



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE UNA SUSTANCIA SECRETADA POR CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* SOBRE EL EPITELIO SEMINÍFERO DE RATONES MACHOS Y EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NADIA ZEPEDA CÓRDOVA

TUTOR PRINCIPAL: DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR: DRA. INGEBOR DOROTEA BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. MAYO, 2014



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 17 de febrero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **ZEPEDA CÓRDOVA NADIA** con número de cuenta **40305356-4** con la tesis **"Efecto de una sustancia secretada por cisticercos de *Taenia crassiceps* sobre el epitelio seminífero de ratones machos y en la proliferación de linfocitos"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO**:

Presidente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR
Secretario: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Suplente: DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN
Suplente: DRA. LILIAN HERNÁNDEZ MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de abril de 2014.

María del Coro Arizmendi Arriaga
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad de seguir preparándome académica y profesionalmente.

Al apoyo económico recibido por el CONACyT, número de becario: 262633

A mi tutor, Dr. José Luis Molinari Soriano, por permitirme ser parte de este proyecto y de este grupo de trabajo, por impulsarme a mantener una mente crítica y por motivarme en la búsqueda de nuevos retos en la investigación.

A los miembros de mi Comité Tutor, a la Dra. Ingebor Dorothea Becker Fauser y al Dr. Abraham Landa Piedra por sus sugerencias y su apoyo durante el desarrollo de mi trabajo experimental.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar y por abrirme las puertas al conocimiento y a la investigación.

A los miembros del Jurado, el Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez, la Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar, el Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán y la Dra. Lilian Hernández Mendoza por su valioso tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y sus sugerencias para mejorar la redacción y presentación de la misma.

A mis papas; Ma. Esther Córdova Amores, por dejarme cometer mis propios errores y por ayudarme a combatir mis miedos y Arnulfo Zepeda Domínguez por impulsarme a alcanzar mis metas y por no interferir en mis decisiones. A ambos por todo su apoyo emocional y la confianza que me han dado para llegar a ser la persona que hoy soy.

A mis hermanos; Adrián por mantener ese optimismo de que las cosas siempre mejoraran, Raúl por ayudarme a ver la realidad cuando todo era confuso y Nushko por su cariño incondicional, por mantenerse siempre en contacto y por apoyarme desde la distancia.

A mis amigas: Lucia Mendez Sanchez por estar presente en todos y cada uno de los momentos importantes que han marcado mi vida, por compartir sueños, por impulsarme a conocer nuevos horizontes y por nunca perder la esperanza en mí. A Itzel Alejandra Llorente Gil por enseñarme a tener una visión crítica y objetiva de las cosas y mantener los pies sobre la tierra. A Violeta Martínez por su amistad incondicional, por ser mi cómplice desde la primaria y por transmitirme toda su generosidad. A Nuriney Mendoza Aguilar por enseñarme que en esta vida no todo es negro o blanco y que hay una gama de grises que podemos elegir. Además a Mónica V., Gaby M., Ana Laura G., Joshebed C., Karla C., Ariana S., Cristina G., Natalia G., Iniyu R., Verónica M. por acompañarme en esta travesía y por crecer juntas siempre hacia adelante.

A Natalia Copitin Ivanovna Niconova por todo su apoyo técnico y académico en la realización de mi trabajo dentro del laboratorio, por sus sugerencias, por brindarme su amistad y compartirme esa hermosa manera de ver la vida.

A Sandra Gerogina Solano Galvez por su tiempo, paciencia y ayuda en la realización de mis experimentos y por enseñarme a establecer mis prioridades.

A María Hepifania Martínez Hernandez por ayudarme a recordar mis pendientes y facilitarme lo necesario para hacer mis experimentos.

A Gabriela Valdez por ayudarme con todos los trámites necesarios durante la maestría y por toda la paciencia que me tuvo.

A Sara Mendez Ibañez por su ayuda y sus atenciones en esta última etapa de obtención del grado de Maestra.

A María del Rocío Romualdo Martínez por su mejor disposición y apoyo durante mis tutorales.

INDICE

Contenidos	Página
Portada	I
Copia de oficio de empaste	II
Agradecimientos	III
Agradecimientos personales	IV
Índice	V
Lista de figuras y tablas	VII
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia crassiceps</i>	3
2. Anatomía fisiológica de los órganos sexuales masculinos del humano	5
3. Espermatogénesis	5
3.1. Proliferación mitótica	6
3.2. Meiosis	7
3.3. Empaquetamiento o espermiogénesis	7
4. Células de Sertoli.	9
5. Células de Leydig	11
6. Hormona leutinizante y Hormona folículo estimulante	12
7. Linfocitos B	14
8. Linfocitos T	16
9. Apoptosis	17
Antecedentes	20
Hipótesis	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
Metodología	24
1. Animales, parásitos y líquidos peritoneales.	24
2. Cromatografía de ultrafiltración en Sephadex G-50	24

3. Determinación de carbohidratos	25
4. Electroforesis	26
5. Tratamientos de los animales con el FM y con LpG-50s	27
6. Tinción con Hematoxilina-Eosina	27
7. Tinción con TUNEL	27
8. Tinción con azul de toluidina y microscopía electrónica	28
9. Obtención de linfocitos esplénicos	28
10. Determinación de linfocitos esplénicos	29
11. Ensayos de proliferación	30
12. Ensayo de proliferación de linfocitos esplénicos tratados con FM	30
13. Ensayo de proliferación de linfocitos de ratones Inoculados con FM	31
14. Análisis por Citometría de Flujo	31
15. Análisis estadísticos	32
Resultados	33
1. Ultrafiltración Sephadex G-50	33
2. Determinación de carbohidratos del FM	34
3. Electroforesis	35
4. Evaluación del daño al epitelio seminífero en ratones Inoculados con FM	36
5. Ensayo de apoptosis por TUNEL	37
6. Análisis del epitelio seminífero teñido con azul de toluidina	39
7. Estudio de las células del epitelio seminífero por Microscopía electrónica	40
8. Determinación del porcentaje de linfocitos esplénicos de ratones infectados con metacéstodos de <i>T. crassiceps</i>	43
9. Proliferación de linfocitos esplénicos de ratones inoculados Con 80 µg FM	44
10. Incorporación de [³ H]-Timidina por linfocitos esplénicos tratados con FM	46
11. Proliferación de linfocitos esplénicos incubados con 160 µg de FM	47
Discusión	49
Conclusiones	53
Abreviaturas	54
Bibliografía	57

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
1	Representación del proceso de mitosis y meiosis sufrida por las células germinales masculinas	7
2	Representación de las partes de un espermatozoide después de haber pasado por el proceso de empaquetamiento y espermiogénesis	8
3	Representación gráficas de las estructuras de un túbulo seminífero y el tejido intersticial que lo circunda	12
4	Representación esquemática de los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-testicular y la regulación endócrina de la espermatogénesis	13
5	Fases por las que atraviesan las células germinales masculinas de un ratón	14
6	Perfil de elución de líquidos peritoneales de ratones infectados con metacéstodos de <i>T. crassiceps</i> y ratones sanos, ultrafiltración por Sephadex G-50	33
7	Espectro de absorbancia del FM y del LpG-50s	34
8	Curva patrón de ribosa	35
9	Ensayo de electroforesis de los picos I y II productos del Sephadex G-50	36
10	Micrografías representativas del daño inducido en los túbulos seminíferos por el FM	37
11	Cortes transversales de testículo de un ratón control y de un ratón experimental teñidos con TUNEL	38
12	Micrografías representativas de los daños inducidos en los túbulos seminíferos de los ratones tratados con FM	40
13	Estudio por microscopía electrónica de transmisión de testículos de ratones controles y experimentales	41
14	Estudio por microscopía electrónica de transmisión de testículos de ratón control y experimentales	42
15	Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células esplénicas T y B de ratones infectados con metacéstodos de <i>T. crassiceps</i>	44
16	Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células esplénicas de ratones inoculados con 80 µg de FM	46
17	Incorporación de [³ H]-Timidina por linfocitos esplénicos cultivados con 160, 80 y 8 µg de FM	47
18	Análisis por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos esplénicos CD4+, CD8+ y CD19+, cultivados con 160 µg de FM y ConA	48

Tabla	Contenido	Pagina
I	Diluciones para la curva patrón de ribosa	26
II	Diluciones para determinar concentraciones de diferentes volúmenes del FM	26

RESUMEN

La cisticercosis por *Taenia crassiceps* en ratones es un modelo murino que se adoptó para tratar de dilucidar los efectos que causa la infección por *Taenia solium* en el humano. En estudios anteriores se ha observado que las secreciones/ excreciones del metacéstodo de *T. crassiceps* puede causar diversos daños en el hospedero como disminuir los niveles de testosterona e inhibir la proliferación de linfocitos. En el presente trabajo, el uso de microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión mostraron procesos degenerativos tanto en células germinativas como en células de Leydig en testículo de ratón inoculado subcutáneamente con Factor de Metacéstodo (FM) obtenido de metacéstodos de *Taenia crassiceps* mantenidos en peritoneo de ratón. Metodología: Ratones machos BALB/c de 21 días de edad, fueron inoculados con FM cada 4 días durante 28 días. Cortes de testículo embebido en parafina así como cortes finos de testículo embebido en Epon fueron teñidos con H/E y con citrato de plomo y observados en microscopio de luz y microscopio electrónico respectivamente. Cortes de testículo en parafina se tiñeron con TUNEL para estudios de ADN y apoptosis. Se incluyeron ratones testigo inoculados con líquido peritoneal de ratones sanos. Se estudió también la actividad biológica del FM sobre linfocitos de bazo de ratón. Resultados: Todos los estudios de microscopía mostraron una completa desorganización de la histoarquitectura del epitelio seminífero del ratón tratado con FM. La tinción con TUNEL mostró apoptosis generalizada tanto dentro de los túbulos seminíferos como en células del tejido intersticial (células de Leydig). El estudio de microscopía electrónica mostró una intensa degeneración de todas las células germinativas y de las somáticas (células de Leydig y Sertoli). Finalmente, una gran infiltración de macrófagos fue observada en la luz de los túbulos seminíferos. Los linfocitos esplénicos de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* se vieron significativamente disminuidos. De la misma manera, los linfocitos CD4+ y CD19+ de ratones sanos tratados con el FM se encontraron disminuidos y las cuentas por minuto de [³H]-Timidina bajaron de manera significativa en comparación a las células testigo. Estos datos sugieren que el FM debe de estar produciendo efectos de inmunosupresión en el ratón y la destrucción celular generalizada del epitelio seminífero podría ser compatible con un estado de castración parasitaria.

ABSTRACT

The cisticercosis by *Taenia crassiceps* in mice is a murine model adopted to try to elucidate the effects caused by *Taenia solium* infection in humans. In previous studies it has been observed that the secretions/excretions of *T. crassiceps* metacestode can cause some damage to the host as decrease testosterone levels and inhibit lymphocyte proliferation. In this project, using light and transmission electron microscopy, degenerative processes were observed either in germinative cells or somatic cells (Leydig and Sertoli cells) of mice inoculated with *Taenia crassiceps* metacestode factor (FM) which was obtained from peritoneal fluids of mice infected with *T. crassiceps* metacestodes. Methods: The 21 day old mice BALB/c were inoculated with FM every 4 days during 28 days. Parafine and epon cuts of testicle from experimental and control mice were observed under light microscope and electron microscope respectively. For DNA and apoptosis parafine cuts with testicle tissues were stained with TUNEL. A control group of mice was inoculated with peritoneal fluid of healthy mice. The biological activity of FM over healthy mouse spleen lymphocytes was also studied. Results: All microscopy studies on cross-sections of seminiferous tubules of infected mice showed a complete disorder in its histoarchitecture. The stain with TUNEL showed a generalized apoptosis inside of seminiferous tubules as well as in interstitial tissue (Leyding cells). Electron microscope studies evidenced an intensive degeneration in all germinative and somatic cells (Leyding and Sertolies cells). Finally a great number of infiltrated microphages was observed in the lumen of the seminiferous tubules. The splenic lymphocytes of mice infected with metacestodes of *T. crassiceps* were significantly diminished. The experiments in which tritiated thimidine was used as a marker showed an important decrease in number of healthy mice CD4+ and CD19+ lymphocytes treated with FM with respect to control cells. The results suggested that the FM must produce effects of immunosuppression in mice. The generalized cellular destruction of the seminiferous epithelium could be compatible with a state of parasitic castration.

INTRODUCCIÓN.

1. *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*.

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria de gran importancia en nuestro medio ocasionada por *Taenia solium*, parásito de la clase cestoda del Phylum Platyhelminthes, de la familia *Taenidae*, causante de la taeniosis humana en su estadio adulto y de la cisticercosis en su estadio larvario en humanos y en cerdos (Schmidt et al. 1988). La prevalencia es elevada en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, Asia y África, y se está incrementando en países industrializados debido a la inmigración (Evans et al. 1997), en México presenta la mayor seroprevalencia en las regiones centro occidental y sureste del país (Larralde et al. 1990).

La cisticercosis causada por metacéstodos de *T. solium*, es una infección que afecta comúnmente a cerdos, humanos y con menos frecuencia a otros animales como perros (Ito et al. 2002). El ser humano se infecta al consumir alimentos contaminados con huevos de *T. solium* y desarrolla la cisticercosis. La neurocisticercosis (NCC) la entidad clínica más importante en el humano es más frecuente en las zonas rurales o conurbadas que rodean a las grandes ciudades que existen en el país y que generalmente implican diferentes condiciones sociales, económicas, culturales y sanitarias.

La cisticercosis humana ocurre en el humano en diferentes órganos, como el corazón, musculo esquelético y tejido graso subcutáneo, pero se vuelve sintomática casi exclusivamente en el sistema nervioso central (SNC) o en el ojo (Nash et al. 1984). Cuando el cisticerco se encuentra en el SNC es causante de la Neurocisticercosis (NCC) que se caracteriza por diversos signos y síntomas como:

cefalea, convulsiones, trastornos en la conducta e hipertensión intracraneana entre los más importantes. Las manifestaciones clínicas causadas por la cisticercosis dependen del número, localización, tamaño y viabilidad o estado de degeneración del metacéstodo. Frecuentemente hay múltiples metacéstodos en varios lugares y estadios por lo que los síntomas clínicos pueden variar particularmente en cada caso (García et al. 2005). En el SNC los parásitos se pueden alojar en el espacio subaracnoideo, en los ventrículos cerebrales y en el parénquima del encéfalo y medula espinal; y pueden encontrarse en diferentes etapas: vesicular, coloidal, nodular granular y nodular calcificada. Además del impacto en la salud humana, esta enfermedad, implica también aspectos socioeconómicos a consecuencia de la discapacidad del paciente así como de los costos de su diagnóstico y tratamiento. En países en donde la cisticercosis es endémica, esta afecta entre el 2 y 4 % de la población (Del Brutto OH et al., 1988). En México se ha reportado que el 11% de las consultas neurológicas se deben a la neurocisticercosis (Vazquez et al., 1992) por lo que, su elevada frecuencia y las graves consecuencias que ocasionan, justifican la búsqueda de estrategias que permitan conocer mejor su patogenia en un modelo animal. Por ello, se adoptó un modelo de cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*.

T. crassiceps pertenece al phylum Platyhelminthes, clase Cestoda, cuya fase adulta habita en el intestino del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) de Europa y Norteamérica, aunque también se han encontrado en otros cánidos como coyotes, perros y ocasionalmente en gatos (Gourbal et al. 2001, Wünschmann et al. 2003). En diversos estudios se ha encontrado que en ratones infectados con *T. crassiceps* los niveles de testosterona se encuentran disminuidos (Larralde et al., 1995), además,

en investigaciones recientes de nuestro grupo de trabajo se encontró que ratones infectados con *T. crassiceps* presentan un intenso daño en el epitelio seminífero (Zepeda et al., 2010) por lo que el avance en la investigación de la relación huésped parásito en este tipo de infección es de gran importancia.

