

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROLIFERATIVAS EN QUISTES DE *Taenia solium*

Miguel Ángel Orrego-Solano^{1,a}, Carla Cangalaya^{1,b}, Theodore E. Nash^{1,2,c}, Cristina Guerra-Giraldez^{1,3,d}, Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú (CWGP)

RESUMEN

Los neoblastos son células totipotentes, únicas responsables de la proliferación y maduración de tejidos en platelmintos de vida libre. Células similares se han aislado en platelmintos parásitos como *Echinococcus*. *Taenia solium* causa la teniasis humana (intestinal) y la cisticercosis en humanos y cerdos. La infección del cerebro con larvas (quistes) de *T. solium* resulta en neurocisticercosis, hiperendémica en el Perú; su tratamiento se asocia a síntomas neurológicos graves. La capacidad proliferativa y el desarrollo de los estadios de *T. solium* aún no se describen, y no se ha caracterizado los neoblastos de este parásito. Se buscó células proliferativas en quistes de *T. solium* colectados de un cerdo infectado, que fueron identificadas al replicarse e incorporar el nucleótido bromodesoxiuridina, detectado con un anticuerpo monoclonal. Una línea celular estable de neoblastos sería útil para estudios sistemáticos *in vitro* sobre eficacia de drogas y sobre la biología de *T. solium*.

Palabras clave: Parasitología; *Taenia solium*; *In vitro*; Proliferación celular (fuente: DeCS BIREME).

IDENTIFICATION OF PROLIFERATING CELLS IN *Taenia solium* CYSTS

ABSTRACT

Neoblasts are totipotent cells, solely responsible for the proliferation and maturation of tissues in free-living flatworms. Similar cells have been isolated from parasitic flatworms such as *Echinococcus*. *Taenia solium* causes human taeniasis (intestinal) and cysticercosis in humans and pigs. Brain infection with larvae (cysts) of *T. solium* results in neurocysticercosis which is hyperendemic in Peru, and its treatment is associated with serious neurological symptoms. The proliferative capacity and development stages of *T. solium* have not been described and the neoblasts of this parasite have not been characterized. We looked for cell proliferation in *T. solium* cysts collected from an infected pig, which were identified when replicating and incorporating bromodeoxyuridine nucleotide detected with a monoclonal antibody. A stable cell line of neoblasts would be useful for systematic *in vitro* studies on drug efficacy and the biology of *T. solium*.

Key words: Parasitology; *Taenia solium*; *In vitro*; Cell proliferation (source: MeSH, NLM).

INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central; es causada por la invasión al cerebro del metacestodo, larva cisticerco o quiste de *T. solium*. Es endémica en varios países de América Latina, África e India. En el Perú existen zonas rurales y suburbanas hiperendémicas, donde se reporta que el 40% de casos de epilepsia está asociado a la NCC⁽¹⁾. Los quistes son vesículas con fluido, de entre 1 y 2 cm, que se desarrollan a partir de embriones (oncósferas) presentes

en los huevos microscópicos desechados en las heces de una persona con teniasis. Esta ocurre con el consumo de carne de cerdo infectado con quistes de *T. solium*. Al ingerirse el quiste, el escólex del gusano evagina de la vesícula y se adhiere al intestino. Las células del cuello proliferan y se diferencian para dar lugar a los segmentos o proglótidas que al madurar producen millones de huevos⁽¹⁾.

Las manifestaciones de la NCC son variadas, pues dependen del número de quistes, su ubicación, la

¹ Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

² Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, EE. UU.

³ Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

^a Biólogo; ^b tecnóloga médica; ^c médico cirujano; ^d doctora en biología molecular.

Se presentan resultados preliminares que se ampliarán para una Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular.

