypoxia, free radicals, low nutrient levels, patho-

reneaction, maturation y muerte que constituye la culminación del proceso de diferenciación.²³

La apoptosis es responsable de procesos de desarrollo en algunos seres vivos, como la pérdida de membranas interdigitales en vertebrados superiores, fusión palatal, desarrollo de mucosa intestinal y retinal.²⁴

Algunos anfibios presentan un proceso de regresión de ciertos órganos larvares, ocasionado por la apoptosis,²⁵ en el nematodo *C. elegans*, que ha sido usado como modelo de estudio en apoptosis se ha observado como parte normal del desarrollo, incluso se conocen los genes que la regulan.²⁶

La apoptosis en el embriogénesis origina la plasticidad necesaria para crear estructuras que poseen una funcionalidad limitada y transitoria que posteriormente desaparecerán o se transformaran en estructuras diferenciadas.²⁷

En ténidos adultos se sabe que en ciertos tipos celulares como el epitelio, hepatocitos, epitelio intestinal, espermatozoides, glándula mamaria en lactancia, procesos como la selección tímica y la involución del timo son regulados por apoptosis,²⁸ lo que mantiene un equilibrio que determina cuántas células debe tener un ténido y, por consecuencia, el órgano que este constituya. Asimismo, en plantas el proceso de apoptosis es responsable de la diferenciación propia del dimorfismo sexual.²⁹

Apoptosis, ¿va por partes?

La muerte celular por apoptosis se ha dividido para su estudio en tres fases con el propósito de entender mejor el fenómeno. En cada etapa se señalan las características morfológicas y bioquímicas más importantes.

Un estímulo externo o interno a la célula se encarga de activar el programa de muerte celular, pueden ser

genic microorganisms among others, this is known as the initiation stage.^{1,2,11}

During the execution stage most of the morphological and biochemical changes of programmed cell death take place.^{1,12}

At the cellular level, the calcium concentrations increase, basically by penetration of this ion from the exterior to the interior, as well as by the liberation of calcium that happens in certain organelles such as the mitochondria and the endoplasmic reticulum.¹³

The high calcium concentration activates certain enzymes such as the endonucleasas (enzymes whose function is the degradation of DNA)¹² and the proteasas (caspases)¹² together with this there are modifications to the cytoskeletal structure, without reaching complete disorganization, that causes changes in the form and size of the cell, whose volume is reduced.¹³

In structures such as the cell membrane, that are modified during apoptosis, there is a loss of symmetry that causes the externalization of the phosphatidilserina, that is normally in the internal layer of the all cell membrane, a fact that must be taken into consideration since there are detection methods based upon this phenomenon that is considered as one of the earlier ones.¹

The caspases degrade proteins that function in protecting the cell from death by apoptosis, such as Bel-2,¹⁴ that degrade molecules such as actine, polymerasas and protein kinase C.¹⁵

With the increase of intracellular free calcium and other proteins such as Bax (that may induce or inhibit apoptosis), the mitochondrial membrane becomes permeable and loses its potential, which in turn increases the liberation of mitochondrial calcium and increases the synthesis of ATP, in this manner free radicals that cause the oxidation of DNA are generated.¹⁶

Due to the changes in mitochondrial permeability, water can penetrate and permit the liberation of cytochrome C and proteins such as the apoptosis inducing factor (AIF) that activates the caspases.¹⁷

It is relevant that we mention that there has been experimental studies where the action of the caspases is inhibited, and even when death occurs, the marks are quite evident that lesions to the mitochondria are capable of activating the cell death program by themselves, and therefore we must consider that there may be routes, not dependent upon caspases, by which it is possible to have apoptosis.¹⁸

According to the stimuli that activate death by apoptosis, different genes might be activated: p53, in the case of gamma radiations,¹⁹ tp-2 and tp-8 when the stimulants are corticosteroids,²⁰ or the Fas protein (also called CD95 or APO-1), interacting with its ligand Fas L, in the elimination of mature T cells at the end of an immune response, in the activation of apoptosis by

hormonas, proteínas endógenas, radiación gamma, hipoxia, radicales libres, baja en nutrimentos, microorganismos patógenos, entre otros, lo cual se conoce como fase de iniciación.^{1,2,11}

En la fase de ejecución se dan la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos de muerte celular programada.^{1,12}

A nivel celular, las concentraciones de calcio se incrementan, básicamente por la entrada de este ion del exterior al interior, así como por la liberación de calcio que ocurre en ciertos organelos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico.¹³

Las concentraciones elevadas de calcio activan ciertas enzimas como las endonucleasas (enzimas cuya función es degradar el ADN)¹² y las proteasas (caspasas),¹² además a esto existen modificaciones en la estructura del citoesqueleto, sin llegar a su desorganización, que provocan cambios en la forma y tamaño de la célula, cuyo volumen disminuye.¹³