2. Anatomía fisiológica de los órganos sexuales masculinos del humano.

El testículo está compuesto por hasta 900 túbulos seminíferos espirales, cada uno de más de 0.5 metros de longitud, en los que se forman los espermatozoides. Estos se vacían después al epidídimo, otro tubo espiral de unos 6 metros de longitud. El epidídimo se abre al conducto deferente, que se ensancha para formar la ampolla del conducto deferente inmediatamente antes de su desembocadura en el cuerpo de la glándula prostática. Dos vesículas seminales, localizadas una a cada lado de la próstata desembocan en el extremo prostático de la ampolla y el contenido de la próstata y de las vesículas seminales pasa al conducto eyaculador, que atraviesa el cuerpo de la glándula prostática y van desde la próstata al conducto eyaculador y desde él a la uretra prostática. Por último, la uretra es el eslabón final de la comunicación del testículo con el exterior. La uretra está provista de moco procedente de numerosas glándulas uretrales diminutas localizadas en toda su longitud y todavía mayor en la glándulas bulbouretrales (glándulas de Cowper) bilaterales situadas cerca del origen de la uretra (Guyton 2006).

3. Espermatogénesis.

Cerca de 250 m de túbulos seminíferos productores de espermatozoides están empacados en los testículos. Dos tipos de células funcionalmente importantes se

encuentran presentes en estos túbulos: las células germinales, que se encuentran en varios estados de desarrollo, y las células de Sertoli, que proveen el apoyo crucial para la espermatogénesis (Guyton 2006).

Las espermatogonias, células inmaduras que contienen una población de células madre, proliferan varias veces y luego se diferencian en espermatocitos meióticos. Después de la meiosis, las células secuencialmente se convierten en espermátides redondas, luego espermátides alargadas y finalmente en espermatozoides que se liberan al lumen de los túbulos. Durante la espermatogénesis, las células germinales en diferentes etapas de desarrollo forman grupos que se diferencian sincrónicamente. Existen tres estados principales: proliferación mitótica, meiosis y empaquetamiento.

3.1. Proliferación mitótica.

Las espermatogonias ubicadas en la capa externa del túbulo se dividen mitóticamente de forma continua y todas las células nuevas llevan un juego completo de cromosomas (40 cromosomas en los ratones) idénticos a las células parentales. Después, una de las células hijas permanece en el borde externo del túbulo como una espermatogonia indiferenciada, manteniendo la línea de las células germinales. Las otras células hijas comenzarán a moverse hacia el lumen. Las células hijas formadoras de espermatozoides se dividen mitóticamente dos veces para formar cuatro espermatocitos primarios, los cuales entran a una fase de reposo durante la cual se duplican los cromosomas y las cromátidas dobles permanecen juntas para la preparación de la primera división meiótica (Guyton 2006) (Fig. 1).

3.2. Meiosis

Durante la meiosis, cada espermatocito primario (40 cromosomas) forma dos espermatocitos secundarios (20 cromosomas dobles) durante la primera división meiótica, creando cuatro espermátides (20 cromosomas sencillos) como resultado de la segunda división meiótica (Fig. 1).

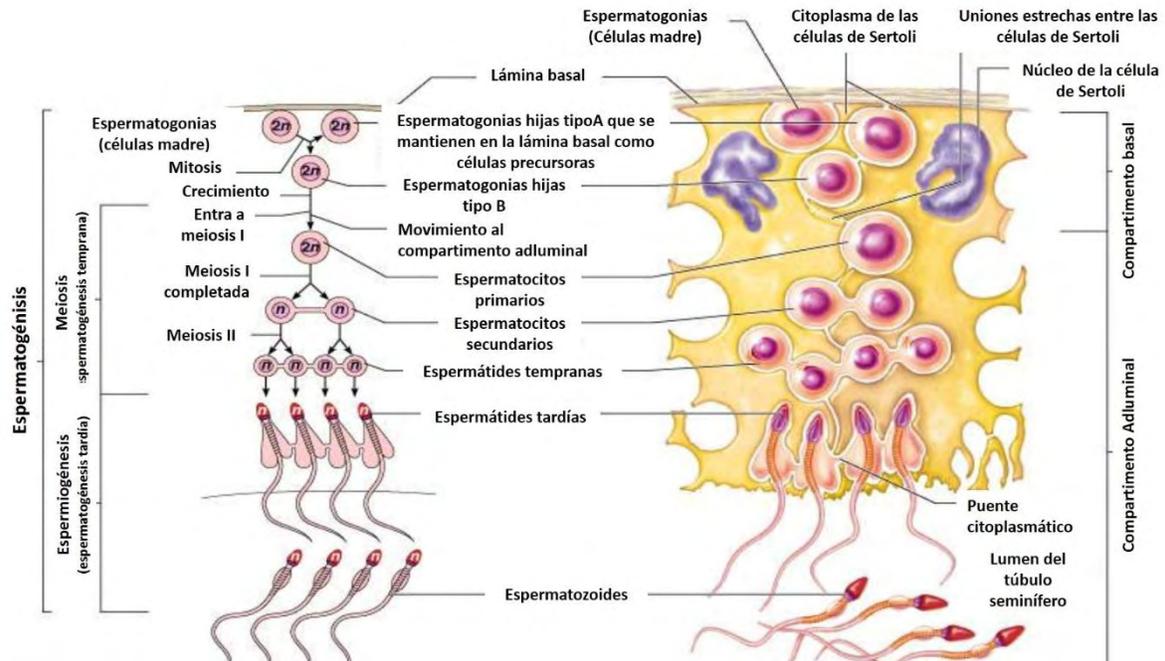


Figura 1. Representación del proceso de mitosis y meiosis sufrida por las células germinales masculinas. Modificado de <http://dc345.4shared.com/doc/PkYErN8r/preview.html>

3.3. Empaquetamiento o Espermiogénesis.

Cuando las espermátides se forman por primera vez, tienen todavía las características habituales de las células epiteliales, pero pronto cada espermátide comienza a alargarse para formar los espermatozoides, cada uno compuesto por cabeza y cola. La cabeza está formada por el núcleo celular condensado revestido tan sólo de una fina capa de citoplasma y de membrana celular en torno a su superficie. En la parte extrema de los dos tercios anteriores de la cabeza existe una capa gruesa denominada acrosoma que contiene enzimas similares a las que se

encuentran en los lisosomas de las células típicas, incluida la hialuronidasa y poderosas enzimas proteolíticas. Estas enzimas desempeñan funciones importantes, pues permiten al espermatozoide entrar en el óvulo fecundado.

La cola del espermatozoide denominada flagelo, tiene tres componentes principales: 1) un esqueleto central constituido por 11 microtúbulos denominados en conjunto axonema, 2) una fina membrana celular que reviste el axonema y 3) una serie de mitocondrias que rodean el axonema de la porción proximal de la cola (denominada cuerpo de la cola) (Fig. 2).

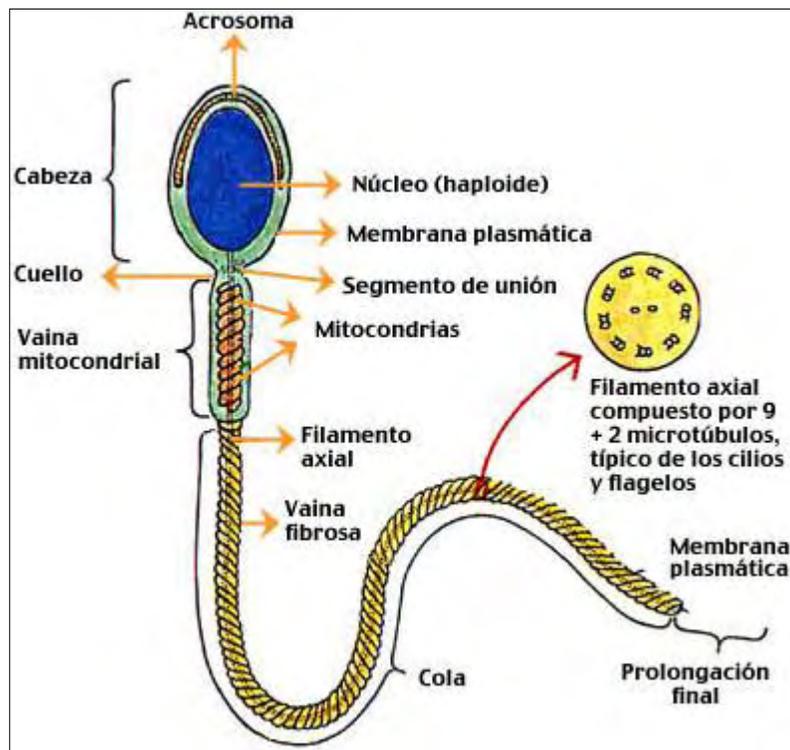


Figura 2. Representación de las partes de un espermatozoide después de haber pasado por el proceso de empaquetamiento y espermiogénesis. Tomado de http://www7.uc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval8.2.3.1.html

En el ratón, los espermatozoides tienen una cabeza en forma falciforme que está compuesta por cuatro partes principales: el núcleo, el sistema acrosómico, la teca perinuclear y la membrana plasmática (Clermont et al. 1993, Eddy E. et al. 2006). El núcleo ocupa la mayor parte del volumen de la cabeza cuyo genoma haploide

contiene una gran cantidad de protaminas. El sistema acrosómico consiste de dos distintas regiones, la capa acrosomal (también conocida como el propio acrosoma o acrosoma anterior) y el casquillo de la cabeza (también conocida como segmento ecuatorial o acrosoma posterior). La capa acrosomal contiene enzimas digestivas que facilitan el paso de los espermatozoides a través de los cúmulos de capas de células en la zona pelúcida durante la fertilización (Jin et al. 2011). El casquillo de la cabeza es mucho más delgado y cubre gran parte de la superficie lateral de la cabeza (Lalli. et al. 1981). La teca perinuclear es una estructura del citoesqueleto que cubre la mayor parte del núcleo e incluye la región subacrosomal (también conocido como perforador) y la vaina postacrosomal (también conocida como lámina densa postacrosomal). En los ratones, el perforador es en forma de barra triangular curvada en el ápice de la cabeza de los espermatozoides (Lin et al 2013).

4. Células de Sertoli.

La espermatogénesis está influenciada por muchos factores como las hormonas, las interacciones célula-célula, el medio ambiente y muchos otros factores. Uno de los más importantes son las células de Sertoli (CS), las cuales juegan un papel importante en el soporte de las espermatogonias. Se ha demostrado que la comunicación entre las células germinales y las CS garantizan la producción de espermatozoides saludables (Monses et al. 2000)

Sin el soporte físico y metabólico de las CS, la diferenciación, la meiosis y la transformación de los espermatozoides no ocurriría (Sharpe et al. 1994). Además facilitan el progreso de la espermatogénesis y son responsables de la fagocitosis de las células germinales degeneradas y sus restos (Murk y Cheng 2004).

Las CS son células epiteliales que forman un anillo que se extiende de la superficie exterior del túbulo hacia el lumen del túbulo seminífero (Monses et al. 2000; Hua Zang et al. 2013). Cada CS cubre toda la distancia de la membrana superficial externa del túbulo seminífero hacia el lumen lleno de líquido. Están conectadas por uniones estrechas debajo de la membrana externa. Los espermatozoides en desarrollo están entre las CS adyacentes con las espermatogonias yaciendo en el perímetro externo del túbulo, fuera de las uniones estrechas. Estas células sólo se replican durante la etapa fetal, neonatal y la vida prepuberal. La proliferación está controlada por la hormona folículo estimulante (FSH) y termina con la maduración de las CS en la etapa de la pubertad (Ichihara et al., 1993). Durante la espermatogénesis, los espermatozoides en desarrollo que surgen de la actividad mitótica espermatogonial pasan a través de las uniones estrechas que los separan transitoriamente para crear un camino para ellas; después migran hacia el lumen en asociación cercana con las CS adyacentes (Fig. 4). Las CS realizan las siguientes funciones: 1) Evitan que las sustancias de la sangre pasen entre las células debido a las uniones tipo gap que hay entre la CS forman una barrera hematotesticular. 2) Proveen de nutrientes a los espermatozoides en desarrollo. 3) Fagocitan el citoplasma de las espermatídes durante su remodelación y destruyen células germinales defectuosas que no maduran. 4) Secretan una proteína de unión a testosterona manteniendo un alto nivel de esta hormona dentro del lumen del túbulo seminífero, en donde la concentración es más alta que en la sangre ya que es esencial para mantener la producción de espermatozoides. 5) Son el sitio de acción para el control de la espermatogénesis tanto por la testosterona como por la FSH; además liberan otra hormona, inhibina, que regula negativamente la secreción de

la FSH. 7) Durante el desarrollo fetal, también secretan el factor inhibidor del conducto de Müller (Guyton 2006).

5. Células de Leydig.

El desarrollo de las células de Leydig (CL) es crítico para el desarrollo del género masculino a través de la vida, para la diferenciación sexual secundaria y para la espermatogénesis. Durante el desarrollo fetal, la población de las CL es vital para iniciar la virilización de los embriones para la formación del epidídimo y las vías deferentes y para el patrón de los genitales externos masculinos (De Falco et al. 2013). Las CL se encuentran en el tejido conjuntivo (tejido intersticial) entre los túbulos seminíferos (Fig. 3). Estas células se encargan de producir testosterona, la cual es una hormona esteroidea derivada del colesterol. Una vez producida, parte de la testosterona es secretada en la sangre y otra porción significativa se va hacia el lumen de los túbulos seminíferos. Para ejercer sus efectos, se unen con los receptores para andrógenos en el citoplasma de las células blanco y activa diversos factores de transcripción de genes que dirigen la síntesis de nuevas proteínas que llevan a cabo la respuesta celular deseada. La testosterona tiene diversos efectos sobre el sistema reproductivo antes de nacer: sobre tejidos sexuales, promueve el crecimiento y la maduración del sistema reproductivo en la pubertad; otros efectos están relacionados con la reproducción desarrollando la conducta sexual en la pubertad y la secreción de la hormona gonadotrofina; además de acciones no reproductoras como el cierre de placas epifisiarias después de haber sido convertida a estrógeno por la aromatasa (Guyton 2006).

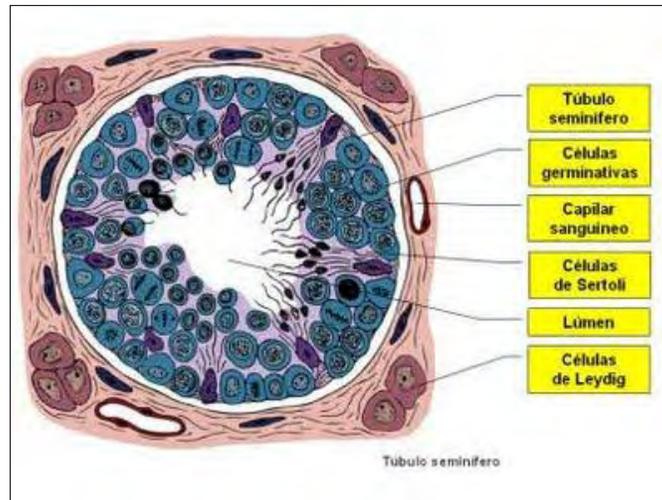


Figura 3. Representación gráfica de la estructura de un tubo seminífero y el tejido intersticial que lo circunda. <http://aprenderbiologiacomapauleasuzi.blogspot.mx/2009/10/sistema-reproductor-masculino-este.html>

6. Hormona Luteinizante y Hormona Foliculoestimulante.

Los testículos están controlados por dos hormonas gonadotróficas secretadas por la hipófisis anterior: la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y la hormona foliculoestimulante (FSH, por sus siglas en inglés) ambas producidas por el mismo tipo celular, el gonadótrofo. Estas hormonas actúan sobre las gónadas al activar el AMPc, esto ocurre en ambos sexos.