Recibido: 03-05-14 Aprobado: 24-09-14

respuesta inmune asociada y el desarrollo del parásito en el cerebro. Los ataques epilépticos son causados por la respuesta inflamatoria a la degeneración y muerte de quistes parenquimales, que ocurren principalmente por el uso de antihelmínticos ⁽²⁾. Los quistes llamados racemosos son de crecimiento aberrante y proliferación continua, y se vinculan a alta mortalidad por despertar una fuerte reacción inflamatoria que causa aracnoiditis, hidrocefalia, infartos y daño neurológico focalizado ⁽³⁾.

Los platelmintos de vida libre sirven como modelo para estudiar la biología de las células madre totipotentes llamadas neoblastos, capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula somática ⁽⁴⁾. Los neoblastos se consideran las únicas células mitóticamente activas de estos organismos ⁽⁵⁾ y se investigan intensamente por sus posibles aplicaciones en la medicina regenerativa ^(6,8). Se ha identificado marcadores moleculares asociados con la proliferación en las planarias *D. japonica* y *Schmidtea mediterranea* y se ha descrito su perfil de transcripción ⁽⁶⁾.

Las propiedades de este tipo de células en los platelmintos de la clase Cestoda, a la que pertenece *Taenia*, son mucho más elusivas; su estudio se dificulta porque al ser organismos parásitos, su crecimiento es afectado por factores hormonales e inmunológicos de sus hospederos. Recientemente, el crecimiento *in vitro* de quistes del cestodo *Echinococcus multilocularis* permitió aislar células germinales capaces de diferenciarse hasta la forma larvaria ^(7,8). Estas células indiferenciadas forman parte de las oncósferas y se postula que contribuyen al desarrollo del metacestodo ^(8,9). En este organismo se ha verificado que las células germinativas son las únicas que proliferan ⁽¹⁰⁾, y algunos autores deciden llamarlas neoblastos por ser células madre somáticas totipotentes ^(11,12). Debe notarse, sin embargo, que en platelmintos parásitos existen ciertas diferencias a nivel molecular con las células proliferativas de las planarias ⁽¹⁰⁾. Los neoblastos de diferentes especies tienen una morfología característica: se trata de células con núcleos muy grandes y escaso citoplasma ^(4,13,14).

La disponibilidad de células totipotentes de *T. solium* posibilitaría el ensayo *in vitro* de sustancias cisticidas con menos efectos secundarios que los antihelmínticos actualmente empleados, como se está haciendo con *Echinococcus* ⁽¹⁵⁾; también puede pensarse en estudios funcionales de la relación hospedero-parásito relacionados con el desarrollo y proliferación, o incluso manipulación genética y generación de recombinantes ^(11,15). Este trabajo se realizó para identificar células de *T. solium* similares a neoblastos en quistes provenientes de cerdos infectados; se propone su aislamiento y purificación para obtener una línea celular estable, útil en diversas aplicaciones y estudios.

EL ESTUDIO

Se describe la estrategia para identificar células proliferativas en quistes de *Taenia solium*. El método, empleado en planarias ⁽¹⁶⁾, consiste en cultivar los quistes en presencia del nucleótido modificado 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina, el cual es incorporado en el ADN de las células que se replican. El BrdU captado por las células se detectó por inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal. En paralelo, se indujo la evaginación de otro grupo de quistes para hacer la misma búsqueda en el estadio preadulto del parásito.

Se trabajó con 250 quistes musculares viables de *T. solium* colectados de un cerdo hembra perteneciente al estudio "Eliminación de cisticercosis en Perú", del Centro de Salud Global UPCH, Tumbes, con autorización del Comité Institucional de Ética para Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 03101). La infección del animal se corroboró por inmunoblot contra glicoproteínas de *T. solium* purificadas con lectinas de lenteja (EITB LLGP) ⁽¹⁷⁾.

Los quistes se lavaron seis veces con solución tampón fosfato salino, pH 7,2 (PBS) con antibióticos (80 µg/mL de gentamicina y 100 U/mL de penicilina, ambas de Gibco, Gaithersburg, MD, EE.UU.), y se estabilizaron 24 h en cultivo a 37 °C con CO₂ al 5% en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con tampón HEPES 10 mM (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0,25 µg/mL de anfotericina B).