En estructuras como la membrana celular, que se ve modificada en apoptosis, se produce una pérdida de la simetría, lo que provoca que la fosfatidilserina, que normalmente está en la capa interior de la membrana, se exteriorice, hecho que debe ser tomado en cuenta ya que existen métodos de detección basados en este fenómeno, que es considerado como uno de los más tempranos.¹

Las caspasas degradan proteínas, que tienen como función proteger a la célula de la muerte por apoptosis, como Bel-2,¹⁴ que degradan moléculas como la actina, polimerasas y la proteína cinasa C.¹⁵

Por el incremento de calcio libre intracelular y de otras proteínas como lo es Bax (que puede inducir o inhibir apoptosis), la membrana mitocondrial será permeabilizada y perderá su potencial, lo que incrementará la liberación de calcio mitocondrial y un incremento en la síntesis de ATP, de esta manera se generan radicales libres que oxidan al ADN.¹⁶

Debido a los cambios de la permeabilidad mitocondrial, será posible que entre agua para permitir la liberación de citocromo C y de proteínas como el factor inductor de apoptosis (AIF) los cuales activan a las caspasas.¹⁷

Es pertinente aclarar que se han llevado a cabo estudios experimentales en donde se inhibe la acción de las caspasas y aun así la muerte ocurre, de esta forma se hace evidente que un daño en mitocondria es capaz de activar el programa de muerte celular por sí solo, lo que hace pensar que pueden existir rutas no dependientes de caspasas por las cuales se lleve a cabo la apoptosis.¹⁸

Según el estímulo que active la muerte por apoptosis, podrán activarse diferentes genes: p53, en el caso de radiaciones gamma,¹⁹ tp-2 y tp-8 cuando los estímulos sean corticosteroides,²⁰ o la proteína Fas (denominada

TESIS CON
FALLA EN EL CONTENIDO

TCR (antigen receptor), such as *nur-77*, *erg-1* and *c-myb*, as a part of the immunogenic processes.¹⁷

Endonucleases degrade the DNA in a typical step-wise pattern cutting fragments of 180-200 base pairs (bp) and its multiples with a loss of microtubules and reorganization of the cytoskeleton accompanied by the condensation of chromatin.¹⁸

The fragmentation of the plasma and nuclear membrane is a phenomenon that occurs in this stage, with the formation of evaginations of the membrane that give rise to the apoptotic bodies that are vesicles integrated mainly by ribosomes, mitochondrias and nuclear material.¹⁹ Once these events have happened it is possible to observe the fragmentation of the cell.

In vitro, these apoptotic bodies remain as cellular residues that later on swell and finally disintegrate. This phenomenon is known as secondary necrosis. Nevertheless, *in vivo*, the last phase of apoptosis or "cleaning stage" will take place whereby these apoptotic bodies are eliminated by the neighboring cells or macrophages.

Molecular control of apoptosis

The molecular control of apoptosis is considered to be highly preserved amongst species, given that it has been possible to find genes similar in function as well as in sequence in species that are as distant as the *C. elegans* nematode and the human being.²⁰

The apoptosis machinery is regulated by a group of proteases, called caspases, that with an antilysinol²¹ have been identified.²² These remain in different structures at the cell level and may be present mainly in the mitochondria and the cytosol.²³ Let also in other structures such as the nucleus. There are several signal cascades that belong to apoptosis, nevertheless most of them finally converge in the caspases activation stage and subsequent cellular degradation.²⁴

In a healthy cell, the caspases remain as proenzymes or zymogens and must be activated by the degradation of certain aspartate residues of the protein, thus liberating two fragments of an approximate molecular weight between 20 and 20 kDa (kilo Daltons), that later on assemble in the tetramer that will form the active enzymatic complex.²⁵

This caspase activation mechanism may occur in two ways: the self-activation that is called autocatalysis or the indirect activation by other caspases that are already active.²⁶

In a first phase (autocatalysis), the caspases that are known as initiators are activated and these are the 2, 8, 9 and 10 caspases, that have in their structure long (amino) NH₂ zymogen ends, where there are specific sites or domains: the caspases-recruiting domain (CARD) and the death-effector domain (DED),^{27,28} these shall act

también CD95 o APO-1), interactando con su ligando Fas L, en la eliminación de células T maduras al final de la respuesta inmune, en la activación de apoptosis por TCR (receptor de antígeno), como *nur-77*, *erg-1* y *c-myc*, como parte de procesos inmunológicos.¹⁷

Las endonucleasas degradarán al ADN en un patrón típico de escalera cortándolo en fragmentos de 180-200 pares de bases (pb) y sus múltiplos, con una pérdida de microtubulos y reorganización del citoesqueleto, acompañado de condensación de la cromatina.¹⁸

La fragmentación de la membrana plasmática y nuclear es un fenómeno que ocurre en esta fase, al formarse evaginaciones de la membrana, que darán origen a los cuerpos apoptóticos, que son vesículas integradas principalmente por ribosomas, mitocondrias y material nuclear.¹⁹ Una vez que estos sucesos han ocurrido, es posible observar la fragmentación de la célula.