Como se observa en la figura 4, la LH actúa sobre las células de Leydig para regular la secreción de la testosterona y la FSH actúa sobre las CS para promover la espermatogénesis. La secreción de LH y FSH es inducida por una hormona hipotalámica, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH, por sus siglas en inglés), sin embargo son secretadas en cantidades diferentes debido a dos factores:

1) La testosterona actúa a manera de retroalimentación negativa para inhibir su secreción disminuyendo la liberación de GnRH en el hipotálamo y por lo tanto inhibe indirectamente la liberación de LH y FSH. Además tiene un efecto directo sobre la hipófisis anterior que reduce selectivamente la secreción de la LH. 2) La inhibina B

es una hormona secretada por las CS y actúa directamente sobre la hipófisis anterior para inhibir selectivamente la secreción de FSH.

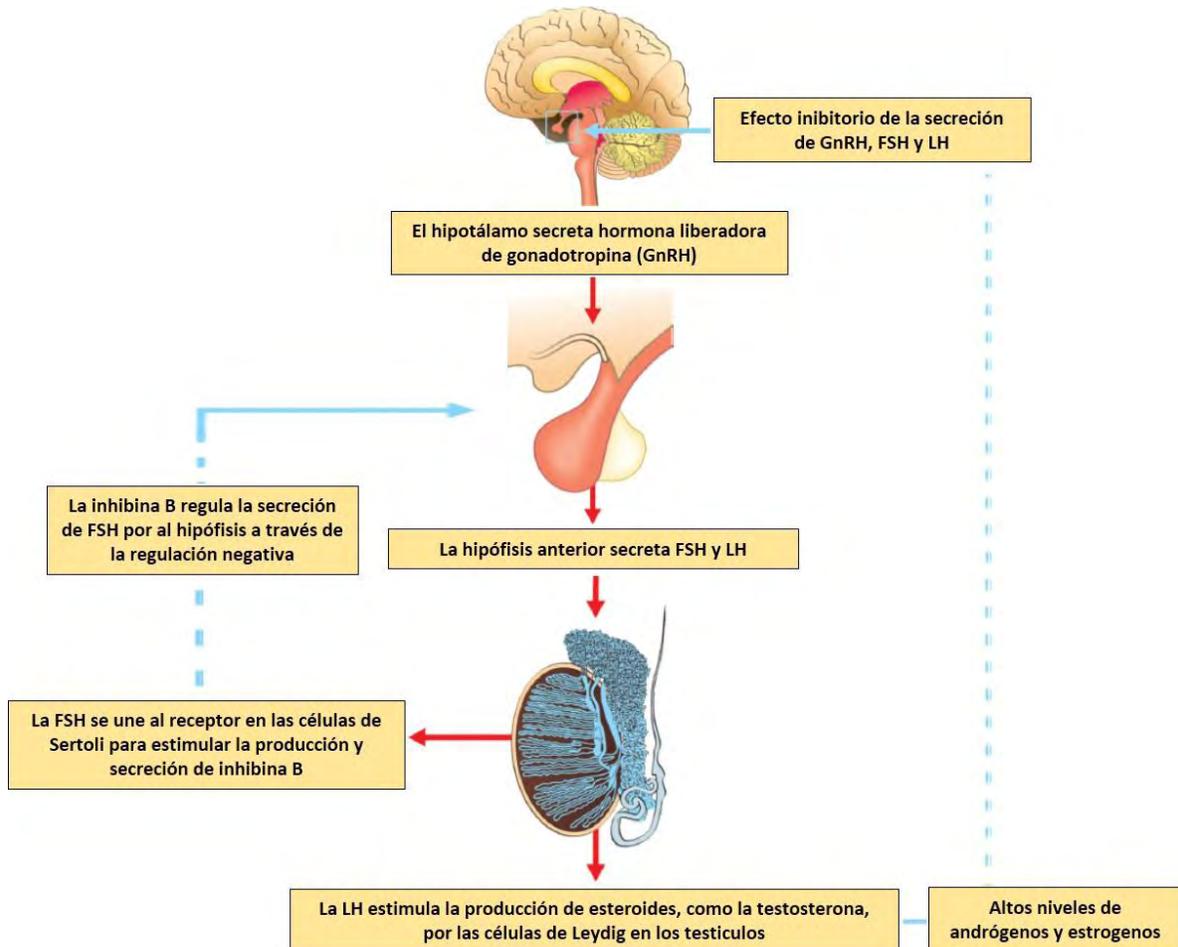
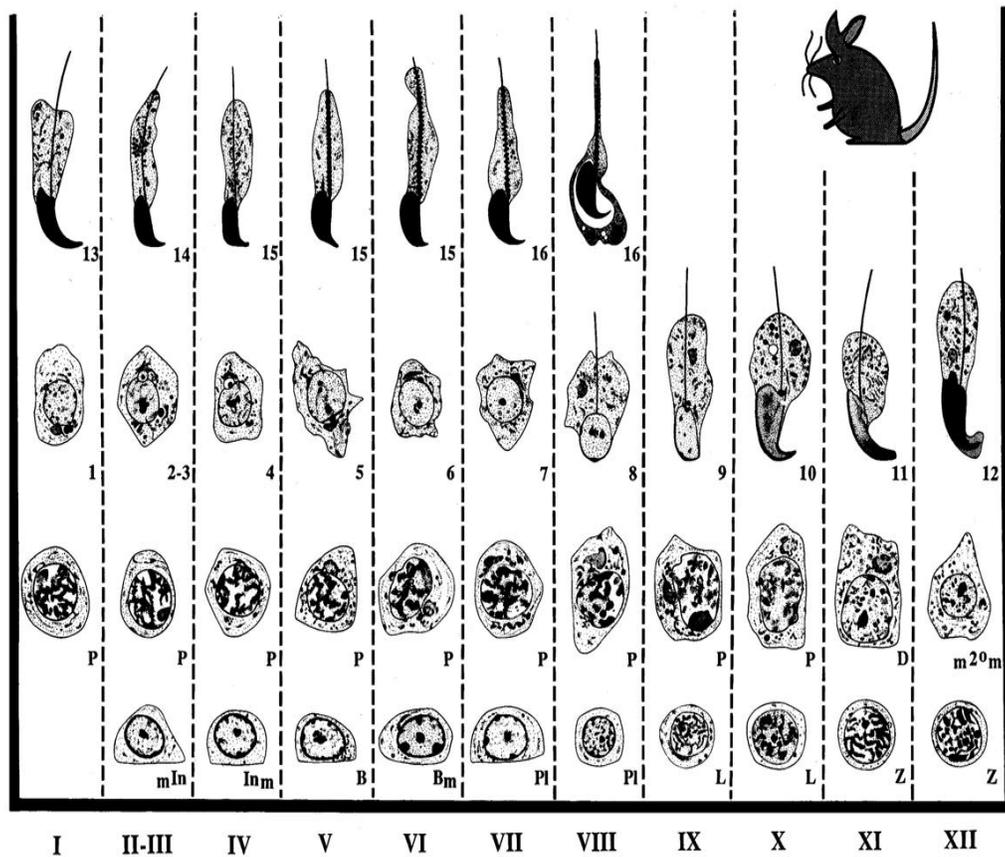


Figura 4. Representación esquemática de los componentes de eje hipotálamo-hipófisis-testicular y la regulación endocrina de la espermatogénesis (Modificado de Fraietta R et al. 2013)

En los ratones, los túbulos seminíferos miden 200 mm de diámetro aproximadamente y se estima que existen de 15 a 20 túbulos en cada testículo con una longitud total de 2 metros (Guzman et al. 2005). Un ciclo espermático completo dura 35 días (Franca, et al 1998). El proceso de espermatogénesis es muy productivo, ya que teóricamente una espermatogonia es capaz de producir 4096 espermatozoides maduros en ratas (Rusell, et al.1990). Sin embargo, la muerte celular durante el proceso de maduración reduce sustancialmente la producción

final. En el testículo de ratón han sido identificadas 12 asociaciones de células germinales conocidas como estadios epiteliales seminíferos I-XII y están dispuestos en orden a lo largo de los túbulos donde muestran continuidad espacial basada en los pasos de diferenciación (Hasegawa y Saga 2012). En la figura 5 se muestra las fases de maduración de las células germinales murinas desde la espermatogonia hasta el espermatozoide



STAGES OF THE CYCLE

Figura 5. Fases por las que atraviesan las células germinales masculinas de un ratón (França, et al. 1998)

7. Linfocitos B.

El proceso de desarrollo que tiene como resultado la producción de Linfocitos B (LB), células plasmáticas y de memoria puede dividirse en tres amplias etapas:

generación de LB maduros inmunocompetentes (maduración), activación de los LB maduros cuando interactúan con el antígeno y diferenciación de los LB activados en plasmáticas y de memoria. En muchos vertebrados, incluidos los ratones, la médula ósea genera LB. Este proceso es una secuencia ordenada de reordenamientos del gen Ig que progresa en ausencia de antígenos. Ésta es la fase Independiente de antígeno en el desarrollo de los LB.

El desarrollo de los LB se inicia cuando las células madre linfoides se diferencian hacia el linaje de LB distintivo, célula B progenitora (pro-B), que expresa una fosfatasa de tirosina transmembranal denominada CD45R (B220 en ratones). La maduración del LB depende del reordenamiento del ADN de la inmunoglobulina en células madres linfoides. Lo primero que ocurre en la etapa de célula pro-B es el reordenamiento génicos de los 3 segmentos que constituyen la región variable de la cadena pesada un segmento D_H se recombina con un J_H y luego D_HJ_H se recombinan con un segmento V_H para formar la región variable VDJ. Una vez que termina el reordenamiento de la cadena pesada, la célula se clasifica como célula pre-B. La continuación del desarrollo de una célula pre-B a un LB inmaduro requiere un reordenamiento génico productivo de la cadena ligera, éste compromete al LB ahora inmaduro con una especificidad antigénica particular determinada por la secuencia VDJ de la cadena pesada de la célula y la VJ de la cadena ligera. Los LB inmaduros expresan mIgM (IgM de membrana) en la superficie celular junto el heterodímero Ig- α Ig- β , de modo que generan un receptor de célula B (BCR) completamente capaz para iniciar la señalización después de la fijación de antígeno. La fase del desarrollo del LB en la médula ósea culmina con la producción de una célula B inmadura que porta inmunoglobulina M. Una vez que los LB abandonan la

medula ósea, ocurren la activación, proliferación y diferenciación en la periferia y se requiere antígeno.

8. Linfocitos T.

Las células T progenitoras comienza a migrar de los sitios iniciales de la hematopoyesis al timo alrededor del día 11 de la gestación en ratones. La maduración de la célula T incluye reordenamiento de los genes de TCR de la línea germinal y la expresión de diversos marcadores de membrana. El desarrollo de las células T comienza con la llegada de pequeñas cantidades de precursores linfoides que migran desde la sangre hacia el timo, donde proliferan, se diferencian y experimentan procesos de selección que dan por resultado el desarrollo de células T maduras. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ salen del timo y pasan a la circulación como células en reposo en la etapa G0 del ciclo celular y se denominan células T vírgenes. Hay casi el doble de células T CD4⁺ en comparación con células T CD8⁺ en la periferia. Cuando una célula T virgen reconoce un complejo de antígeno y MHC en una célula presentadora de antígeno, dicho linfocito se activa y precipita una respuesta primaria. Unas 48 horas después de la activación, la célula T virgen crece hasta convertirse en un blastocito y comienza a experimentar ciclos repetidos de división celular. La activación de las células estimulan la entrada de la célula T en la fase G1 del ciclo celular y al mismo tiempo provocan la transcripción del gen para IL-2 y la cadena alfa del receptor IL-2 de alta afinidad (CD25). Esto induce a la célula T virgen activada a proliferar y diferenciarse. Las células T activadas de este modo se dividen dos a tres veces por día durante cuatro a cinco días, lo que crea una

extensa clona de células progenitoras, que se diferencian en poblaciones de células T de memoria o efectoras

9. Apoptosis

La muerte celular es una característica importante del desarrollo en todos los organismos multicelulares. Aunque la inducción de apoptosis incluye diferentes señales que dependen de los tipos celulares implicados, la muerte real de la célula es un proceso muy conservado entre vertebrados e invertebrados. La muerte de la célula comprende la activación de un grupo especializado de proteasas conocidas como caspasas. Se sabe que en los mamíferos hay cuando menos 14 proteasas de cisteína o caspasas, y todas las muertes celulares requieren la actividad de cuando menos un subconjunto de estas moléculas (Kindt et al. 2007)

La apoptosis puede proceder mediante dos vías distintas: intrínseca y extrínseca (Tait et al. 2010). La vía extrínseca es en donde se activan los receptores de muerte en la superficie de la célula. La vía intrínseca o mitocondrial está controlada por proteínas pro y antiapoptóticas de la familia BCL-2 dividida en 3 categorías (Chipuk et al. 2010). La primera incluye proteínas antiapoptóticas BCL-2, BCL-w, MCL-1, BFL-1 y BCL-Xl; estas proteínas previenen la apoptosis uniéndose y secuestrando las partes proapoptóticas. La segunda categoría incluye a las proteínas proapoptóticas (es decir que activan la apoptosis) como PUMA, Bim, Bid, Bad, Bik, Noxa y BMF. Y la tercera, son las efectoras como BAX y BAK y solo pueden ser activadas por las proteínas de la segunda categoría (Leshchiner et al. 2013)

La vía intrínseca es activada por estrés y otras señales que provocan la translocación de miembros pro-apoptóticos de la familia bcl-2, como Bax, a la

mitocondria, lo que provoca la liberación de factores mitocondriales, pérdida de potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. El citocromo C junto con Apaf-1 y la procaspasa 9 forman el apoptosoma. Este último facilita el procesamiento de la procaspasa 9, la cual inicia la activación de las caspasas efectoras, entre las más importantes se encuentra la caspasa 3. También hay liberación de la proteína que antagoniza a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) denominada Smac/DIABLO (Labeledzka et al. 2006). La irradiación, los glucocorticoides y ciertos quimioterápicos pueden inducir la apoptosis de células diana por el mismo mecanismo bioquímico (Abbas et al. 2004).

La vía extrínseca es desencadenada por una señal pro-apoptótica que involucra los receptores de muerte de la superficie celular como TNF y FAS. Los receptores inductores de muerte mejor definidos pertenecen a la familia de las proteínas con dominios extracelulares homólogos ricos en cisteína (Singh et al. 1998).

Un ejemplo de la vía extrínseca es cuando Fas se une a su ligando Fas (FasL) lo cual provoca la trimerización de Fas. Esta unión conduce al reclutamiento del complejo DISC (death inducing signaling complex). Este complejo cuenta con proteínas adaptadoras que permiten la unión de la procaspasa 8 favoreciendo su activación y a su vez la activación de las caspasas 3, 6 y 7 (Hengartner, 2000 y Thompson, 1995). La caspasa 8 también puede activar Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) e inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 para activar la vía intrínseca (Thompson, 1995). Con los métodos actuales de biología molecular, inmunohistoquímica y microscopía electrónica es posible diferenciar las dos vías de

la apoptosis y con ello estudiar el papel que desempeñan en los procesos normales y patológicos (Majno et al. 1995).