Aproximadamente 100 quistes se transfirieron a una placa de 12 pozos, entre 6 y 8 quistes por pozo, para incubarlos hasta cinco días a 37 °C con CO₂ al 5% y en presencia de BrdU (Sigma), en concentraciones de 0; 1; 2,5 y 5 mM en el medio de cultivo (2 mL/pozo). Cada 24 h, hasta las 120 h, se tomó una muestra de 3 o 4 quistes de cada grupo, que se fijaron con formalina al 10% (formaldehído al 3,7% en PBS) para la detección de BrdU por inmunohistoquímica.

Una placa de quistes similar se cultivó en medio con BrdU 0; 2,5 y 5 mM por 3 días, al cabo de los cuales se reemplazó 1 mL del medio por 1 mL de bilis porcina al 50% (en el mismo medio), a fin de inducir la evaginación de los parásitos. Muestras de 3 o 4 quistes se colectaron a los 30 min, 1 h, 5 h, 12 h, 24 h y 48 h de agregada la bilis, y se fijaron con formalina al 10%.

Las muestras fijadas se incluyeron en bloques de parafina, y secciones de 4 µm se montaron en láminas revestidas con poli-L-lisina. Para la tinción por

Tabla 1. Tiempos de incubación de quistes con diferentes concentraciones de BrdU y observaciones correspondientes.

tiempo (h)	0	24	48	72	96	120
BrdU						
0 (control)	No hubo marca					
1 mM	No hubo marca	Foto 1	Resultados similares a 24 h			
2,5 mM			Ruido de fondo leve			
5 mM			Ruido de fondo elevado			

Tabla 2. Tiempos de inducción de evaginación de quistes luego de tres días de incubación con diferentes concentraciones de BrdU y observaciones correspondientes.

tiempo (h)	0,5	1	5	12	24	48
3 d en BrdU						
0 (control)	No hubo marca					
2,5 mM	evag. escasa	Foto 2	Menor proliferación; ruido leve			
5 mM			Ruido de fondo muy elevado			

inmunohistoquímica, la parafina se disolvió a 56 °C y se retiró mediante un pasaje de 5 min con xileno, seguido por pasajes en un gradiente descendente de etanol (del 100 al 70%) y uno último con agua destilada, para hidratar las láminas. Por último, se las dejó 30 min en peróxido de hidrógeno al 6%, a temperatura ambiente. La recuperación de antígeno se realizó por 30 min

a 95 °C en *buffer* citrato (citrato de sodio 10 mM en *Tween-20* al 0,05%). Antes de la detección se bloqueó las láminas por 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda con suero de cabra al 2%, albúmina sérica bovina al 2%, leche desgrasada al 2%, *Tween-20* al 0,05% y Triton X-100 al 0,1% en PBS. Finalmente, las láminas se expusieron 18 h, a 4 °C, a anti-BrdU de ratón (Sigma), en diluciones 1:500, 1:1000 y 1:2000 en PBS. Se empleó un anticuerpo biotinilado, IgG antirratón hecho en cabra (Vector, Burlingame, CA, EEUU), incubado a temperatura ambiente por 30 min. El cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Dako, Dinamarca) se detectó con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Dako), que resulta en un precipitado de color marrón característico cuando hay reacción positiva. Los lavados entre incubaciones se hicieron con *Tween-20* al 0,05% en PBS. Las láminas se observaron en un microscopio Primo Star (Zeiss, Alemania) y se fotografiaron con una cámara calibrada (AxioCam ICc1, Zeiss, Alemania).