De manera *in vitro*, estos cuerpos apoptóticos quedan como restos celulares que posteriormente se hinchan y, por último, se desintegran. Este fenómeno se denomina necrosis secundaria. Sin embargo, en condiciones *in vivo* se proseguirá a la última fase de la apoptosis o fase de limpieza, donde estos cuerpos apoptóticos serían eliminados por células vecinas o por macrofagos.¹⁹

Control molecular de apoptosis

El control molecular de apoptosis se considera como altamente conservado entre las especies, ya que ha sido posible encontrar genes parecidos tanto en funcionalidad como en secuencia, en especies tan distantes como el nematodo *C. elegans* y el ser humano.²⁰

La maquinaria de apoptosis es regulada por un grupo de proteasas denominadas caspasas, de las cuales hasta la fecha se han identificado 14,²¹ estas permanecen en diversas estructuras a nivel celular y pueden estar presentes en mitocondria y citosol, principalmente,²³ pero también en otras estructuras como el núcleo. Existen diversas cascadas de señalización propias de apoptosis, sin embargo, la mayoría de ellas finalmente convergen en la fase de activación de las caspasas y la consecuente degradación celular.²⁴

En una célula saludable, las caspasas permanecen como proenzimas o zimógenos y deben ser activadas mediante la degradación de determinados sitios ricos en aspartato propios de la proteína. Liberando así dos fragmentos de un peso molecular aproximadamente entre 10 y 20 kDa (kilo Daltons), los cuales posteriormente serían ensamblados en el tetramero, que formara el complejo enzimático ya activo.²⁵

Este mecanismo de activación de caspasas puede darse por dos formas: La autoactivación que se deno-

together with other molecules that function as adaptors: Apaf-1 or DED, which promote proximity and with a combination of their intrinsic proteolytic activity shall cause an auto-catalytic activation of the initiating caspases. Later these will be in charge of activating the effector caspases (indirect activation), among these are the 3, 6, 7, 8, 9 and 10 caspases that are characterized by a much shorter NH₂ (amino) end whose function is the degradation of the proteins that are vital for the cell.^{12,13}

Several of the studies performed to find the molecular regulation of cellular death during apoptosis are based on the use of animals or cells that have gene mutations that must be activated during this process, in such a way that if their function is affected it is known, by the modifications of their phenotypic characteristics, in what processes they specifically participate.¹⁴

The caspases that are activated as initiators may vary according to the stimulus that induces the apoptosis, in the same manner, the adaptors that make the activation possible and the subsequent activation of effector caspases may also vary with the stimulus.¹⁵

Apoptosis, an essential part of the pathological processes

...necesaria sucesiva o inmedulata celular proliferacion together with a lack of the capacity of cells to die". Cells, when in a certain environment, may suffer mutations of their DNA, when this occurs the mechanisms of repair and apoptosis get activated with the purpose of avoiding a lack of control that would initiate cancer.¹⁶

It has been said that in patients with cancer the gene that codifies the p53 protein is mutated in more than 50% of the cases.¹⁷ Its more relevant biological functions are the arrest of the cellular cycle and the induction of cellular death by apoptosis.¹⁸ Therefore, when it loses or diminishes its functionality, the apoptosis process does not develop, thus originating tumors.^{19,20}

At the present time it is known that the phenomena of hypoxia and angiogenesis that accompany the progression of cancer, cause an increase in the expression of the p53 protein.²¹ A theory has been proposed stating that when p53 is mutated and its function is altered, tumorigenesis is potentiated and a greater tumor growth is induced.²²

Certain viruses, such as the human papilloma, also use the function of p53, degrading p53 using the protease of the DNA. According to the elimination by apoptosis of the cells inhabited by the virus.²³

The importance of p53 in the apoptosis induction process is also related to the resistance against radiations and chemotherapy in certain cellular types in which p53 is altered or has lost its functionality. In these cases, the therapy shall not give the expected results in the patient.²⁴ There is data that supports the observation

mina, autocatálisis, o la activación indirecta por otras caspasas ya activas.^{12,13}

En una primera fase (autocatálisis) se activan las caspasas denominadas iniciadoras que son las caspasas 2, 8, 9, 10, y que tienen en su estructura como aminoextremos NH₂ (amino) largos, donde se encuentran sitios o dominios específicos: El dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y el dominio efector de muerte (DED).^{12,13} que actuarán en conjunto con otras moléculas que funcionaran como adaptadores. Apaf-1 o DED, los cuales favorecerán una proximidad, que en combinación con su actividad proteolítica intrínseca, promoverán una activación autocatalítica de las caspasas iniciadoras, posteriormente estas se encargarán de activar a las caspasas efectoras (activación indirecta), dentro de las cuales están las caspasas 3, 6, 7, que se caracterizan por tener un extremo NH₂ (amino) mucho más corto, cuya función es degradar proteínas vitales para la célula.^{12,13}