Las células T utilizan dos vías diferentes para activar caspasas. En células T periféricas, la estimulación por antígeno da lugar a la proliferación de células T estimuladas y la producción de varias citocinas que incluyen IL-2. Una vez que se activan, las células aumentan la expresión de dos proteínas de superficie celular fundamentales relacionadas con la muerte de células T, Fas y FasL. Cuando Fas se une a su ligando, FasL, se recluta FADD (proteína relacionada con Fas con dominio de muerte) y se une a Fas, a lo que sigue la incorporación de procaspasa 8, una forma inactiva de caspasa 8. La vinculación de FADD y procaspasa 8 ocasiona el rompimiento proteolítico de procaspasa 8 hasta su forma activa; luego la caspasa 8 inicia una cascada proteolítica que lleva a la muerte de la célula (Kindt et al. 2007). Fas y Fas L son miembros de una familia de receptor/ligando relacionada que incluye el factor de necrosis tumoral (TNF) y su ligando TNFR. Al igual que Fas y FasL, TNFR unido a membrana interactúa con TNF para inducir apoptosis activando la caspasa 8 seguida de la activación de caspasas efectoras como la caspasa 3.

ANTECEDENTES

Se sabe que en infecciones experimentales murinas con cisticercos de *Taeniidae* se alteran funciones estructurales y reproductivas del hospedero. Rikihisa et al., (1985) reportaron que una sustancia de excreción/secreción de *Taenia taeniaeformis* redujo de manera significativa la producción de testosterona, *in vitro*, en las células de Leydig de ratas. Más tarde, estudios con *T. taeniaeformis* o *T. crassiceps* reportaron que los niveles de testosterona en suero y testicular disminuyeron significativamente en ratas y ratones infectados, respectivamente (Lin et al., 1990; Larralde et al., 1995). En estudios histopatológicos de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* se encontró atrofia testicular y una gran cantidad de células inflamatorias infiltradas (Morales-Montor et al., 1999; Rodriguez-Dorantes et al., 2010). Recientemente se han hecho estudios del epitelio de los túbulos seminíferos en testículos de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* en donde se encontró un daño intenso en la histoarquitectura y una apoptosis generalizada en la células de los túbulos seminíferos, acompañado de una infiltración de macrófagos al lumen del túbulo (Zepeda et al., 2011). Con respecto a los productos de excreción/secreción de *T. solium* que afectan la proliferación de linfocitos y dañan el ADN de linfocitos (Molinari et al., 1990; Tato et al., 1995), se aisló una sustancia de bajo peso molecular (<3500d) secretada por metacéstodos de *T. solium* llamado “factor de metacéstodos”. Esta sustancia disminuyó la proliferación de los linfocitos esplénicos humanos y murinos estimulados con lectinas, además de que redujo la reacción inflamatoria que había alrededor de metacéstodos de *T. solium* implantados subcutáneamente en ratones (Tato et al., 1996). Más tarde, Arrechavaleta et al., (1998) reportaron que este factor

de metacéstodos de *T. solium* produjo una reducción en la producción de IL-2, INF γ , IL-4 y TNF α , *in vitro*. Finalmente, Herrera et al., (2003) encontraron que el factor de metacéstodos indujo daños en el ADN en linfocitos humanos *in vitro*. Por otro lado, Spolski et al., (2001) reportó que las excreciones/secreciones producidas en una infección temprana por los metacéstodos de *T. crassiceps* suprimen la respuesta proliferativa de las células T y la reducción en la producción de INF γ e IL-4 *in vitro*. Estos datos sugieren que los *Taeniidae* producen sustancias que pueden afectar la respuesta inmune del hospedero e inducir, *in vivo*, daños estructurales y funcionales en tejidos de ambos sexos. En este proyecto de investigación se aisló una sustancia del líquido inflamatorio peritoneal de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps*, mediante una columna de Sephadex G-50 para saber si esta sustancia es la responsable de afectar la proliferación de linfocitos esplénicos, como se ha reportado en el caso de los productos de metacéstodos de *T. solium* (Molinari et al., 1990) y si produce la misma patología en los testículos del ratón, como la inducida por la infección de ratones machos con metacéstodos de *T. crassiceps* reportado por Zepeda et al., (2011).

En estudios anteriores en el laboratorio se encontró la actividad de serin y cistein proteasas en el pico I. Al enfrentar linfocitos esplénicos de ratón sano con cisticercos de *T. crassiceps* se observó un aumento significativo de la apoptosis, la cual disminuyó significativamente cuando los cisticercos se incubaron con E-64 (inhibidor de la cistein-proteasa). Esto sugiere que las proteasas que se encontraron en el pico I provocan un intenso daño en las células que se encuentran en el sitio de infección. Sin embargo se encontró que la infección con metacéstodos de *T. crassiceps* afecta el epitelio seminífero de los ratones lo que sugirió que lo que debía

estar causando este efecto tendría que ser una molécula de un peso molecular inferior al de las proteasas, capaz de llegar al epitelio seminífero. Por esta razón se escogieron y analizaron las fracciones del pico II. Los efectos de las fracciones del pico I se analizarán detalladamente en estudios posteriores.

HIPÓTESIS

Si el factor de metacéstodos de *T. solium* afecta la proliferación *in vitro* e *in vivo* de linfocitos esplénicos y el epitelio seminífero testicular de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* se encuentra dañado y con apoptosis, entonces una sustancia secretada por los metacéstodos de *T. crassiceps*, debe ser la responsable de afectar tanto la proliferación de los linfocitos como la histoarquitectura del testículo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el factor de metacéstodo secretado por los metacéstodos de *T. crassiceps* induce daño en el epitelio seminífero testicular de ratón así como apoptosis de las células del mismo y conocer si la sustancia afecta la proliferación de linfocitos esplénicos *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar sustancias de bajo peso molecular de secreciones de metacéstodos de *T. crassiceps*.
2. Determinar la concentración de carbohidratos del FM y conocer su absorbancia en un espectro de 230 a 300 nm de longitud de onda.
3. Hacer cortes histológicos de los testículos de los ratones tratados con el FM y teñirlos con diferentes técnicas para conocer el estado del epitelio seminífero tanto en ratones controles como experimentales, así como conocer la presencia de células apopóticas mediante el ensayo de TUNEL.
4. Analizar el daño en las células del epitelio seminífero por microscopía electrónica
5. Conocer si el FM afecta su proliferación de linfocitos esplénicos *in vivo* e *in vitro*.

METODOLOGÍA

1. Animales, parásitos y líquidos peritoneales.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 28 días de edad (20-22 g) que se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento con acceso a comida y agua *ad libitum*, siempre bajo los principios de los cuidados de animales de laboratorio y las leyes sobre el uso de animales (Bankowski y Hower-Jones, 1986).

Se utilizaron metacéstodos de *T. crassiceps* de la cepa WFU, mantenidos intraperitonealmente en ratones hembras BALB/c por pases sucesivos cada 45 días post-infección. Se infectaron 12 ratones hembras BALB/c por vía intraperitoneal con 40 metacestodos de *T. crassiceps* (de 1 a 2 mm) suspendidos en 200 μ l de PBS. Después de 9 días de la infección, los ratones fueron sacrificados y se les lavó el peritoneo con 10 ml de PBS 0.01M estéril. Como controles se obtuvieron lavados peritoneales de 6 ratones hembras BALB/c sanas. Los lavados (controles e infectados) se recuperaron en tubos cónicos estériles de 15 ml. Todos los tubos se centrifugaron a 1300 rpm por 10 minutos (Centrifuga DAMON/IEC DIVISION). Los sobrenadantes de cada grupo de ratones se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2. Cromatografía de ultrafiltración en Sephadex G-50.

Los sobrenadantes liofilizados de ambos grupos (controles e infectados), se resuspendieron en 15 ml de PBS y se ajustaron a 2.0 mg/ml. Se filtraron a través de una membrana de 0.45 μ l (Milipore) y se cargaron en una columna (95 X 1.5 cm) de Sephadex G-50 (Pharmacia) que fue previamente equilibrada con 0.15 M de PBS y se recolectaron fracciones de 4 ml. El material eluido se monitoreó mediante un

analizador ultravioleta ISCO modelo UA5 a una longitud de onda de 280 nm. Se seleccionaron y mezclaron las fracciones correspondientes al pico II (34-44) de ambos grupos, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C. La columna de Sephadex G-50 se calibró previamente usando pesos moleculares estándares (BioRad). Al pico II de los ratones sanos se le llamó Líquido Peritoneal G-50 Sano (LpG-50s) y al pico II de los ratones infectados se le llamó Factor de Metacéstodos (FM).

3. Determinación de carbohidratos.

Para conocer la composición química del FM, se determinó su absorbancia en un rango de longitudes de onda de 230 a 300 nm en un espectrómetro Milton Roy Spectronic 1001 plus. Se escogió este rango de longitud de onda porque la medición se hizo mediante luz ultravioleta cuyo rango de absorbancia es entre 195 y 400nm, sin embargo el rango de radiación UV es más útil por encima de los 230 nm. Se utilizaron cubetas de cuarzo las cuales transmiten eficazmente la radiación UV. La concentración de carbohidratos se determinó mediante la prueba de orcinol usando una curva patrón de ribosa (Sigma). Se resuspendió FeCl_3 en HCl al 0.1% y se preparó orcinol al 95% en etanol (100 mg/ml). Se agregó el mismo volumen de HCL- FeCl_3 a cada dilución, ribosa y FM, además de 0.3 ml de solución de orcinol. Los tubos se calentaron en baño maría en agua hirviendo durante 40 minutos. Después se enfriaron a temperatura ambiente y se hicieron lecturas a 670 nm.

Ribosa [mg/ml]	H ₂ O (μl)
1000	0
900	100
700	300
500	500
300	700
100	900

Tabla I. Diluciones para la curva patrón de ribosa

Para el FM de *T. crassiceps* se tomaron diferentes volúmenes del mismo y se diluyeron como lo marca la tabla II.

FM (μl)	H ₂ O (μl)
0	500
50	450
100	400
200	300
300	200
500	0

Tabla II. Diluciones para determinar concentración en diferentes volúmenes del FM

4. Electroforesis.

El pico I y II tanto de los líquidos peritoneales de ratones sanos como los infectados, se sometieron a una electroforesis en presencia de SDS PAGE al 12 % de acrilamida. Para el pico I de ambos casos se pusieron 10 μg y para los picos II se pusieron 20 μg. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el Broad Range (Bio Rad). La precorrida fue a 90 V y corrida a 120 V durante 1 hora en una cámara vertical de electroforesis (Bio-Rad). Por último se tiñó con azul de Coomassie (Bio-Rad) al 0.05%.

5. Tratamientos de los animales con el FM y con LpG-50s.

Tanto el FM como el LpG-50s se ajustaron a una concentración a 2.5 mg/ml de proteína usando un espectrofotómetro Spectronic 1001 plus (Milton Roy). Se inocularon 5 ratones machos BALB/c sanos con 0.1 ml de FM y 5 ratones machos BALB/c con 0.1 ml de LpG-50s; ambos grupos fueron inoculados cada 4 días durante 28 días. Dos días después de la última inoculación (30 días), los ratones fueron sacrificados y se extrajeron cuidadosamente sus testículos. Los testículos derechos de cada grupo (control y experimental) se fijaron con formalina durante 12 horas a temperatura ambiente; posteriormente se deshidrataron usando diferentes concentraciones de alcohol (desde 70% al 100%). Los testículos izquierdos (controles y experimentales) se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y se procesaron para su estudio en microscopía electrónica.

6. Tinción con Hematoxilina-Eosina.

Los testículos fijados con formalina y deshidratados se incluyeron en parafina. Se hicieron 20 cortes de 3 μ m, de cada testículo (control y experimental), en un micrótomo 1130/Biocut (Reichert-Jung). Se escogieron 10 cortes alternadamente, se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina y se analizaron en un microscopio óptico IX71 Olympus.

7. Tinción de TUNEL.

Se utilizó el *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) para esta tinción. Se escogieron 10 cortes alternadamente; después de desparafinar y rehidratar los cortes, se incubaron 30 minutos a 37 °C en una solución de trabajo de proteinasa K

(15 µg/ml en Tris HCL 10 mM, pH 7.4). Se lavaron 2 veces con PBS, se secó el área alrededor de la muestra y se añadió 50 µl del mix de reacción de TUNEL (como lo indica el Kit). Los cortes se cubrieron con parafilm con el fin de que la solución se distribuyera uniformemente y se incubaron en una cámara húmeda durante 1 hora a 37 °C en oscuridad. Por último los cortes se lavaron 2 veces con PBS y se analizaron en un microscopio confocal invertido FV 1000 Olympus y se obtuvieron fotografías a 60 X. Estos fotos se analizaron usando el programa ImagePro V 6.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

8. Tinción con azul de toluidina y microscopía electrónica.

Los testículos izquierdos se fijaron en tetróxido de osmio y se embebieron en Epon. Se realizaron cortes de 1 µm en un ultramicrotomo (Reichert-Jung, 1130/Biocut), se tiñeron con azul de toluidina y se examinaron usando un microscopio de campo claro con un lente objetivo de 40X. Para analizar las ultraestructuras, se realizaron cortes ultrafinos con una navaja de diamante, se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con un microscopio de transmisión electrónica Jeol 100 S.

9. Obtención de linfocitos esplénicos

A cada ratón se le realizó una esplenectomía en condiciones de esterilidad, el bazo se perfundió con 15 ml de RPMI 1640 (SIGMA®) con L-Glutamina 200mM-Penicilina (10000U)-Estreptomicina 10mg (SIGMA®) (RPMI incompleto), en una caja petri para posteriormente recolectarlo en un tubo cónico de 15 ml, el material se dejó reposar en hielo durante 5 minutos para eliminar los detritus gruesos y se decantó a otro tubo. Los tubos con células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos

(Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de RPMI con L-Glutamina 200 mM-Penicilina (10000U)-Estreptomicina 10 mg (SIGMA®) y 10% de Suero Bobino Fetal (SBF) (Gibco, Grand Island, N.Y.) (RPMI completo). Los linfocitos esplénicos se obtuvieron mediante un gradiente de histopaque 1077 (SIGMA®) por centrifugación a 1300 rpm por 30 minutos en una centrifuga DAMON/IEC DIVISION. La interfase se recuperó y se colocó en 15 ml RPMI incompleto. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI completo, se tiñeron con azul de tripano para determinar viabilidad y se contaron en hemocitómetro. Dependiendo del tratamiento se incubaron el número de células requeridas en placas de 96 pozos (Nunclon™) bajo las condiciones necesarias.

10. *Determinación de linfocitos esplénicos*

Se infectaron 9 ratones hembras BALB/c a los 9, 18 y 27 días se sacrificaron 3 ratones. Así mismo se sacrificaron 2 ratones hembras BALB/C sanos de la misma edad que los ratones infectados. Tras purificar los linfocitos esplénicos se tomaron 3 tubos de citómetro (Falcon®, BD) para cada ratón y en cada uno se agregaron 1×10^6 células. Las células se tiñeron con 2 μ l de anticuerpo anti-CD4 PE, anti-CD8 PE y anti-CD19 PE (BD Pharmingen™) (un anticuerpo por tubo) hechos en rata, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad. Las células se lavaron centrifugando a 1500 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS. Los resultados se analizaron en un citómetro de flujo

FACScalibur (Becton Dickinson San José, Ca. EUA), para lo cual se adquirieron 10000 células por experimento.

11. Ensayos de proliferación.

Se purificaron linfocitos esplénicos de un ratón hembra BALB/c sano. En una placa de 96 pozos se incubaron 5×10^5 células por pozo y por triplicado se les agregó 160, 80 y 8 μg de FM de metacéstodos, 0.25 μg de Concanavalina A (Con A) (SIGMA®) y RPMI completo hasta obtener un volumen final de 200 μl . Como controles, se cultivaron células sin Con A y células con Con A. Se incubaron por 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Al cabo de este tiempo, se agregó 1 μCi /pozo de [³H]-Timidina (74 GBq/mmol; ICN, Irvine, Calif.) a todos los pozos (Cortes I et al., 2003) y se incubaron 18 horas más. Se cosecharon las células en un cosechador (Nunc, Denmark) mediante discos de papel absorbente (Whatman 934-AH), los discos de papel obtenidos se sumergieron en frascos con líquido de centelleo (un frasco por cada disco), se agitaron vigorosamente y se midió la incorporación de [³H]-Timidina en un contador de centelleo (Packard Tri-carb 300). Los resultados se expresaron en cuentas por minuto para cada condición.