HALLAZGOS

El estudio permitió determinar que la concentración óptima de BrdU para observar células que incorporaron esta molécula fue 1 mM; concentraciones superiores mostraron ruido de fondo. También se determinó que la mejor dilución de anti-BrdU para la detección fue 1:2000; a 1:1000 y 1:500 se obtuvo ruido de fondo. Las Tablas 1 y 2 resumen las observaciones.

Entre los quistes cultivados cinco días, la primera muestra para inmunohistoquímica se tomó a las 24 h de agregado el BrdU; como control se usó una muestra cultivada el mismo tiempo pero sin BrdU. La Figura 1 muestra, a 4X (1A; permite observar la morfología del quiste) 10X (1B), 40X (1C) y 100X (1D), que ya desde el primer día de cultivo eran visibles células marcadas (patrón punteado marrón) de 7-10 mm, con núcleos muy prominentes (Figura 1D). A 48, 72, 96 y 120 h las observaciones fueron similares.

Un número muy superior de células marcadas se detectó en quistes inducidos a evaginar luego de tres días de cultivo en BrdU 2.5 mM. La Figura 2, con los mismos aumentos que la Figura 1, muestra abundantes células en proliferación en la región parenquimal de las zonas laterales del escólex, morfología evidente en 2A. La muestra se tomó 1 h después de agregada la bilis porcina. Puntos de tiempo posteriores (6, 12, 24 y 48 h) tuvieron progresivamente menos células proliferativas. Entre las células marcadas fue posible ver algunas en las que los núcleos, siempre de gran tamaño, ya mostraban indicios de separarse en dos masas (Figura. 2D).

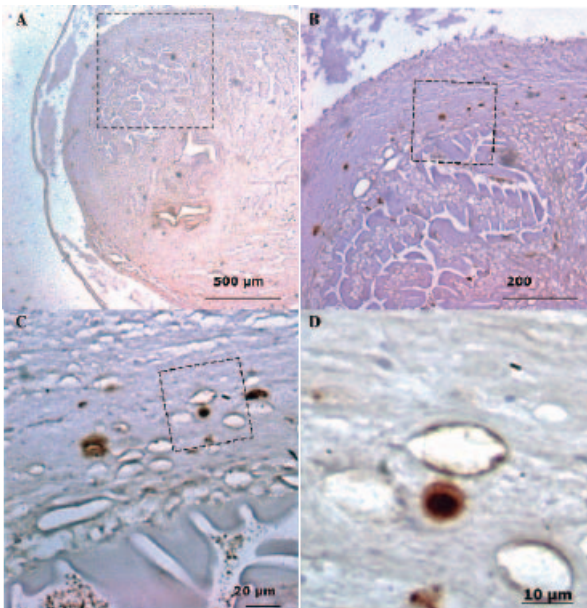


Figura 1. Detección de células proliferativas en quistes de *T. solium* por inmunohistoquímica. Se muestra la reacción positiva a DAB en quistes cultivados 24 h con BrdU 1 mM. A: Aumento: 4X; B: Aumento: 10X; C: Aumento: 40X; D: Aumento: 100X. Las fotos en B, C y D muestran la ampliación de la región señalada con el recuadro en la foto anterior.