Varios de los estudios tendientes a encontrar la regulación molecular de muerte celular por apoptosis se basan en el uso de animales o células que tienen mutaciones en los genes que deben ser activados durante este proceso, de tal manera que si su función se ve afectada se sabe, por las modificaciones en sus características fenotípicas, en qué procesos participan específicamente.¹⁴

Las caspasas que serán activadas como iniciadoras pueden variar según el estímulo que induzca apoptosis, asimismo, los adaptadores que harán posible su activación y la subsecuente activación de caspasas efectoras, también varían con el estímulo.¹⁵

Apoptosis, parte esencial de procesos patológicos

El cáncer es una proliferación celular excesiva o desregulada, aunada a la incapacidad de las células para morir.²⁵ Las células, al estar en un ambiente, pueden sufrir mutaciones en su ADN, cuando esto ocurre los mecanismos de reparación y apoptosis se activan con el propósito de evitar que esta se torne incontrolable e inicie así un cáncer.²⁶

En pacientes con cáncer se ha referido que el gene que codifica para la proteína p53 se encuentra mutado en más de 50% de los casos,²⁷ cuyas funciones biológicas más relevantes son el arresto del ciclo celular e inducción de muerte celular por apoptosis.²⁸ Por ello, al perder o disminuir su funcionalidad, el proceso de apoptosis no se desarrolla, lo que origina tumores.^{29,30}

Actualmente se sabe que tenemos como acompañan a la aparición de un tumor como la hipoxia y angiogénesis, causan un incremento en la expresión de la proteína p53.³¹ Incluso se ha propuesto como una teoría que al estar p53 mutado y su función alterada, la

TESIS CON
FALLA EN

that tumors where p53 is mutated, located in lung, mammary gland, prostate, to mention some examples, typically respond less to chemotherapy in comparison to tumors that have a non-mutated p53.¹⁷ Also, it also represents a therapeutic target, since it has been proposed that when the function of p53 is renewed the tumor can regress, thus type of observations have been seen in animals as well as in humans.

Auto-immune diseases

The immune system has the task of defending the organism from external agents, as well as recognizing its own structures in order to not destroy them.¹⁸ The T lymphocytes are considered as the main effectors of the immune response against some pathogens, such as viruses.

T lymphocytes have the capacity of dying by apoptosis in different stages of their life, an alteration of this phenomenon would cause auto-immunity.

When inflammation exists in the organism, the cells that have participated in this phenomenon must be eliminated¹⁹ in order to avoid a chronic inflammatory process. In this case apoptosis is also a mechanism of elimination, and because of this, once the T lymphocytes have been activated by a pathogenic agent they circulate for some days and are later discarded.

The explanation for certain auto-immune diseases is that the mechanism to eliminate the lymphocytes is not efficient or is altered, and thus permits the reaction against its own tissues.²⁰ We must mention that the specific route to eliminate the auto-reactive lymphocytes is the so called Fas route.

It is known that in pathologies such as rheumatoid arthritis and erythematous lupus the mechanism of lymphocyte elimination is delayed and this induces a prolonged auto-inflammatory process.²¹

In the future the therapeutic possibilities for this type of diseases shall be directed to the reestablishment of the apoptosis routes, in order to avoid the presentation of auto-immune phenomena.²²

Some methods for the detection of apoptosis

Electron microscopy

The description of apoptosis was achieved by its observation under the electron microscope whereby the characteristics mentioned above are made evident. Chromatin condensation in ball moon pattern, reduction of cell volume, formation of apoptotic bodies, and phagocytosis of these by neighboring cells, this technique is commonly applied in cell cultures that have been subjected to some apoptosis inducing stimulus.²³

angiogenesis tumoral se potencializa e induce mayor crecimiento tumoral.²⁴

El afectar la función del gene p53 es un mecanismo también empleado por ciertos virus, entre ellos el de papiloma humano que con la proteína HPV E7 degrada a p53 evitando así que las células en donde permanecen el virus sean eliminadas por apoptosis.

La importancia de p53 en procesos de inducción de apoptosis se relaciona también con la capacidad de resistencia a radiaciones y quimioterapia en ciertos tipos celulares, en los cuales p53 está alterado o ha perdido su funcionalidad, en estos casos la terapia no daría los resultados esperados en el paciente.²⁵ Existen datos que apoyan la observación de que en tumores donde p53 se encuentra mutado, como los localizados en pulmón, glándula mamaria, prostata, por mencionar algunos, responden típicamente en menor grado a la quimioterapia, en comparación con los tumores que presentan un p53 no mutado. Asimismo, representa un blanco terapéutico, ya que se ha propuesto que al restablecer la función de p53 se podría lograr una regresión tumoral, este tipo de observaciones han sido practicadas tanto en animales como en humanos.²⁶

Enfermedades autoinmunes

El sistema inmune tiene la tarea de defender al organismo de agentes externos, así como de reconocer las estructuras propias para no destruirlas.²⁷ Los linfocitos T se consideran como los principales efectores de la respuesta inmune en contra de algunos patógenos como los virus.