12. Ensayo de proliferación de linfocitos esplénicos tratados con FM.

Para saber qué clase de linfocitos fueron susceptibles al efecto del FM, se purificaron linfocitos esplénicos de 1 ratón hembra BALB/c sano. En una placa de 96 pozos se incubaron 5×10^5 células por pozo y por triplicado se les agregó 160 μg de FM, 0.25 μg de Con A y RPMI completo hasta obtener un volumen final de 200 μl . Se cultivaron células con Con A, sin FM, como controles. Los linfocitos se

incubaron por 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Al cabo de este tiempo se cosecharon los linfocitos juntando los triplicados en tubos de citómetro (Falcon®, BD) y se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 PE, anti CD8-PE y anti CD19-PE (BD Pharmingen™). Los experimentos se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (BD), para lo cual se adquirieron 10,000 células por experimento.

13. Ensayo de proliferación de linfocitos de ratones inoculados con FM.

Se obtuvieron linfocitos esplénicos de 3 ratones hembras BALB/c inoculadas con 80 µg de FM cada 4 días y 3 ratones inoculados con 80 µg de Lp G-50 de ratones sanos cada 4 días por 30 días y 2 días después de la última inoculación se realizó una esplenectomía en cada ratón, se obtuvieron linfocitos como se describió en el punto 9 de la metodología. Se cultivaron 5x10⁵ células por pozo en una placa de 96 pozos. Se hicieron 2 triplicados por cada ratón; a un triplicado se le agregó 0.25 µg de Con A por pozo y al otro triplicado se le agregó 100 µl de RPMI (SIGMA®) con 10% de SBF (Gibco, Grand) como controles. Las placas se cultivaron 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se cosecharon los linfocitos reuniendo las células de tres tubos para citometría (BD) y se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 PE, anti-CD8 PE y anti-CD19 PE. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación. Al final se lavaron las células y se analizaron los experimentos en un citómetro de flujo FACScalibur.

14. Análisis por Citometría de Flujo.

El citómetro de flujo FACScalibur permite analizar de forma simultánea diversas características celulares, lo que proporciona información de varios parámetros de

cada una de células que se analizan. Los valores de calibración fueron: FSC – 1.60, SSC - 389, FL1 - 579, FL2 – 462, FL3 – 465. Compensación: FL1-FL2 – 0.6, FL2-FL1 – 163, FL2-FL3 – 15.4 y FL3-FL2 – 9.1. Se analizaron 10,000 células por cada experimento, se obtuvieron gráficos FSC (tamaño) y la SSC (granularidad), así como también para conocer el porcentaje de células de cada estirpe mediante fluorescencia.

15. Análisis estadísticos.

Las medias \pm DE fueron calculadas para representar números y porcentaje de diversos tipos de células peritoneales de ratones sanos o experimentales. Se utilizó la prueba de Xi-cuadrada con corrección Yate. Se consideró significativo el valor de P menor a 0.05. Se utilizó el programa Graph Pad Instat

RESULTADOS

1. Ultrafiltración Sephadex G-50.

Después de concentrar los líquidos peritoneales de los ratones infectados y de los ratones sanos, el material se sometió a cromatografía de ultrafiltración en una columna de sephadex G-50. En la figura 1 se puede observar que el líquido peritoneal del ratón infectado, genera dos picos. El pico número I está constituido por proteínas, mientras que el pico II, abarca las fracciones de elución 34 a la 44 llamado de ahora en adelante “factor de metacéstodo (FM)”. Por otro lado, el líquido peritoneal de los ratones sanos generó sólo el pico I aunque en menor proporción que el de los ratones infectados (Fig. 6).

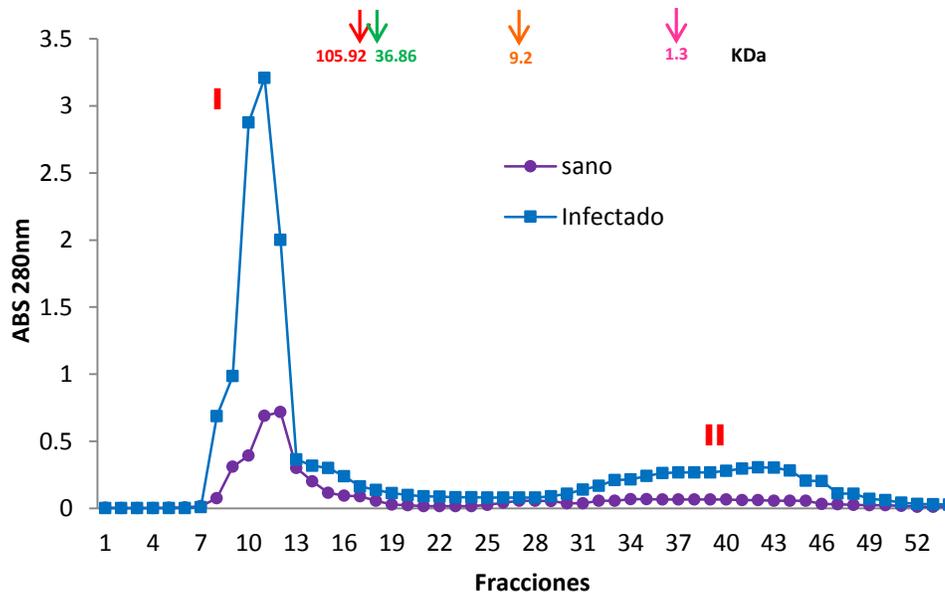


Figura 6. Perfil elución de los líquidos peritoneales de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* y ratones sanos, ultrafiltración por Sephadex G-50. Las flechas señalan los PM expresados en KDa. I=pico I de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* y de ratones sanos. II=pico II de ratones infectados.

2. Determinación de carbohidratos del FM.

Para caracterizar la composición química del FM y así saber que biomoléculas lo conformaban, se midió su absorbancia a diferentes longitudes de onda. Se encontró una máxima absorbancia a 260 nm, sin embargo también tiene una lectura menor a 280 nm. Esto indica la presencia de compuestos aromáticos. Por el contrario en las fracciones correspondientes al ratón sano (LpG-50s) no hubo diferencia en la absorbancia a ninguna longitud de onda por lo que sugiere que no hay ninguna molécula compleja (Fig. 7). Aunque hay una lectura considerable a 230 nm esto no indica la presencia de alguna biomolécula.

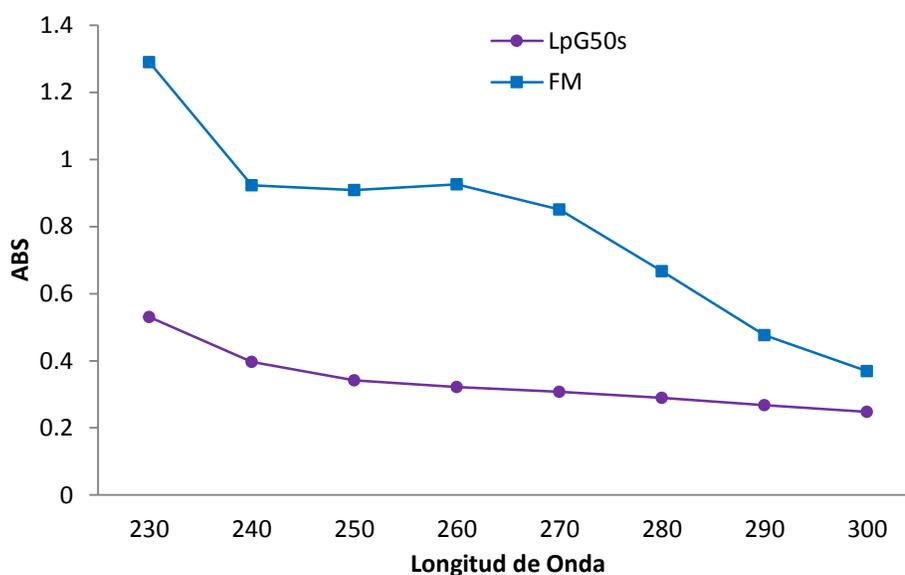


Figura 7. Espectro de absorbancia del FM y del LpG-50s.

En estudios anteriores se confirmó la presencia de carbohidratos en el FM mediante una resonancia magnética (datos no mostrados). Para conocer la concentración de carbohidratos se utilizó una curva patrón de ribosa la cual sirvió para determinar la presencia de pentosas específicamente. Con esta curva se determinó que hay 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Fig. 8).

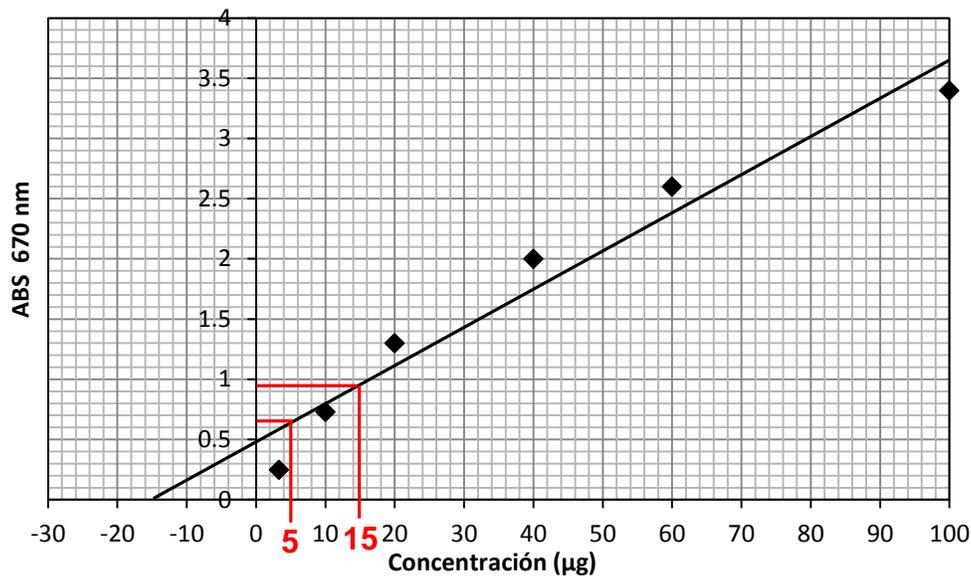


Figura 8. Curva patrón de ribosa y la extrapolación de la absorbancia de diferentes volúmenes del FM.

3. Electroforesis.

El ensayo de electroforesis con SDS del material correspondiente al pico I del líquido peritoneal de ratones sanos muestran tres bandas de 97.4 y de 66.3 kDa y una más abundante de 55.5 kDa (carril 2) mientras que el material correspondiente al pico I del líquido peritoneal de ratones infectados mostró más de ocho bandas de proteínas en un rango de 36.5 a 200 kDa, las más abundantes de 116.3, 97.4 y 55.4 kDa (carril 3). El material correspondiente al LpG-50s como el FM no mostraron banda alguna (carril 4 y 5 respectivamente) (Fig. 9). Sin embargo, en el caso del FM, en el perfil de elución (Fig. 6) se observa que hay absorción a 280 nm esto sugiere la presencia de algún pequeño péptido por lo que el FM podría estar conformado por un péptido ligado a un carbohidrato.

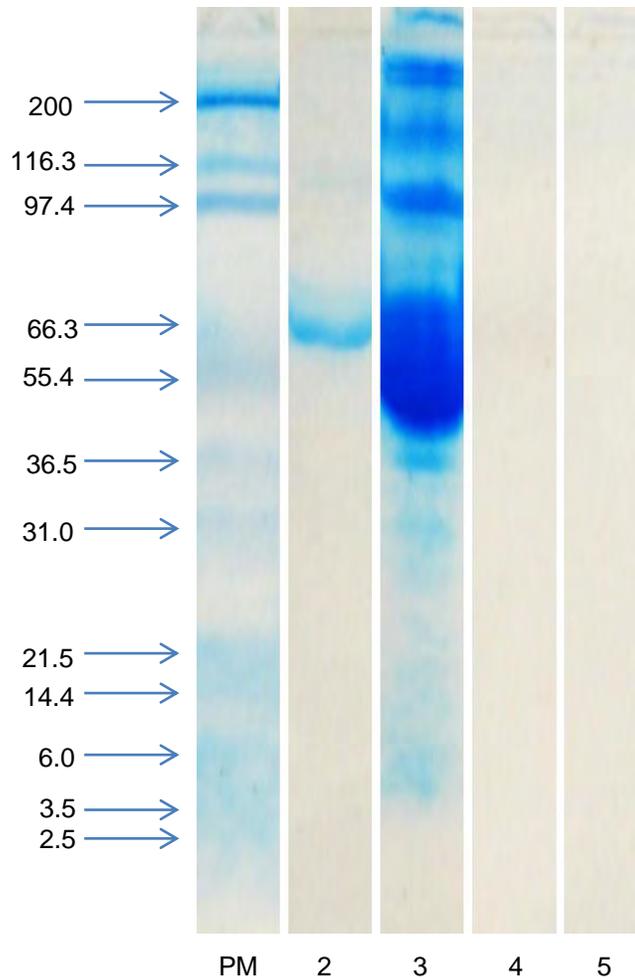


Figura 9. Ensayo de electroforesis de los picos I y II productos del Sephadex G-50. PM: pesos moleculares estándar. 2: pico I sano, 3: pico I infectados, 4: LpG-50s, 5: FM. Tinción con Coomassie

4. *Evaluación del daño al epitelio seminífero en ratones inoculados con FM.*

Para conocer si el FM causó algún daño en el epitelio seminífero de los ratones, los cortes seleccionados se tiñeron mediante la técnica de Hematoxilina/Eosina. Los testículos de los ratones inoculados con el LpG-50s, mostraron una histología bien organizada del epitelio seminífero. Las células dentro de los túbulos seminíferos están arregladas concéntricamente. Las células intratubulares (CS y germinales) y las células de Leydig en el tejido intersticial se encontraron bien organizadas mediante uniones estrechas (GJ) (Fig.10 A). En contraste, los cortes de los

testículos de ratones tratados con el FM mostraron un daño intenso de las células de los túbulos seminíferos, además mostraron destrucción de sus uniones estrechas. Algunas espermatogonias y SC se desprendieron de la lámina basal. Se observó un alto nivel de piconosis en los núcleos de las células de Leydig del tejido intersticial. Muchas células estaban destruidas y los desechos se acumularon en la zona adluminal. Por último, se encontró una gran infiltración de macrófagos al lumen de los túbulos (Fig. 10 B). Estos datos sugieren que el FM afecta la histología del epitelio seminífero murino dejando incomunicadas las células germinales las cuales mueren y en consecuencia no hay producción de espermatozoides.

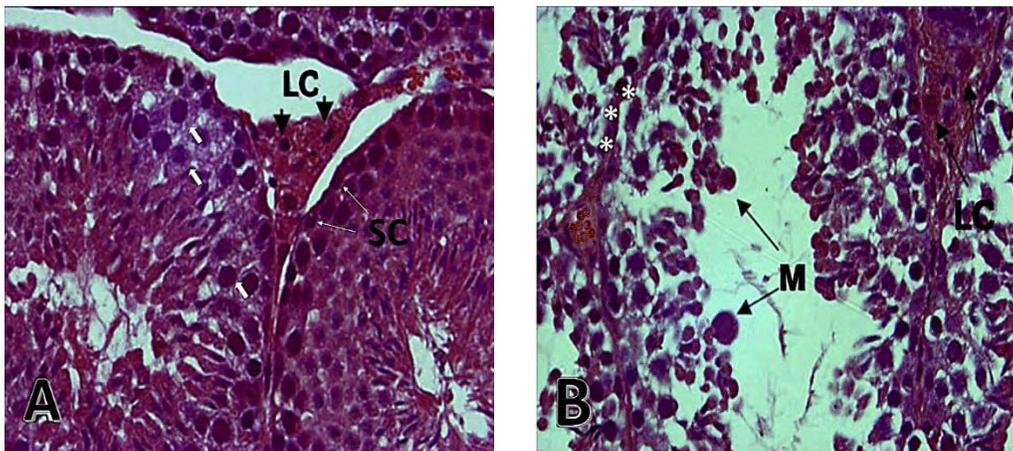


Figura 10. Micrografías representativas del daño inducido en los túbulos seminíferos por el FM. (A) Corte de un testículo de ratón inoculado LpG-50s teñido con H/E. Células de Leydig (LC), células de Sertoli (SC) flechas blancas delgadas y uniones estrechas flechas blancas gruesas. Corte de ratones inoculados con FM teñidos con H/E. Células de Leydig (LC), macrófagos (M) y lámina basal asteriscos blancos.