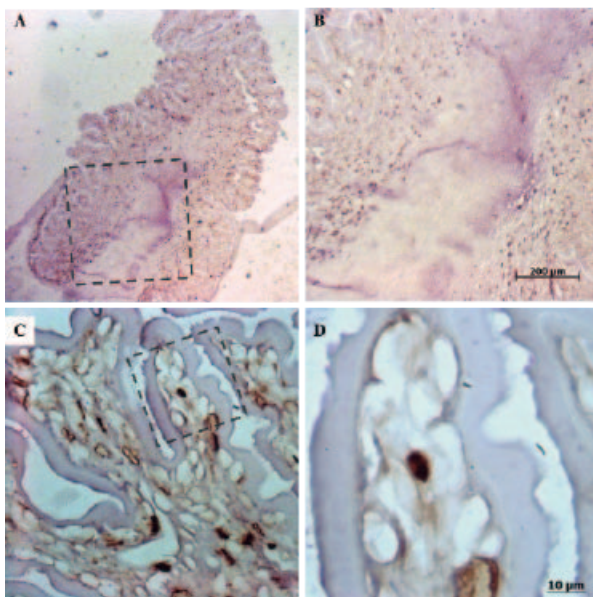


Figura 2. Presencia de células proliferativas en quistes incubados tres días con BrdU 2,5 mM y luego inducidos a evaginar por 1 h. A: Aumento: 4X; B: Aumento: 10X; C: Aumento: 40X; D: Aumento: 100X. Las fotos en B y D muestran la ampliación de la región señalada con el recuadro en la foto anterior.

DISCUSIÓN

Este trabajo consiste en la búsqueda de posibles neoblastos de *Taenia solium*, mediante la identificación de células proliferativas por la incorporación del análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU); este método se ha empleado para marcar neoblastos en planarias ⁽¹⁶⁾. En estos organismos, los neoblastos son las únicas células capaces de proliferar y diferenciarse. En el caso de *T. solium*, la incubación con BrdU permitió identificar células en replicación en el estadio larvario (quiste o metacestodo) y también en la fase preadulta, obtenida al inducir la evaginación *in vitro* de los quistes.

Aunque el papel de los neoblastos en la regeneración de las planarias se estudia desde los años 40 ⁽⁵⁾, la descripción de tejidos germinales en cestodos fue recién posible por estudios hechos en los años 70 en *Hymenolepis* adultos ⁽¹³⁾. Más adelante, en 1997, se identificaron las células de la región germinativa de *Taenia solium* ("células madre somáticas") presentes en quistes evaginados *in vitro* ⁽¹⁴⁾, y posteriormente se ha demostrado mitosis en tejido germinal de *T. solium* en fase adulta temprana, gusanos "juveniles" recuperados de los intestinos de hamsters a los que se había inoculado quistes viables ⁽¹⁸⁾.

En los últimos años ha habido un gran avance en el aislamiento, caracterización y establecimiento de una línea celular de *Echinococcus* ⁽⁷⁻¹¹⁾, pero la literatura sobre neoblastos o tejido germinal de *Taenia* es escasa. El presente trabajo detecta células proliferativas en quistes no evaginados de *T. solium*, de los cuales no se encuentra registro previo.

En quistes viables, células con morfología de neoblastos (Figura 1D), descrita en planarias y cestodos ^(4,13,14), fueron claramente visibles a las 24 h de cultivo con BrdU (Figura 1), lo que indica que habían replicado su ADN. En quistes evaginados se observó una marcada proliferación de estas células una hora luego de inducir la evaginación (Figura 2), con una distribución que recuerda la reportada en el mismo estadio ("preadulto"), detectado con timidina tritiada ⁽¹⁴⁾.

El marcado y la morfología son complementarios. Las células marcadas se distribuyen en la base del escólex, y su morfología permite proponerlas como neoblastos. Si esto se verifica, se intentará aislar estas células para establecer una línea celular como la existente para *Echinococcus*. El aislamiento de neoblastos mediante digestión con proteasas y cocultivo con células de mamífero ha sido ya posible a partir de quistes de *T. crassiceps* ⁽¹⁹⁾, y se está empleando citometría de flujo para aislar y cuantificar neoblastos de *Mesocestoides corti*, otro cestodo ampliamente usado en cultivo ⁽²⁰⁾.

Además de la posibilidad de realizar estudios de sensibilidad a drogas y determinación de nuevos principios antihelmínticos, es atractivo establecer líneas celulares de *T. solium* para facilitar análisis de expresión genética o perfiles de transcripción en aspectos del desarrollo (marcadores moleculares específicos de los diferentes estadios), de la relación hospedero-parásito, como señalización y virulencia, o de la ruta inflamatoria en cerebro, de conocimiento bastante limitado.

Agradecimientos: agradecemos a Gissel Ocampo, Ricardo Gamboa, Viterbo Ayvar y Luz María Moyano, del laboratorio del Centro de Salud Global UPCH (Tumbes) por proporcionar quistes de *T. solium*.

Fuente de financiamiento: subvención Fincyt (Concytec) a investigación básica; PIBA-1-P-4453-13.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribuciones de autoría: TEN concibió el trabajo; MAO y CGL procesaron muestras; MAO y CGG obtuvieron financiamiento, diseñaron el estudio y el artículo, analizaron los resultados, redactaron el artículo y aprobaron su versión final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH; Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*. 2003 Aug 16;362(9383):547-56.
2. Alvarez JI, Colegial CH, Castaño CA, Trujillo J, Teale JM, Restrepo BI. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J Neuroimmunol*. 2002 Jun;127(1-2):139-44.
3. Takayanagui OM, Odashima NS. Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitol Int*. 2006;55 Suppl:S111-5.
4. Shibata N, Rouhana L, Agata K. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev Growth Differ*. 2010 Jan;52(1):27-41. doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01155.x.
5. Gremigni V, Miceli C, Puccinelli I. On the role of germ cells in planarian regeneration I. A karyological investigation. *J Embryol Exp Morphol*. 1980 Feb;55:53-63.
6. Rossi L, Salvetti A, Batistoni R, Deri P, Gremigni V. Planarians, a tale of stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jan;65(1):16-23.
7. Spiliotis M, Tappe D, Sesterhenn L, Brehm, K. Long term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitol Res*. 2004 Mar;92(5):430-2.
8. Spiliotis M, Lechner S, Tappe D, Scheller C, Krohne G, Brehm K. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. *Int J Parasitol*. 2008 Jul;38(8-9):1025-39.
9. Spiliotis M, Brehm K. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. *Methods Mol Biol*. 2009;470:245-62. doi: 10.1007/978-1-59745-204-5_17.
10. Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodríguez L, Krohne G, Brehm K. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo*. 2014 Mar 6;5(1):10. doi: 10.1186/2041-9139-5-10.
11. Brehm K. *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitology*. 2010 Mar;137(3):537-55. doi: 10.1017/S0031182009991727.
12. Reuter M, Kreshchenko N. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can J Zool*. 2004;82(2):334-56.
13. Bolla RI, Roberts LS. Developmental physiology of cestodes. IX. Cytological characteristics of the germinative region of *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol*. 1971 Apr;57(2):267-77.
14. Merchant MT, Corella C, Willms K. Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *J Parasitol*. 1997 Jun;83(3):363-7.
15. Hemphill A, Stadelmann B, Scholl S, Müller J, Spiliotis M, Müller N, et al. *Echinococcus* metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. *Parasitology*. 2010 Mar;137(3):569-87. doi: 10.1017/S003118200999117X.
16. Newmark PA, Sánchez Alvarado A. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol*. 2000 Apr;220(2):142-53.
17. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989 Jan;159(1):50-9.
18. Willms K, Merchant MT, Gómez M, Robert L. *Taenia solium*: germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. *Arch Med Res*. 2001 Jan-Feb;32(1):1-7.
19. Toledo A, Cruz C, Frago G, Lacleite JP, Merchant MT, Hernández M, et al. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J Parasitol*. 1997 Apr;83(2):189-93.
20. Domínguez MF, Koziol U, Porro V, Costáble A, Estrade S, Tort J, et al. A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes. *Exp Parasitol*. 2014 Mar;138:25-9. doi: 10.1016/j.exppara.2014.01.005.

Correspondencia: Cristina Guerra-Giraldez
 Dirección: Laboratorios de Investigación y Desarrollo, LID 115. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, SMP. Lima 31, Perú
 Teléfono: 4824279
 Correo electrónico: cristina.guerra@upch.pe