Los linfocitos T tienen la capacidad de morir por apoptosis en diferentes etapas de su vida, una alteración en este fenómeno provocaría, consecuentemente, autoinmunidad.

Cuando en el organismo existe inflamación, las células una vez que participan en este fenómeno deben ser eliminadas, con el propósito de evitar un proceso inflamatorio crónico. También en este caso el mecanismo de eliminación es apoptosis, por lo tanto una vez que los linfocitos T han sido activados por algún agente patógeno, permanecerán por algunos días en circulación para luego ser desechados.

La explicación a algunas enfermedades autoinmunes radica en que el mecanismo para eliminar a los linfocitos no es eficiente o se encuentra alterado, lo que permite que reaccionen en contra de los tejidos propios. Es necesario mencionar que una ruta específica denominada vía de Fas es la encargada de eliminar a los linfocitos autorreactivos.²⁸

Se sabe que en patologías tales como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso el mecanismo de eliminación de los linfocitos se retrasa e induce así un autoproceso inflamatorio prolongado.²⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

In tissues that form part of organisms, this phenomenon may be observed but in a small or limited group of cells and therefore this technique is not adequate for quantification of this phenomenon, since the number of cells present may be underestimated, given that they will not always exhibit the morphological characteristics of apoptosis, which does not exclude the possibility of them being part of the phenomenon, but that perhaps they are in a morphologically non-detectable phase.

Hematoxylin and eosin stain

The observation of cells stained by hematoxylin and eosin (HE) is a technique that has several advantages since it has a lower cost than others, it only requires a light microscope and a microtome and the personnel that performs it needs relatively little training. In it, samples can be used that were previously collected from other patients, fixed in 10% formaldehyde and then processed.

In this technique the chromatin may be observed with its half moon pattern, also, it allows us to observe a greater amount of cell than with the electron microscope, nevertheless the disadvantage is that it confuses the chromatin condensation that exists in the non-apoptotic cells with that which is found in the apoptotic cells (example of this type of cells are the small lymphocytes); occasionally it is difficult to distinguish the cells that are truly apoptotic from those that are damaged by the microtome of the tissue processing in general. It must be remembered that this tool in the hands of an experienced and knowledgeable pathologist, can be very effective, mainly when culture cells are examined to which an apoptosis-inducing stimulus is applied.⁷

Fluorescence stains

In order to observe cells stained with fluorescent colorants Hoechst 33258 or the colorant known as DAPI may be used. Using these it is possible to easily identify the characteristics such as chromatin condensation and nuclear fragmentation, as well as to evaluate and quantify a considerable amount of cells.

The disadvantages of this technique lie in its higher cost and that in order to perform such a technique the specific fluorescence system is required, besides that, the same evaluation errors mentioned for the HE technique may be committed.⁷

DNA electrophoresis

The fragmentation of DNA in agar gel is one of the most frequently used techniques for the detection of the

En un futuro probablemente las posibilidades terapéuticas para este tipo de enfermedades se enfocarán en restablecer las vías de apoptosis, para evitar que aparezcan fenómenos de autoinmunidad.^{1,9,22}

Algunos métodos de detección de apoptosis

Microscopía electrónica

La descripción de apoptosis se lleva a cabo mediante observación por microscopía electrónica, en la cual se hacen evidentes las características ya mencionadas: Condensación de cromatina en patrón de media luna, reducción del volumen celular, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis de estos por células vecinas, esta técnica se aplica comúnmente en cultivos celulares que han sido sometidos a algún estímulo que induzca apoptosis.⁷

En tejidos que forman parte de organismos, este fenómeno puede ser observado, pero en un grupo pequeño o limitado de células, por ello esta técnica no resulta muy adecuada para la cuantificación del fenómeno, ya que el número de células que se presenten pueden ser subestimadas, debido a que no siempre exhibirán las características morfológicas de apoptosis, lo cual no excluye que estén experimentando el fenómeno, pero quizá en otra fase no detectable desde el punto de vista morfológico.

Tinción con hematoxilina y eosina

La observación de células teñidas por hematoxilina y eosina (HE) es una técnica que presenta ventajas por ser económica en relación con otras, solamente requiere un microscopio de luz y un microtomo, y relativamente poca capacitación del personal que la lleva a cabo. En ella, se pueden usar muestras que han sido colectadas anteriormente para otros pacientes, fijadas en formalina amortiguada al 10% y procesadas.⁷

En esta técnica se puede observar la cromatina con su patrón de media luna, asimismo, permite valorar un número mayor de células que con la microscopía electrónica, sin embargo, la desventaja es que con la condensación de la cromatina existente en células no apoptóticas de las que están en apoptosis (ejemplo de estas células son linfocitos pequeños), en ocasiones puede ser difícil distinguir las células que de verdad están en apoptosis de las que son dañadas por el microtomo o el proceso del tejido en general. Cabe señalar que esta herramienta en manos de un patólogo experimentado y con conocimiento suele ser efectiva, primordialmente donde se examinan células en cultivos a las cuales se les aplica un estímulo que induce apoptosis.⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

apoptosis phenomenon given that it makes evident the specific stepwise or nucleosomal pattern, composed of 200 bp fragments and their multiples, that are originated after the degradation of the DNA by the endonucleases that participate in the phenomenon.^{19,20}