5. *Ensayo de apoptosis por TUNEL.*

Para saber si el FM inducía apoptosis en el epitelio seminífero, algunos cortes de testículos (controles y experimentales) fueron teñidos mediante la técnica de TUNEL los cortes de los testículos de los ratones control no mostraron células fluorescentes, es decir no se observaron células apoptóticas (Fig.11 A). Por el contrario, los cortes

de los ratones experimentales mostraron una gran cantidad de células fluorescentes. Se encontró apoptosis tanto en células del interior de los túbulos seminíferos, células de Sertoli, espermatogonias y espermatozoides (Fig. 11 B); como en células del tejido intersticial, células de Leydig (Fig. 11 C). Esto sugiere que el FM activa la apoptosis en la células de Leydig lo que explicaría los bajos niveles de testosterona reportados por Larralde et al., 1995. Sin embargo la apoptosis dentro de los túbulos seminíferos podría deberse tanto a la falta de testosterona como a la presencia del FM.

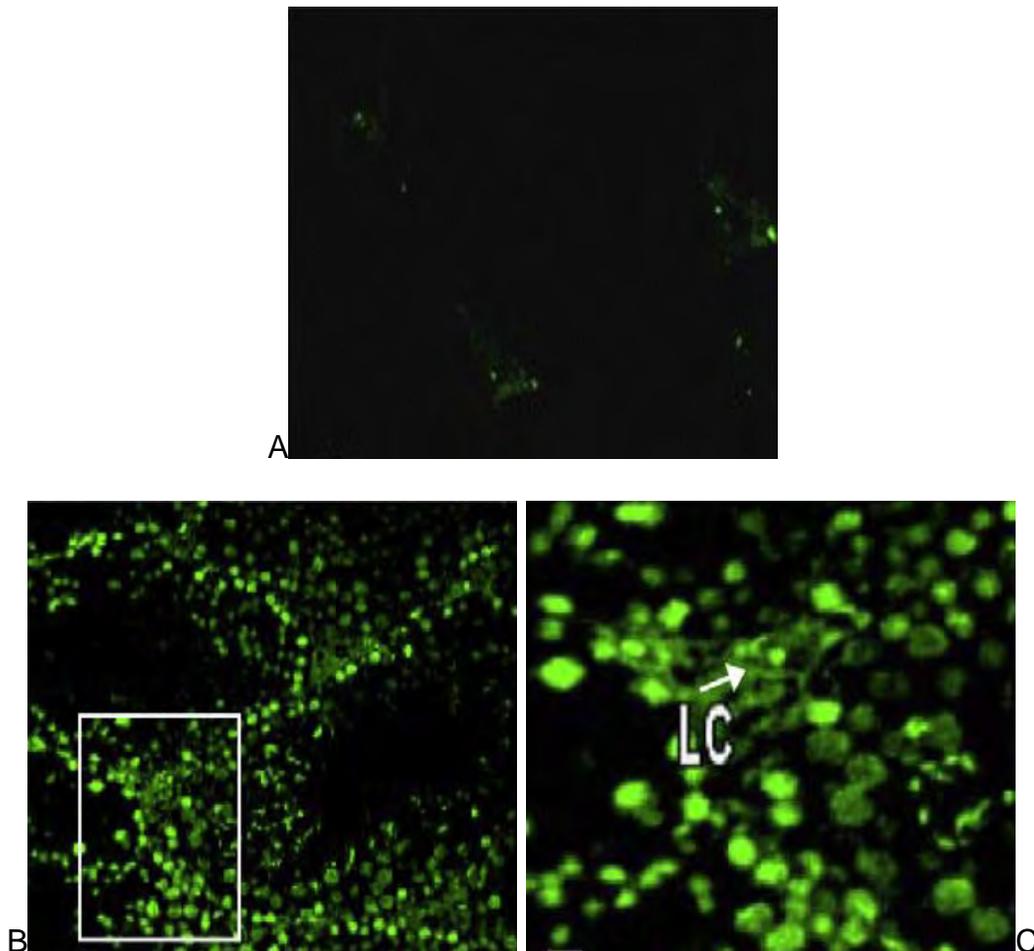


Figura 11. Corte transversal de testículo de un ratón control y de un ratón experimental teñidos con TUNEL. A) Corte transversal de testículo de un ratón control (400X). B) Corte transversal de testículo de un ratón experimental (400X). C) Porción ampliada de B que muestra células Leydig apoptóticas.

6. *Análisis del epitelio seminífero teñido con azul de toluidina.*

Los cortes semifinos del testículo de ratón que se tiñeron con azul de toluidina revelaron un daño intenso en la histología de los túbulos seminíferos de los ratones experimentales mostrando células germinales degeneradas, cabezas de espermatozoides amorfas y una gran cantidad de macrófagos infiltrados (Fig.12 B). Por el contrario, los ratones control mostraron células de Leydig intactas y la histología de los túbulos seminíferos bien organizada (Fig. 12 A). Estos datos refuerzan los observados en los cortes teñidos con H/E, es decir, el FM afecta al epitelio seminífero murino. Como ya se mencionó antes, las células germinales pierden la comunicación con las células de Sertoli lo que las deja desprovistas de alimento y mueren por apoptosis. Esto explica también, la presencia de macrófagos en el lumen de los túbulos seminíferos ya que estos se encargan de fagocitar los restos de las células apoptóticas.

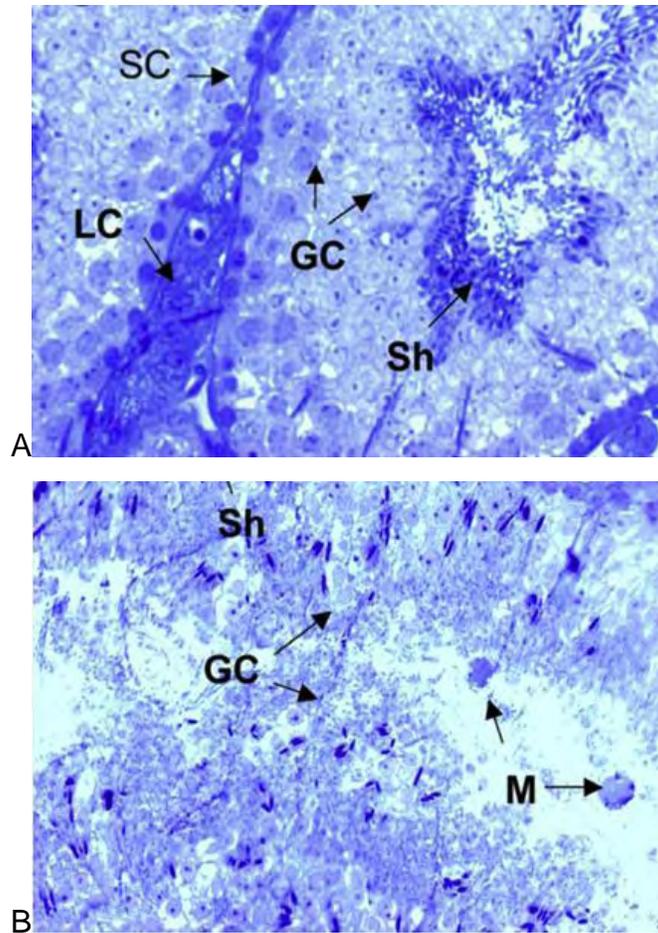


Figura 12. Micrografías representativas de los daños inducidos en los túbulos seminíferos de los ratones tratados con FM. A) Corte transversal de un testículo de un ratón control teñido con azul de toluidina donde se muestran células de Sertoli (SC), células germinales (GC) y cabezas de espermatozoides (Sh) dentro de los túbulos seminíferos y células de Leydig en el tejido intersticial (LC). B) Corte transversal de un testículo de un ratón experimental teñido con azul de toluidina donde se muestran células germinales degeneradas, cabezas de espermatozoides y macrófagos dentro de los túbulos seminíferos (M). (400X).

7. Estudio de las células del epitelio seminífero por microscopía electrónica.

Los cortes transversales de los ratones controles mostraron células de Sertoli y células germinales normales, se observan los acrosomas en diferentes estadios de desarrollo (Fig. 13 A y C). Por el contrario, los cortes transversales de los ratones experimentales revelaron una serie de signos patológicos. Las células de Sertoli mostraron una cromatina más laxa conteniendo en su citoplasma espermátides

degenerada (ED), así como, como restos de cromatina y de mitocondrias (Fig. 13 B). Así mismo, alrededor de las células de Sertoli, se encontraron espermátides estructural y morfológicamente dañadas y con la membrana acrosomal anormal (Fig. 13 D).

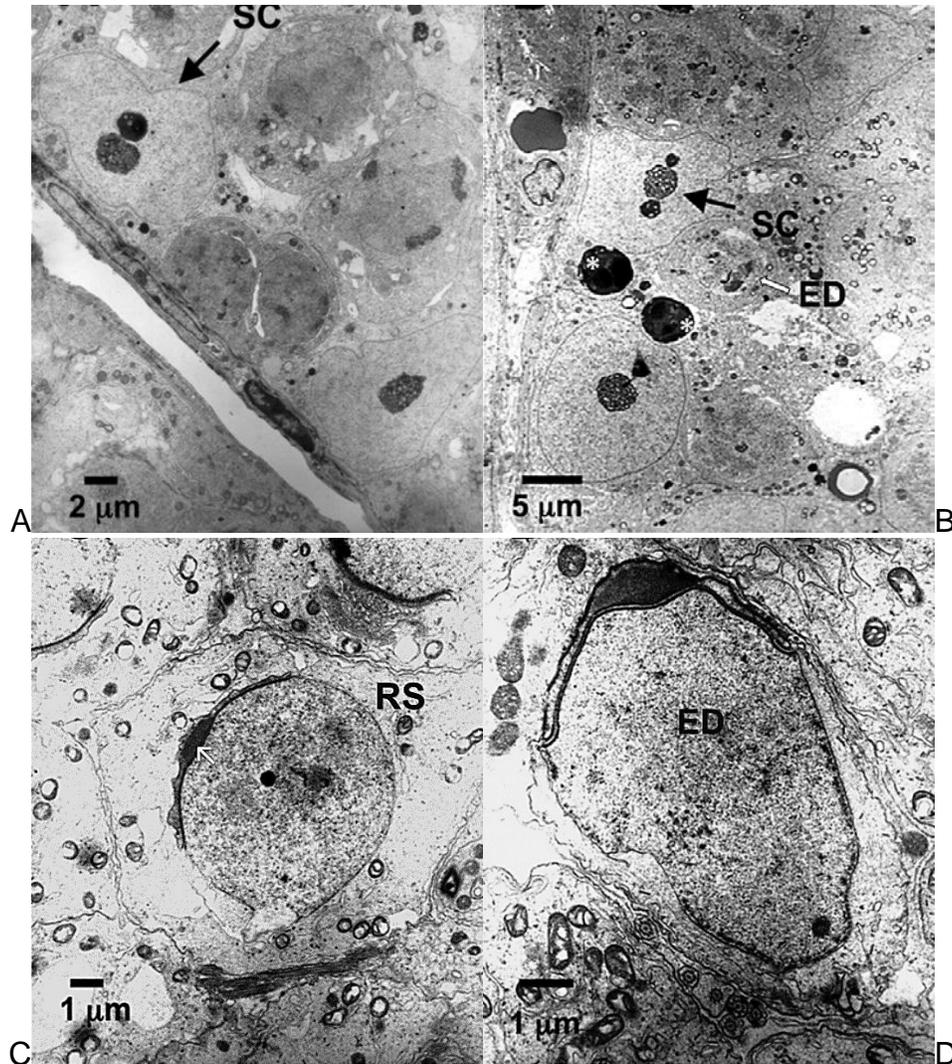


Figura 13. Estudio por microscopía electrónica de transmisión de los testículos de ratones controles y experimentales. A) Micrografía de un testículo de un ratón control mostrando células de Sertoli (SC) (2500X). B) Micrografía de un testículo de ratón experimental mostrando células de Sertoli (SC) con espermátides degeneradas dentro su citoplasma (ED) y restos de cromatina (asterisgos) (2500X). C) Micrografía de un testículo de un ratón control mostrando espermátides (RS) con acrosoma en desarrollo (flecha blanca) (5000X). D) Micrografía de un testículo de ratón experimental mostrando espermátides deformadas (ED) (8000X).

En el lumen de los testículos de los ratones testigo se encontraron espermatozoides con la cabeza elongada mostrando una morfología normal (Fig. 14 A). Por el contrario, los espermatozoides de los ratones experimentales mostraron diversas anomalías en la forma de sus cabezas, además de un gran número residuos de células germinales (Fig. 14 B y C).

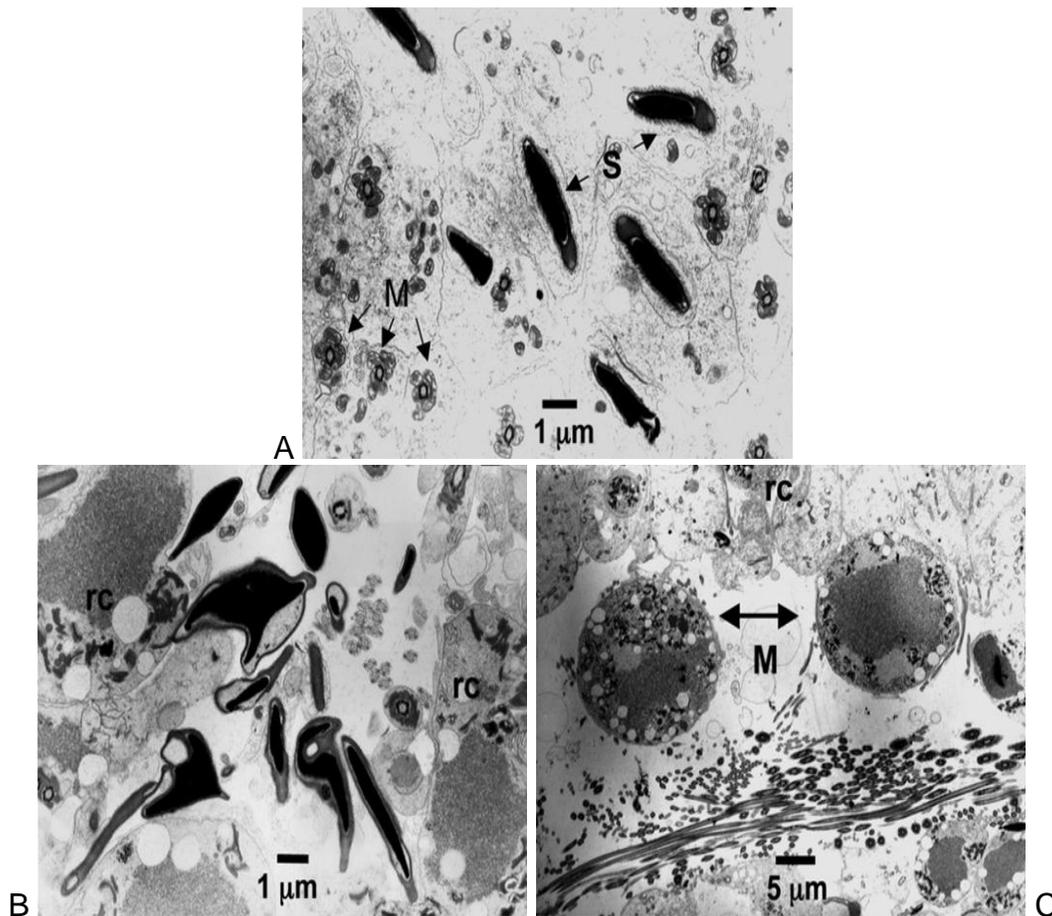


Figura 14. Estudio por microscopía de electrónica transmisión de testículo de ratón control y experimental. A) Micrografía de un testículo de una ratón control mostrando espermatozoides normales (S) y mitocondrias asociadas con la pieza media del flagelo (M) (5000X). B) Micrografía de un testículo de un ratón experimental mostrando formas anormales de cabezas de espermatozoides y residuos celulares (rc) (5000X). C) Micrografía de un testículo de un ratón experimental mostrando dos macrófagos (M) en el espacio luminal cuyo citoplasma se encuentra lleno de detritus celulares (1500X).