The cells or tissues used for this assay must be treated physically (temperature) as well as chemically (enzymes, for example proteinase K) to treat the DNA, using phenol and chloroform to remove the proteins. When the DNA of the samples is obtained, these are subjected to electrophoresis in agar gel at a density of 1% to 2%, in this manner when the DNA is stained in the gel with ethidium bromide the fragmentation pattern can be observed.²¹ This technique is considered qualitative, but not quantitative, one of its advantages is that it is very simple and has a very low cost.

This technique is characterized by being not very sensitive, since it cannot detect very small quantities of the genetic material when this phenomenon occurs. The disadvantage may be reduced if *southern* type hybridization is performed, marking the DNA with radioactive phosphorus, this test may be used to distinguish between apoptosis and necrosis.²²

TUNEL assay

When the DNA is degraded by the action of the endonucleases, 3' fragments are generated, these form the substrate for an enzyme called deoxyribonucleotidyl transferase that catalyzes the addition of the nucleotides marked with fluorescein, and this allows the observation of the cells with fragmented DNA as well as simultaneously viewing their morphology under the microscope.²³

This technique has the advantage that it can be observed in an ordinary light microscope without a fluorescence system, it is considered a quantitative methodology, it has the disadvantage of being costly and that its extreme sensitivity detects the fragmentation that is induced by topoisomerases.²⁴ It can be applied in cell suspensions as well as paraffin processed tissues.

Flow cytometry

Flow cytometry permits the detection of the intensity of the fluorescence of cells by an electronic and mechanical device called cytometer.²⁵ In this apparatus it is possible to analyze great amounts of cells in a few minutes, besides there are techniques that are based on the measurement of DNA, morphology evaluation, detection of fragmentation and even the expression of the proteins of apoptosis, that may be detected, measured and quantified within a cell population. It is considered as one of the most sophisticated techniques.²⁶ Even though it is extremely sensitive, its

Tinciones con fluorescencia

Para la observación de las células teñidas con colorantes fluorescentes pueden emplearse los colorantes Hoechst 33258 o el colorante denominado DAPI, mediante ella se pueden identificar fácilmente características como son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear,²⁷ asimismo, se puede evaluar y cuantificar un número considerable de células.

Las desventajas de esta técnica radican en que es de un costo mayor y que para llevarla a cabo necesita un sistema de fluorescencia, además, se pueden cometer los mismos errores de valoración mencionados para la técnica de HE.²⁸

Electroforesis de ADN

La fragmentación de ADN por geles de agarosa es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para detectar el fenómeno de apoptosis, que permite hacer evidente el patrón específico de escalera o nucleosomal, el cual posee fragmentos de 200bp y sus múltiplos, que se origina tras la degradación del ADN por las endonucleasas que participan en el fenómeno.^{29,30}

Las células o tejidos que se destinan a este ensayo deben ser tratados tanto física (temperatura) como químicamente (enzimas, por ejemplo, proteinasa K) para liberar al ADN, utilizando fenol y cloroformo, para remover las proteínas. Al obtener el ADN de las muestras, estas se someten a una electroforesis con geles de agarosa entre una densidad de 1% a 2%, de esta manera, al ser teñido el ADN presente en el gel con bromuro de etidio, se visualiza el patrón de fragmentación.³¹ Esta técnica se considera como cualitativa, mas no cuantitativa, una de sus ventajas es que es muy simple y de bajo costo.

Esta técnica se caracteriza por ser poco sensible, ya que no puede detectar cantidades pequeñas de material genético que presenten el fenómeno. Esta desventaja puede reducirse si se llevan a cabo hibridaciones tipo *southern*, marcando el ADN con isotopo radioactivo; esta prueba puede ser empleada para distinguir entre apoptosis y necrosis.³²

Ensayo de TUNEL

Al existir una degradación del ADN por acción de las endonucleasas se generan fragmentos 3', estos constituyen el sustrato para una enzima denominada deoxyribonucleotidyl transferasa que cataliza la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína, lo que permite observar a las células con un ADN fragmentado y su morfología de forma simultánea en el microscopio.³³

Esta técnica tiene la ventaja de que puede observarse en un microscopio óptico común sin sistema de fluores-

cost is very high and it can only be applied in cellular suspensions which can be limiting.

Annexin stain

This assay is based upon the cellular membrane alteration in which the phosphatidylserine that is present in the membranes in a normal fashion, is externalized when the cells are undergoing an apoptotic process, and thus the phosphatidylserine may join the annexin.

The disadvantages are the fact that the color can enter any cell that has a loss of membrane integrity and that it must not be used in permeable cells or in tissues embedded in paraffin; nevertheless, it has the advantage that it allows the examination of a large amount of cells.¹⁷

Acknowledgements

I would like to thank doctors Edda Scuitto and Gladis Fragoso for their unconditional support, motivation and patience in the preparation of this paper and especially Doctor Aline Schueneman de Aluja for her valuable comments and suggestions, as well as Patricia Lopez Perez and Maria Isabel Aguilar for her technical assistance in the review of this text. I also thank Conacyt of Mexico for the grant given to the author.

encia; se considera como una metodología cuantitativa, tiene la desventaja de ser costosa y de que su extrema sensibilidad detecta fragmentación inducida por tóxicos merasas.¹⁸ Se puede aplicar tanto en suspensiones celulares como en tejidos procesados en parafina.

Citometría de flujo

La citometría de flujo permite detectar la intensidad de fluorescencia de las células mediante un dispositivo electrónico y mecánico denominado citómetro.¹⁹ En este aparato es posible analizar grandes cantidades de células en pocos minutos; adicionalmente existen técnicas que se basan en la medición del ADN, evaluación de la morfología, detección de fragmentación e incluso expresión de proteínas propias de apoptosis, que pueden ser evidenciadas, medidas y cuantificadas en una población celular. Se considera como una de las técnicas más sofisticadas.²⁰ Aunque es extremadamente sensible, su costo es muy alto y solamente puede aplicarse en suspensiones celulares, lo que es una limitante.

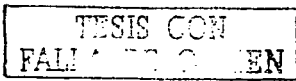
Tinción con anexina

Este ensayo se basa en alteraciones propias de la membrana celular en las cuales la fosfatidilserina presente en las membranas de manera normal se exterioriza cuando las células están en un proceso apoptótico, de esta manera la fosfatidilserina puede acoplarse con la anexina.¹⁷

Las desventajas son que se puede introducir el colorante en cualquier célula que tenga una pérdida de la integridad de la membrana y que no debe ser usado en células que han sido permeabilizadas o en tejidos incluidos en parafina; sin embargo, tiene la ventaja de que permite examinar grandes cantidades de células.¹⁷

Agradecimientos

Se agradece a las doctoras Edda Scuitto y Gladis Fragoso su apoyo incondicional, motivación y paciencia en la elaboración de este presente trabajo, y, en especial, a la doctora Aline Schueneman de Aluja sus valiosos comentarios y sugerencias, así como a Patricia Lopez Perez y a María Isabel Aguilar por su asistencia técnica en la revisión del presente texto, también se agradece al Conacyt de México la beca otorgada al autor.



References

1. Brighi F, Khar A. Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Bioess Rev* 1994;14:677-681.
2. Hale TA, Smith CA, Sutherland LC, Stenman VE, Longthorne VI, Cullhane AC, et al. Apoptosis: the molecular control. *Eur J Biochem* 1996;236:1-26.
3. Blackstone NW, Green DR. The evolution of a mechanism of cell suicide. *Bioessays* 1999;21:84-88.
4. Coullas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 2000;5:491-507.
5. Evans G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-1322.
6. Kaufmann IS. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. San Diego (CA): Academic Press; 1997.
7. Kerr JR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biology phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239.
8. Milligan CL, Schwartz LM. Programmed cell death during development of animals. In: editors. Cellular aging and cell death. New York: John Wiley & sons; 1996:181-208.
9. Asakura A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1505-1508.
10. Green DR, Cohen PM, Coullas L. Apoptosis: the molecular basis of cell death. New York: Cold Spring Harbor Press; 1991.
11. Coullas L, Morris RG, Willie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:293-305.
12. Obermeyer SK, Lazebnik A. Caspases: enzymes within a machine. *Cell* 1998;281:1312-1316.
13. Zlotovitsky B, Samah A, Cahon A. Orrenius. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:644-651.
14. Li J, Anderson P. Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ* 2000;7:889-892.
15. Winkler M, Martinovic. Apoptosis as seen through lens. *Apoptosis* 2000;5:203-209.
16. Adams M, Suzanne C. The Bcl-2 protein family: arbiters of cellular fate. *Science* 1998;281:1322-1326.
17. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington (DC): American society of Microbiology Press; 1995.
18. Green D, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1988;241:1309-1312.
19. Kawanago G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nature* 2000a;393:25-39.
20. Simon HU, Hara-Yeha A, Levi-Strauss J. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000a;5:415-418.
21. Yakes MF, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:514-519.
22. Arrowsmith GH. Structure and function of the p53 family. *Cell Death Differ* 1999;6:1169-1173.
23. Bendi A, Moskherche B. Biological significance and molecular mechanisms of p53-induced apoptosis. *Apoptosis* 1998;3:224-237.
24. Burns FT, El-Deiry WS. The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Phys* 1999;181:231-238.
25. Casko E, Laberman R, Strange R, Gershenov L. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differ* 2001;8:182-191.
26. Wani MA, Zhou QZ, El-Mahdi M, Wani AA. Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis* 1999;20:767-772.
27. Fisher DE. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. *Apoptosis* 2001;6:7-15.
28. Walker RD, Bend TP, Fatene RE, Harris CC, Makalowski W, Bostrom MS, et al. Evolutionary conservation and somatic mutation hot-spot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* 1999;19:211-218.
29. Zangmeister Wittke U, Simon HU. Apoptosis-regulation and clinical implications of cell death after 201. *S 537-544*.
30. Barber GS. Host defense, virus and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:1153-120.
31. Reshal M, Zhu Y, Pannell V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001;6:303-316.
32. Lorenz HM, Herrmann M, Winkler J, Gajda L, Kalden RJ. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* 2000;5:443-449.
33. Crowder MG. Flow cytometry: a practical approach. 2nd ed. Oxford (UK): Oxford University Press; 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FERNANDO IVAN FLORES PEREZ