8. *Determinación del porcentaje de linfocitos esplénicos de ratones infectados con metacéstodos de T. crassiceps.*

Con el objetivo de conocer si las líneas celulares esplénicas de los ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* estaban afectadas, se determinó el porcentaje de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺ a los 9, 18 y 27 días post infección (dpi). Los linfocitos CD4⁺ de ratones infectados disminuyeron significativamente a los 9 días post infección (dpi) en comparación a los ratones sanos ($P < 0.05$). A los 18 y 27 dpi el porcentaje de linfocitos aumentó pero no alcanzó el nivel observado en los ratones sanos (Fig. 15 A). Algo similar ocurrió con los linfocitos CD8⁺ a los 9 y 18 dpi, el número de células se encontraron disminuidas con respecto al control, sin embargo a los 27 dpi el porcentaje de células CD8⁺ estaban por encima de los niveles que se observaron en los ratones sanos (Fig. 15 B). Sin embargo, el número de linfocitos CD19⁺ no presentó diferencia significativa con respecto al número de linfocitos de ratón sano. Incluso a los 18 dpi el número de linfocitos CD19⁺ fue mayor al porcentaje de linfocitos de ratones sanos (Fig. 15 C).

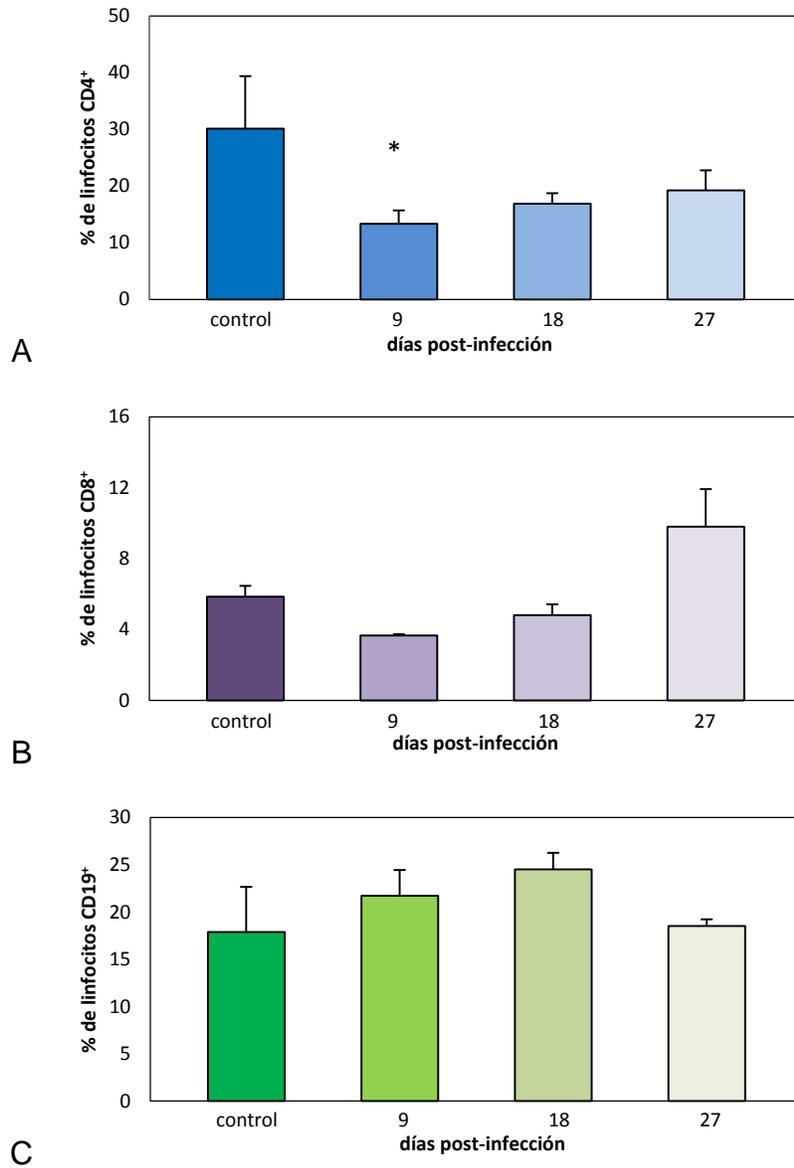


Figura 15. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células esplénicas T y B de ratones infectados con metacístodos de *T. crassiceps* de diferentes días post-infección. A) Células CD4⁺. *P<0.05. B) Células CD8⁺. C) Células CD19⁺

9. Proliferación de linfocitos esplénicos de ratones inoculados con 80 µg de FM.

Como se describió en la figura 15, el porcentaje de linfocitos esplénicos se encontró disminuido en los ratones infectados con metacístodos de *T. crassiceps*. Para saber si el FM es el responsable de provocar esa disminución, se inocularon 3 ratones hembras con 80 µg de FM cada 4 días durante 28 días y se sacrificaron 2 días

después de la última inoculación. Tras purificar los linfocitos esplénicos las células se cultivaron con Con A durante 72 horas para conocer si estas células eran capaces de proliferar. Como controles se inocularon 3 ratones hembras BALB/C con 80 µg de LpG-50s durante el mismo tiempo y los linfocitos se trataron de la misma manera. Después de cosechar los linfocitos se marcaron con los anticuerpos correspondientes y los resultados se analizaron en el citómetro. El número de CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺ de los ratones experimentales se encontraron disminuidos con respecto al número de células de los ratones testigo, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 16 A, B y C). Esto sugiere que el FM disminuye la capacidad de estos linfocitos, sin embargo fue necesario hacer un ensayo de proliferación medido por [³H]-Timidina para confirmar estos datos.

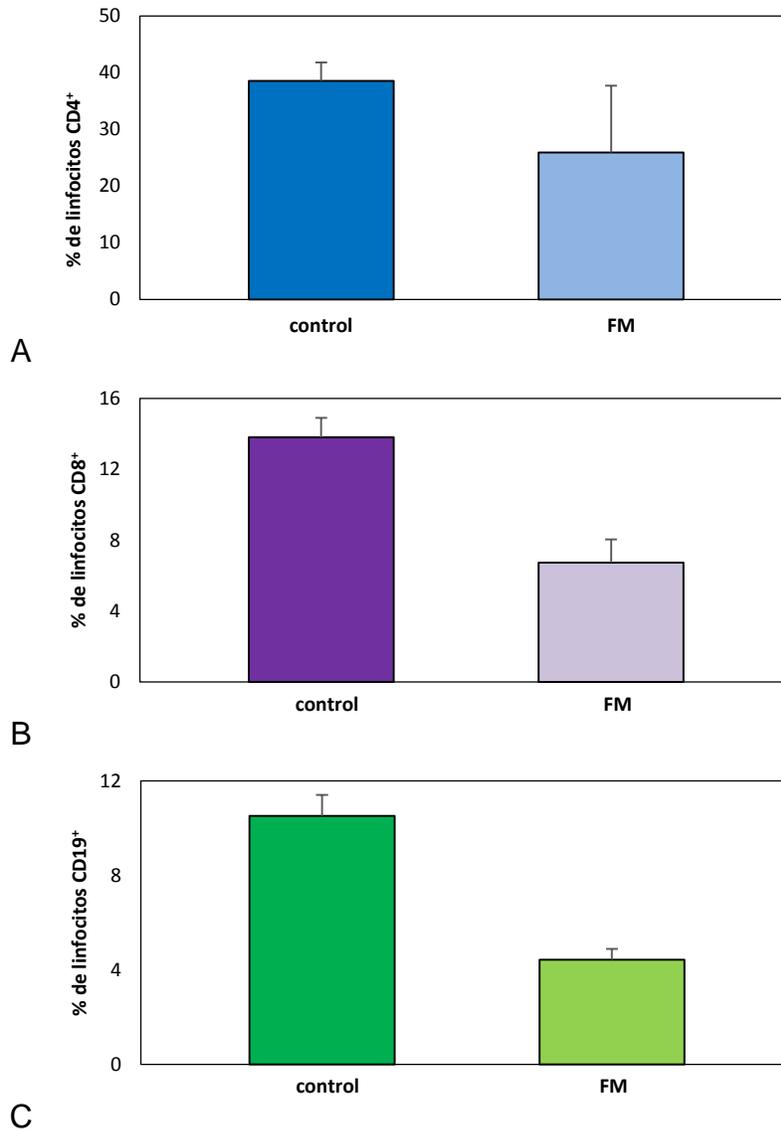


Figura 16. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células esplénicas de ratones inoculadas con 80µg de FM. Se cultivaron las 72h con Con-A. A) Células CD4+. B) Células CD8+. C) Células CD19+.

10. Incorporación de $[^3H]$ -Timidina por linfocitos esplénicos tratados con FM.

Para reforzar los datos anteriores, se midió la incorporación de $[^3H]$ -Timidina en linfocitos esplénicos, de ratón sano, incubados con ConA y diferentes dosis de FM. Al medir la incorporación de $[^3H]$ -Timidina se observó que con 160 y 80 µg de FM las cuentas por minuto disminuyeron significativamente con respecto a las cuentas por minuto en células controles. Con 8 µg de FM también se observó disminución

de las cuentas por minuto pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 17). Estos datos sugieren que el FM inhibe la proliferación de linfocitos esplénicos y esta reacción es dosis-dependiente.

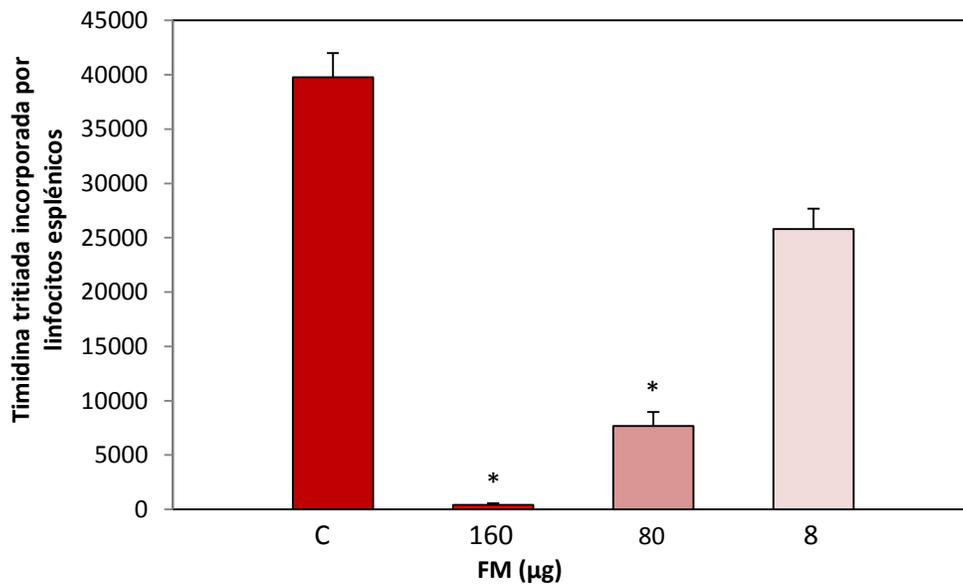


Figura 17. Incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina por linfocitos esplénicos cultivados con 160µg, 80µg y 8µg de FM y Con-A. * $P < 0.05$.

11. Proliferación de linfocitos esplénicos incubados con 160µg de FM.

Una vez que se sabía que el FM inhibía la proliferación de los linfocitos T, quisimos saber qué tipo de linfocito estaba afectado por el FM, por lo que se cultivaron linfocitos esplénicos de un ratón sano con la dosis más alta (160 µg) de FM y ConA durante 48 horas y se analizaron las células CD4^+ , CD8^+ Y CD19^+ . En la figura 18 se puede observar que tanto los linfocitos CD4^+ como los CD19^+ se encontraron disminuidos con respecto a sus controles pero esta diferencia no fue significativa. Sin embargo, los linfocitos CD8^+ no disminuyeron. Por lo tanto, estos datos sugieren que el FM inhibe la proliferación de los linfocitos T CD4^+ y no la de los CD8^+ .

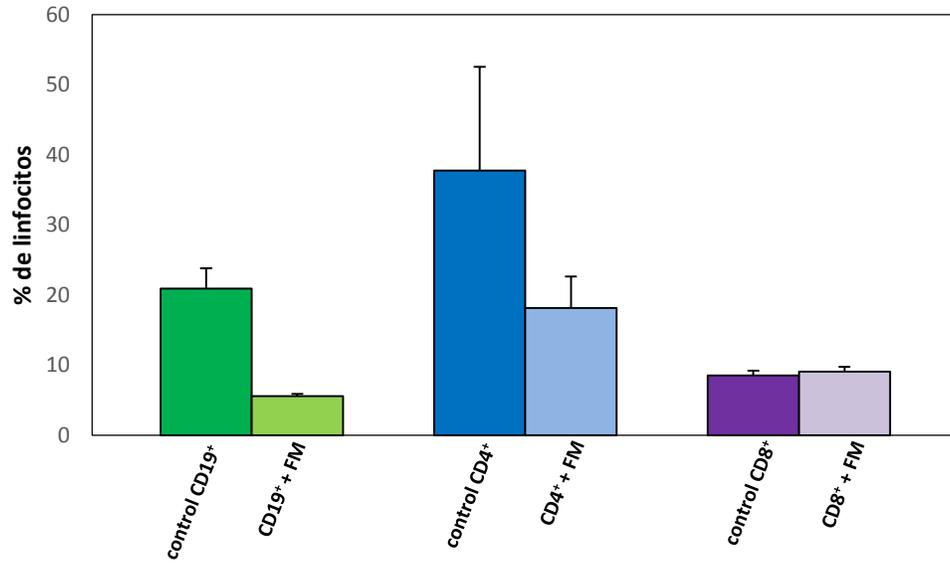


Figura 18. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos esplénicos CD4+, CD8+ y CD19+, cultivados con 160 µg de FM y Con-A

DISCUSIÓN

La cisticercosis por *T. solium* es una enfermedad que afecta a los países en vías de desarrollo y recientemente, debido a la migración, también afecta a los países desarrollados (Evans et al., 1997). Para conocer los efectos de esta parasitosis se ha recurrido a un modelo murino causado por *T. crassiceps*. Recientes estudios revelaron que las excreciones/secresiones de este parásito afectan la producción de algunas citocinas y la proliferación de linfocitos (Spolski et al., 2001), además se encontraron bajos niveles de testosterona en ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* (Larralde et al., 1995). En este trabajo se realizó la semi-caracterización de una sustancia secretada por los metacéstodos de *T. crassiceps* al que se llamó Factor de Metacéstodos (FM).

Los datos revelados por el ensayo de electroforesis no mostraron ninguna banda producida por el FM, esto podría interpretarse como que el FM no está constituido por alguna proteína, sin embargo el perfil de elución reveló una absorbancia a 280nm, además, al medir la absorbancia del FM a diferentes longitudes de onda, se confirma su lectura a 280nm. Por otro lado, se encontró una máxima absorbancia a 260nm lo que evidenció la presencia de carbohidratos aromáticos como los de los ácidos nucleicos. Lo anterior sugiere que el FM podría estar conformado por algún péptido de bajo peso molecular unido a algún carbohidrato aromático. En estudios subsecuentes se tendrá que analizar la estructura del FM por métodos más específicos como la espectrometría de masas. Estos datos coinciden con los reportados por Molinari et al., 1990 en donde se describe una sustancia similar, secretada por metacéstodos de *T. solium*.

Al estudiar el efecto del FM sobre la histología del testículo de ratón encontramos un intenso daño en el epitelio seminífero. Dentro de los túbulos se observó la pérdida de la “comunicación intercelular”, es decir que habían perdido sus uniones estrechas. Es bien sabido que para que haya una buena producción de espermatozoides, las células germinales tienen que estar comunicadas con las células de Sertoli (Hasegawa y Saga, 2012). El tejido intersticial también se encontró con daños importantes, las células de Leydig mostraron signos de apoptosis como cromatina compacta y cuerpos apoptóticos, además de perder la comunicación con las demás células. En el lumen de los túbulos se encontraron espermatozoides con alteraciones morfológicas y una intensa infiltración de macrófagos en cuyo interior había restos de células incluyendo porciones de flagelos de los espermatozoides. Se ha reportado que cuando hay una alta tasa de mortandad de las células en los túbulos seminíferos se puede provocar la activación de macrófagos y estos se infiltran en el epitelio seminífero, como lo descrito por Frungieri et al. (2002) que encontró macrófagos CD68⁺ en el lumen de testículos de hombres infértiles que solo tenían células de Sertoli o con síndrome de células germinales arrestadas en la fase G₀. En contraste, los ratones inoculados con el LpG-50s, no mostraron ningún daño estructural. Tanto en el tejido intersticial como dentro de los túbulos seminíferos las células conservaron su histología intacta y todas sus uniones estrechas. Esto refuerza la idea de que el FM es secretado por el parásito y que es el causante de la patología observada en los ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* (Zepeda et al., 2011).

Los cortes teñidos con TUNEL evidenciaron un gran número de células apoptóticas, tanto en el tejido intersticial como en el interior de los túbulos seminíferos. Se sabe

que la apoptosis de las células germinales es normal a lo largo de la vida como un mecanismo fisiológico para limitar el número de células germinales (Bartke, 1995; Billig et al., 1995). Además, las células germinales pueden caer en apoptosis en muchas situaciones como la exposición a sustancias tóxicas (Blanchard et al., 1996; Richbug y Boekelbeide, 1996) o por alteraciones del soporte hormonal (Russell et al., 1987; Sinha Hikim et al., 1995). Lee et al. (1997) demostraron un aumento de la expresión de Fas y FasL después de la exposición a dos toxinas de las células de Sertoli (MEHP y 2,5-HD), esto indujo la apoptosis a las células germinales.

Mas aún, Rikihisa et al., (1985) reportaron bajos niveles de testosterona *in vitro* debido a una sustancia de excreción/secresión de *Taenia taeniaeformis*. Esto pudo deberse a que las células de Leydig estaban afectadas por algún producto de las secreciones y por lo tanto la producción de testosterona estaba disminuida. La patología observada al interior de los túbulos seminíferos pudo deberse a la infiltración del FM al interior de los túbulos produciendo el daño ya mencionado o a que el FM dañó directamente el tejido intersticial y por lo tanto a las células de Leydig provocando la pérdida de la función de las mismas y la falta de testosterona. El papel fisiológico de los altos niveles de testosterona en los testículos no se ha entendido completamente. Sin embargo, se ha establecido que la producción de esperma disminuye exponencialmente un vez que los niveles de testosterona en los testículos disminuye por debajo de 70 mM (Zirkin et al., 1989). El efecto de los andrógenos está mediado por receptores de andrógenos localizados en el núcleo o en el citoplasma. Las células germinales no tienen receptores de andrógenos (Wang et al., 2009; Tsai et al., 2006), por lo que la testosterona que es difundida dentro de los túbulos seminíferos se une al núcleo y al citoplasma de las células de Sertoli

quienes son encargadas de iniciar la respuesta funcional requerida para mantener la espermatogénesis (Smith y Walker, 2014).

Al medir el porcentaje de linfocitos esplénicos a diferentes días post infección, se observó que la proporción de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ estaban significativamente disminuidos. Lo mismo ocurrió con los linfocitos de ratones inoculados con FM. Cuando se midió la incorporación de [³H]-Timidina en linfocitos esplénicos cultivados con diferentes dosis de FM, se encontró alteración de la proliferación de estas células. Asimismo las pruebas por citometría de flujo revelaron que los linfocitos CD4⁺ y CD19⁺ se encontraban drásticamente disminuidos tras haberlos cultivado con 160µg de FM y Con-A durante 72 horas. Estos atributos sugieren que ambos factores (*T. solium* y *T. crassiceps*) deben de estar produciendo efectos en el sistema inmunológico del hospedero. La habilidad del FM de *T. solium* de reducir la producción *in vitro* de IL-2, IFN-γ, TNF-α (Arrechavaleta et al., 1998) y la habilidad del FM de *T. crassiceps* de disminuir la proliferación de linfocitos, reportados aquí, deben de estar relacionados con los resultados obtenidos por Rubio et al. (1998) en donde la infección de ratones con metacéstodos de *T. crassiceps* disminuyó significativamente la respuesta humoral ante los antígenos de *Salmonella typhimurium*.

CONCLUSIONES

- Dentro de las sustancias que secreta el metacésto de *T. crassiceps* dentro del hospedero se encuentra una sustancia de bajo peso molecular a la que se le llamó Factor de Metacésto (FM).
- Se determinó que hay 0.03 µg/ µl de carbohidratos en el FM. El FM absorbe a 260 y 280 nm lo que sugiere que podría estar conformado por algún péptido unido a un carbohidrato aromático.
- El FM produce apoptosis tanto en el tejido intersticial como en el interior de los túbulos seminíferos de ratón y provocó un intenso daño en la histología del epitelio seminífero.
- La infección de ratones con metacésto de *T. crassiceps* disminuye la proporción de linfocitos esplénicos, la cual puede ser provocado por el FM.
- El FM disminuye el porcentaje de linfocitos esplénicos *in vivo* e *in vitro*. Además de que afecta la proliferación de los mismos.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
³ H	Tritiada
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Apaf-1	Factor activador de proteasas-1
BALB/c	Bagg ALBinos
Bcl-2	Linfoma de células B 2
BCR	Receptor de la célula B
Caspasa	Citosolic aspartate specific proteasas
CL	Células de Leydig
Con A	Concanavalina A
CS	Células de Sertoli
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low PI
DISC	Death inducing signaling complex
E-64	N-[N-(L-3-Trans-carboxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agamatine
E/S	Escreción/Secreción
FADD	Proteina relacionada con Fas con dominio de muerte
FAS	Citocina CD95
FAS L	Ligando de la citocina CD95
FeCl ₃	Cloruro férrico
FITC	Fluoresceína
FL1	Fluorescencia 1
FL2	Fluorescencia 2
FL3	Fluorescencia 3

FM	Factor de Metacéstodos
FSC	Forward scattered
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
H/E	Hematoxilina/Eosina
HCL	Ácido clorhídrico
IAP	Proteínas inhibidoras de apoptosis
IgM	Inmunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
INF γ	Interferon gamma
kDa	Kilo Daltons
LB	Linfocitos B
LH	Hormona leutinizante
LpG-50s	Líquido peritoneal G-50 sano
MHC	Complejo mayor de hitocompatibilidad
NCC	Neurocisticercosis
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Ficoeritrina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Smac	Second mitochondria-driven activator of casases
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Side scattered

TCR	Receptor de la célula T
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	Deoxynuclotidyl transferase-mediated dUTP nic-end labelling
UV	Ultravioleta
WFU	Wake Forest University

BIBLIOGRAFÍA

Artículos:

Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitology Research* 84, 117–122.

Bankowski Z, and Howard-Jones N. 1986. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animal. ISBN Sw.fr. 4.

Bartke A.1995. Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon. *Endocrinology* 136, 3–4.

Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hseuh AJ. 1995. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136, 5–12.

Blanchard KT, Allard EK, Boekelheide K. 1996. Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137, 141–148.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 37(3): 299-310.

Cortes I, Molinari JL, Solano S, Hernandez-Mendoza H, Ramirez A, Tato P. 2003. *Taenia solium* metacestode antigens which are protective for pigs induce Th1/Th2 mixed responses in mice. *Parasitol Res* 90:273-279.

Del Brutto OH, Sotelo J. 1988. Neurocysticercosis: an update. *Rev Infec Diseases.* 10 (6):1075-1087.

Evans CA, Gonzalez AE, Gilman RH, Verastegui M, Garcia HH, Chavera A, Pilcher JB, Tsang VC. 1997. Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* Jan;56(1):33-7.

Fraietta R, Suslik D, Zylberstejn S, Esteves SC. 2013. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics* 68(S1):81-88.

França L, Ogawa T, Avarbock R, Brinster R, Rusell L. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 59:1371-1377.

Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Kohn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. 2002. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertility and Sterility* 78, 298–306.

Garcia HH, Del Brutto OH; Cysticercosis Working Group in Peru. 2005. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol.* Oct;4(10):653-61. Review.

Gourbal BE, Righi M, Petit G, Gabrion C. 2001. Parasite-altered host behavior in the face of a predator: manipulation or not? *Parasitol Res.* 2001 Mar;87(3):186-92.

Guzman L, Lopez R, Llerana G, Pino J, Retuerto F. 2005. Recuperación del epitelio germinal masculino de ratones tratados con dosis única de Busulfan. *Rev. Peru biol V.12. n1.* Lima

Hasegawa K, Saga Y. 2012. Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development.* Dec 1:139 (23):4347-55.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* Oct 12;407(6805):770-6.

Herrera LA, Tato P, Molinari JL, Perez E, Dominguez H, Ostrosky-Wegman P. 2003. Induction of DNA damage in human lymphocytes treated with a soluble factor secreted by *Taenia solium* metacestodes. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* 1, 79–83 (Suppl.).

Ichihara I, Kawamura H, Pelliniemi LJ. 1993. Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tissue Res.* 27(2):241-55.

Ito A, Putra MI, Subahar R, Sato MO, Okamoto M, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, Craig PS, Margono SS. 2002. Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. *J Helminthol.* Dec;76(4):311-4.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y et al. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA;* 108: 4892–6.

Łabedzka K, Grzanka A, Izdebska M. 2006. [Mitochondria and cell death] *Postepy Hig Med Dosw (Online).*60:439-46.

Lalli M, Clermont Y. 1981. Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am J Anat;* 160: 419–34.

Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med.* Sep;114(9):926-8.

Larralde C, Morales J, Terrazas LI, Govezensky T, Romano MC. 1995. Sexhormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 52, 575–581.

Lee J, Richburg JH, Younging SC, Boekelheide K. 1997. The fast system is a keyregulator of germ cells apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138, 2081-2088.

Leshchiner ES, Braun CR, Bird GH, Walensky LD. 2013. Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proc. Natl. Acad. Scir.* Doi 10.1073

Lin YC, Rikihisa Y, Kono H, Gu Y. 1990. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniaeformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Experimental Parasitology* 70, 344–352.

Lin YW, Hsu TH, Yen PH. 2013. Mouse sperm acquire a new structure on the apical hook during epididymal maturation. *Asian Journal of Andology* 15, 523-528.

Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* Jan;146(1):3-15.

Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Cazares JML. 1990. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 84, 205–208.

Monses TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J. 2000. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 32, 239-246.

Morales-Montor J, Gamboa-Rodriguez A, Rodriguez-Dorantes M, Cerbon MA. 1999. Tissue damage in the male murine reproductive system during experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Parasitology* 85, 887–890.

Mruk DD, Cheng CY. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25(5):747-806.

Nash TE, Neva FA. 1984. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N Engl J Med.* Dec 6;311(23):1492-6.

Richburg JH, Boekelheide K. 1996. Mono-(2-ethyl-hexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137, 42–50.

Rikihisa Y, Lin YC, Fukaya T. 1985. *Taenia taeniaeformis*: inhibition of rat testosterone production by excretory-secretory product of the cultured metacestode. *Experimental Parasitology* 58, 147–155.

Rodríguez-Dorantes M, Lopez-Griego L, Zarazua-Cruz CM, Morales-Montor J. 2010. Altered expression of cytokines and sex steroid receptors in the reproductive tract of cysticercotic male mice. *Parasite Immunology* 32, 9–100.

Rubio M, Tato P, Govezenski T, Molinari JL. 1998. Depressed immunity to a *Salmonella typhimurium* vaccine in mice experimentally parasitized by *Taenia crassiceps*. *Veterinary Parasitology* 74, 179–189.

Russell LD, Alger LE, Nequin LG. 1987. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology* 120, 1615–1632.

Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M. 1994. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 193–198.

Singh A, Ni J, Aggarwal BB. 1998. Death domain receptors and their role in cell demise. *J Interferon Cytokine Res.* Jul;18(7):439–50.

Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 136, 2770–2775.

Smith LB, William HW. 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell and development biology.* (in press).

Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE. 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunology* 22, 297–305.

Tait JW, Green DR. 2010. Mitochondrial and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 621–632.

Tato P, Castro AM, Rodriguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL. 1995. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitology Research* 81, 181–187.

Tato P, Clinton Withe Jr A, Willms K, Rodriguez D, Solano S, Sepúlveda J, Molinari JL. 1996. Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide in implanted *T. solium* metacestodes. *Parasitology Research* 82: 590–597.

Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* Mar 10;267(5203):1456–62.

Tsai MY, Yeh SD, Wang RS, Yeh S, Zhang C, Lin HV, Tzeng CR, Chang C. 2006. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *The national academy of sciences*, 103 (50): 18975-18980.

Vazquez V, Sotelo J, 1992. The course of seizures after treatment for cerebral cysticercosis. *N Engl J Med*. 327 (10):696-701.

Wang RS, Shuyuan Y, Tzent CR, Chang C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 30 (2): 119-132.

Wünschmann A, Garlie V, Averbek G, Kurtz H, Hoberg EP. 2003. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. *J Vet Diagn Invest*. Sep;15(5):484-8.

Zepeda N, Copitin N, Solano S, González M, Fernández AM, Tato P, Molinari JL. 2011. *Taenia crassiceps*: infections of male mice lead to severe disruption of seminiferous tubules cells and increased apoptosis. *Experimental Parasitology* 127, 153–159.

Zhang H, Liu B, Qiu Y, Fan Jf, Yu Sj. 2013. Pure cultures and characterization of yak Sertoli cells. *Tissue and Cell*. Article in press.

Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. 1989. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology* 124,6, 3043-2049.

Libros

Abbas AK, Lichtman AH. 2004. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2° edición. W. B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Clermont Y, Oko R, Hermo L., 1993. Cell biology of mammalian spermiogenesis. In: Desjardin C, Ewing LL, editors. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. New York: Oxford University Press; pp332–76.

Eddy E., 2006. The spermatozoon. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. New York: Elsevier; pp3–54.

Guyton AC, Hall JE. 2006. *Fisiología Médica*. 11va ed. Elsevier, España.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6° edición. Mc Graw Hill. USA.

Russell L, Ettlín R, Hikim A, Clegg F. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater. Cache River Press.

Schmidt DG, Meyer CM, Oslen OW., 1988. Essentials of Parasitology. 4° edición. Brown Publishers. Fowa. USA.