Alumno
Doctorado en Ciencias Biomédicas

El Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas, a través de su Subcomité Académico que se reunió el día 03 de febrero del 2000, en uso de las atribuciones señaladas en los artículos 22 y 23 del Reglamento General de Estudios de Posgrado y del artículo 3 de las Normas Operativas del Programa, analizó y aceptó el Dictamen Positivo emitido el pasado día 12 de enero del 2000, por el Subcomité de Candidatura al Grado de Doctor constituido por los señores doctores:

Ana Flisser Steinbruch
Patricia Tato Zaldivar
Edda Sciutto Conde
Emilio Rojas del Castillo
Alfonso Cárabez Trejo

En consecuencia, por acuerdo de Comité Académico se le otorga a usted la denominación de

CANDIDATO A DOCTOR EN CIENCIAS

Aprovecho la oportunidad para exhortarlo a mantener su desempeño con el mismo nivel de excelencia para que de acuerdo a lo previsto por su Comité Tutoral y dentro de los plazos que establece el plan de estudios de nuestro programa, obtenga usted el grado doctoral.

Atentamente:

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F. a 08 de febrero del 2000.

EL COORDINADOR

DR. CESAR A. DOMINGUEZ PEREZ-TEJADA



Original 1. Alumno
Original 2. DGAE
Copia 1. Autor Académico
Copia 2. Expediente en la Coordinación con sello DGAE

TESIS CON
FALLA DE ENTRENAMIENTO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/071Jur/2003

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 15 de enero del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas del MVZ FLORES PÉREZ FERNANDO IVÁN, con número de expediente 12982717 y número de cuenta 8932039-2 con la tesis titulada: "EFECTOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS POR LA RADICIÓN GAMMA EN EL METACESTODO *DE Taenia solium*", dirigida por la Dra. Aline Schunemann de Aluja

PRESIDENTE	DRA. KAETHIE WILLIAMS MANNING
SECRETARIO	DRA. ALINE SCHUNEMANN DE ALUJA
VOCAL	DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR
VOCAL	DR. RAFAEL BOJALIL
VOCAL	DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
SUPLENTE	DRA. REGINA MONTERO MONTOYA
SUPLENTE	DR. JOSE JUAN MARTINEZ MAYA

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de enero de 2003

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina

Dr. Abel Moreno Carcamo
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado
Tutor(a) Dra. Aline Schunemann de Aluja.
Coordinación de Doctorado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Ciudad Universitaria D.F. 13 de marzo del 2003.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
UNAM.
PRESENTE.

Estimado Ing. Silva:

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacéstodo de *Taenia solium*" del alumno, FERNANDO IVAN FLORES PEREZ con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente.

Dra. Kaethe Willms Manning
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Ciudad Universitaria 23 enero de 2003

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium*" del alumno, FERNANDO IVAN FLORES PEREZ con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente.


Dra. Aline S. de Aluja
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS CON
FALLA DE NINGUN

Ciudad Universitaria 23 enero de 2003



Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium*" del alumno. FERNANDO IVAN FLORES PEREZ con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente.

Patricia In. Tato Z.
Dra. Patricia Tato Zaldivar
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

Cd. Universitaria D.F a 1 abril de 2003.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

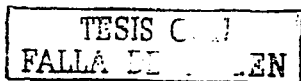
Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium* del alumno, FERNADO IVAN FLORES PEREZ con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,


Dr. Rafael Bojalil Parra.

Facultad de Medicina





Ciudad Universitaria 23 enero de 2003

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium*" del alumno, FERNANDO IVAN FLORES PEREZ con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente.

Dra. Abraham Landa Piedra
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Ciudad Universitaria a 19 de marzo de 2003.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium*" del alumno, Fernando Ivan Flores Perez con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,


Dr. José Juan Martínez Maya

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Ciudad Universitaria 23 enero de 2003

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Efectos biológicos inducidos por la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium*" del alumno, FERNANDO IVAN FLORES PEREZ con número de cuenta 8932039-2 y número de expediente 12982717, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente.

Dra. Regina Montoya Montero
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN