

Instituto "López-Neyra" de Parasitología
Sección de Helmintología
C.S.I.C.

y

Departamento de Parasitología
Facultades de Farmacia y Ciencias
Granada, España

CULTIVO "IN VITRO" DE *TAENIA HYDATIGENA*

por

OSUNA CARRILLO, A.*; MASCARÓ LAZCANO, C.**; GUEVARA
POZO, D.***; GUEVARA BENITEZ, D.****

SUMMARY

From a *cysticerci* to a non-fertile adult phase, reporting the sterile techniques of *cysticerci* dissection and the enzymatic treatments prior to the "in vitro" culture, *Taenia hydatigena* is cultivated.

A difasic medium composed of: Bovine serum coagulated by heat as the solid phase, and CMRL 1.066, (Gibco) modified by FCS, yeast extract, glucose and CIK as the liquid phase is used. CO₂, N₂ and O₂ is used as the gaseous phase.

INTRODUCCION

Es admitido generalmente, que muchos aspectos de la biología, fisiología, bioquímica e inmunología de los parásitos, podrán estudiarse más fácilmente cuando su cultivo "in vitro" esté totalmente resuelto.

A pesar de las enormes ventajas que el cultivo de parásitos supone, no sólo para los parasitólogos, sino para los biólogos en general, debido a las grandes potencialidades biológicas

* Dr. en Ciencias Biológicas.

** Prof. Adjunto.

*** Catedrático.

**** Prof. Agregado.

(Recibido el 29-IX-1977).

REV. IBER. PARASITOL. Vol. 38 (1-2), 1978.

que estos seres encierran, pocos parásitos, en particular helmintos, han logrado cultivarse a pesar del enorme impulso que se ha dado al tema en los últimos años.

Concretándonos al campo del cultivo "in vitro" de cestodes, la atención de los especialistas se ha centrado en unas pocas especies. Entre los cestodes que han sido cultivados "in vitro" con resultados satisfactorios, aunque en ningún caso se haya conseguido cerrar el ciclo biológico de los parásitos de forma total, y que poseen "in vivo" un habitat en sus hospedadores definitivos similar al cestode objeto de nuestro estudio, podemos citar *Echinococcus granulosus* (6, 7, 8); *E. multilocularis* (9, 10); *Taenia serialis* (6) y *T. crassiceps* (1).

Tratando de aportar nuevos datos al problema del cultivo "in vitro" de cestodes, hemos realizado el presente trabajo, en el que como material parasitológico empleamos *T. hydatigena* por la facilidad de obtención en nuestra zona de fases larvianas de este parásito, y porque en la amplia bibliografía consultada sólo hemos encontrado como referencias al cultivo "in vitro" de *Taenia hydatigena* dos trabajos realizados por algunos de nosotros anteriormente, OSUNA CARRILLO y GUEVARA POZO (4, 5).

Con anterioridad a los trabajos arriba señalados, concretamente en 1969, FEATHERSON (2), estudió en perros experimentalmente infestados con cisticercos de *T. hydatigena*, la evolución de este parásito "in vivo". El mismo autor en 1971 (3), estudia los factores enzimáticos que afectan a la desenvaginación de los cisticercos de *T. hydatigena* "in vitro".

MATERIAL Y METODOS

Los cisticercos de *T. hydatigena* procedían de la cavidad abdominal de caprinos y bovinos sacrificados en el Matadero de Granada para el consumo cárnico y fueron transportados al laboratorio, a temperatura ambiente, transcurriendo desde su obtención hasta su llegada al mismo de media a una hora como máximo.

Operaciones preliminares

Los cisticercos, una vez en el laboratorio, eran almacenados en cristalizadores a 4°C durante 2 horas como máximo.

Transcurrido este tiempo, se procedía a una serie de lavados de los cisticercos al objeto de desinfectar la membrana periquística, introduciéndolos en primer lugar en una solución de Cloruro de Benzalcomio (1: 5.000), durante 45 segundos y pasándolos seguidamente a Alcohol de 70°, donde se les mantenía por espacio de 2 minutos.

Una vez lavados los cisticercos en las dos soluciones anteriores, eran tomados uno a uno para, tras cortar su membrana periquística, sacar estérilmente la vesícula, vaciar el líquido de la misma y separar el cisticercos de las membranas. Seguidamente, éste se colocaba en solución de Hank (pH = 7'2) previamente calentada a 38°C, donde los cisticercos eran lavados tres veces al objeto de eliminar el líquido vesicular que arrastrasen.

Tratamiento pépsico

Después del lavado en solución de Hank, los cisticercos eran transferidos mediante pipeteo estéril, a una solución de pepsina, (1:10.000) Merk al 0'5 por ciento en BBS de Hank ajustada a pH = 1'7 con ClH 1N, donde se les mantenía en agitación constante, de 90 impulsos/minuto, a $39 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 70 minutos.

Transcurrido el tiempo del tratamiento pépsico, los cisticercos eran tomados con pipeta y lavados tres veces nuevamente en solución Hank caliente a 38°C, ajustada a pH = 7'2.

Proceso desenvaginante

Una vez lavados los cisticercos, eran transferidos a la solución desenvaginante estéril, compuesta de tripsina (BDH) 0'15 por ciento P/V; Pancreatina (BDH) 0'3 por ciento P/V y Bilis vesicular de perro 0'05 por ciento V/V. La disolución de estos tres componentes se hizo en solución BSS de Hank ajustada a pH = 7'2. Previamente a la introducción de los cisticercos, la solución desenvaginante era calentada a 38°C y en ella se les mantenía por espacio de 18-20 horas en agitación constante de 90 impulsos por minuto.

Proceso de separación de las "masas" del cisticerco

Una vez los cisticercos desenvaginados, eran pasados a un frasco conteniendo 5 ml de suero bovino coagulado (80°C; 60 minutos) y 5 ml de una mezcla 1:1 de la solución desenvaginante y la fase líquida del medio que más tarde se señala en la técnica de cultivo, siendo gaseado todo intensamente con mezcla de CO₂ 10 por ciento, N₂ 85 por ciento, O₂ 5 por ciento. En este medio todos los cisticercos estaban separados de sus respectivas "masas" a las 72 horas quedando libres los escolex.

Técnica de cultivo

Los escolex eran pasados a frascos Falcon de 25 cm² de área, donde previamente se había coagulado por calor 5 ml de suero bovino. Como fase líquida, 5 ml de medio de cultivo cuya composición es la siguiente:

CMRL 1066 (Gibco)	100 ml
Suero bovino fetal (Gibco)	25 ml
Extracto de levadura (Oxoid) al 5 por ciento.	12'5 ml
Glucosa 30 por ciento... ..	2'2 ml
CIK 2 por ciento	0'5 ml

el medio se ajusta a un pH = 7'2.

El suero bovino fetal fue inactivado a 56°C durante 30 minutos antes de adicionarlo. Como fase gaseosa se empleó: CO₂ 10 por ciento, N₂ 85 por ciento y O₂ 5 por ciento.

Los medios de cultivo eran esterilizados por filtración a través de filtro Sartorius de 0'22 micras. Los medios eran cambiados cada tres días, manteniéndose siempre a 39°C ± 1°C en agitación constante de 90 impulsos/minuto.

Manteniendo las condiciones antes indicadas se ha estudiado la evolución de *T. hydatigena* empleando 30 frascos Falcon, sembrados cada uno de ellos con 6 escolex libres.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos los ordenamos, en concordancia con otros autores que investigan con otros cestodes, en los estadios siguientes:

1.º *Desenvaginación*.—A las 18-20 horas de ser colocados en el medio desenvaginante, el 100 por ciento de los cisticercos aparecen desenvaginados, observándose, asimismo, un alargamiento del cuello. Este alargamiento del cuello es considerado por nosotros como "primer estadio de evolución".

2.º *Separación de las "masas"*.—La separación del escolex de la masa del cisticerco se produce, en el medio utilizado a este fin, entre las 24 y 72 horas de permanencia en el mismo, produciéndose este proceso en el 100 por ciento de los cisticercos tratados. Esta separación la consideramos el "segundo estadio": rotura y separación de los escolex de sus respectivas "masas" (Fig. n.º 1).

CISTICERCO DE T. HYDATIGENA



Sin embargo, cuando el tratamiento péptico previo fue menos intenso (menos concentración de pepsina o menos tiempo de tratamiento), no se consiguió la separación de las "masas" en un 100 por ciento de los casos. (Los resultados de los cultivos efectuados después de tratamiento péptico débil no se incluyen en este estudio por haberse efectuado en condiciones experimentales diferentes).

Colocados los escolex libres en el medio de cultivo, la evolución de los mismos fue la siguiente:

3.º Aparición de canales excretores.—A las 48 horas, en algunos escolex libres comienzan a visualizarse los canales excretores longitudinales. “Estadio 3.º de evolución”. (Fig. 2, B).

4.º Ondulación de los canales excretores.—A las 96 horas, todos los ejemplares aparecen aplanados, mostrando crecimiento. Miden unos 4 mm de longitud media, habiéndose duplicado la longitud que tenían en el momento de la siembra; los canales excretores aparecen muy visibles en todos los ejemplares, con manifiesta ondulación. (Fig. 2 C).

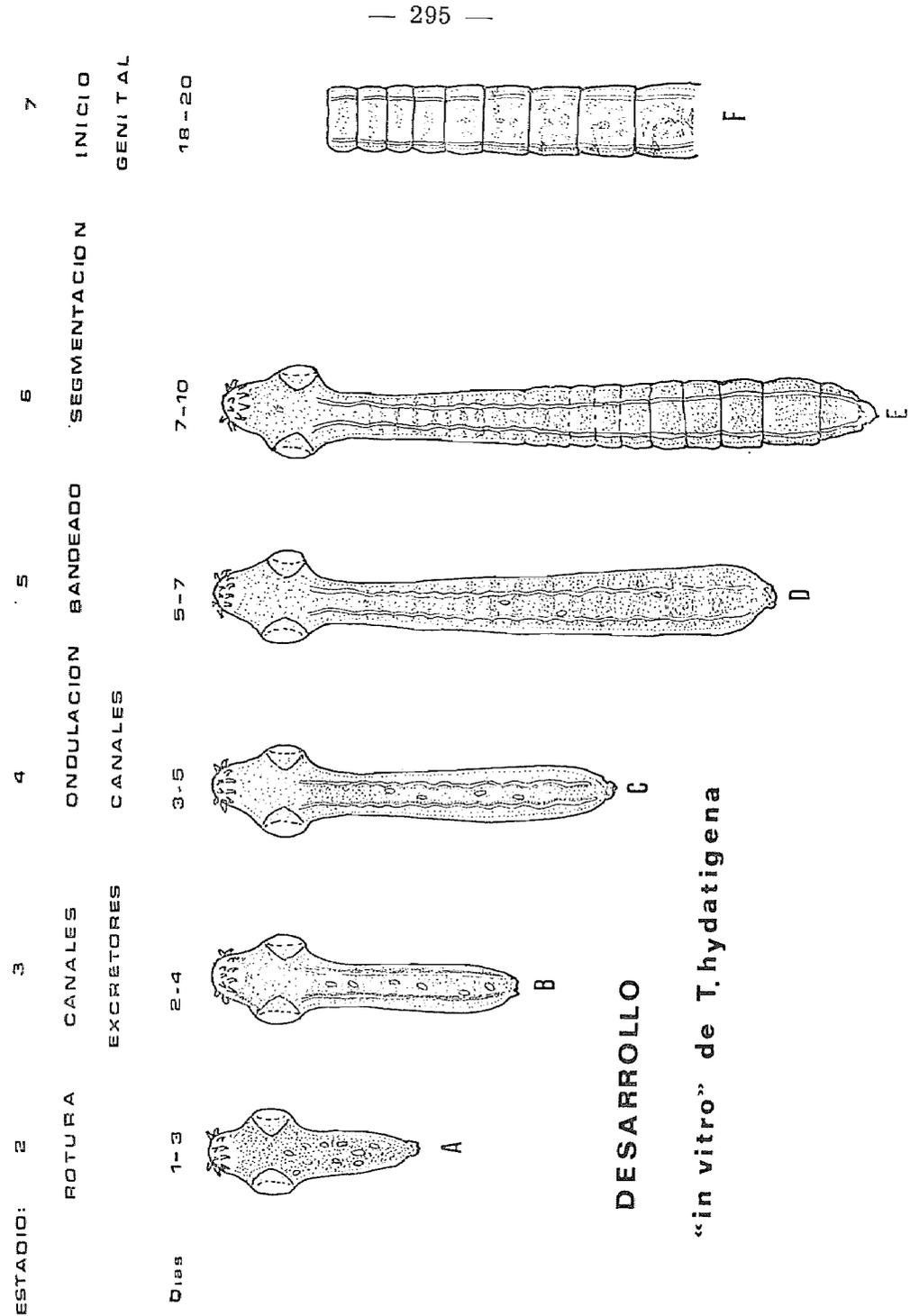
5.º—Bandeado.—Asimismo, entre las 72 y 120 horas, empiezan a mostrar condensaciones celulares transversales: “5.º estadio de evolución” (Fig. 2 D), que consideramos previo a la estrobilación real, y que denominamos, al igual que otros autores, “bandeado”. Antes de aparecer este estadio, los canales excretores longitudinales aparecen ondulados: “4.º estadio evolutivo”. (Fig. 2 C).

6.º Estrobilación.—A las 168 horas, todos los vermes muestran “bandeado” más o menos acusado, midiendo unos 11 mm de longitud. Este “bandeado”, entre las 192 y 216 horas, aparece más condensado, convirtiéndose en estrobilación en la totalidad de los helmintos: “6.º estadio evolutivo” (Fig. 2 E). Al décimo día miden de 15 a 16 mm de longitud. En algunos ejemplares apareció esta fase de desarrollo hacia el séptimo día, observándose un contacto entre los canales excretores longitudinales en el anillo distal.

Entre el duodécimo y decimoquinto días, se forma en los anillos el “velum” de los mismos, y en el último anillo los canales excretores desembocan en un ensanchamiento constituyendo la vesícula excretora. Modificaciones éstas propias del llamado “6.º estadio evolutivo”.

7.º Primordios genitales.—Entre el decimoctavo y vigésimo días, se observan condensaciones celulares organizadas en el interior de los anillos, correspondientes a los inicios genitales, así como una protuberancia alternante en los anillos distales, que interpretamos como el lugar donde aparecería en los helmintos adultos el poro genital. Miden unos 20 mm de longitud media: “7.º estadio evolutivo” y último logrado “in vitro” bajo nuestras condiciones experimentales: “inicio genital”. (Fig. 2 F).

Al vigésimosegundo día miden unos 25 mm de longitud media, obteniéndose el máximo de crecimiento a los 35 días de



cultivo, con longitudes que oscilan entre 35 y 40 mm. Algunos cultivos sobrevivieron hasta 56 días, no lográndose mayor evolución que la obtenida hacia el vigésimo día.

DISCUSION

La evolución mostrada por *Taenia hydatigena* "in vitro", bajo nuestras condiciones experimentales, desde cisticerco hasta el máximo desarrollo logrado "'in vitro" a los 20 días, la hemos dividido en siete estadios evolutivos, no siempre fáciles de distinguir unos de otros, tratando de acomodarlos a los que otros autores (7, 1), señalan para la evolución "in vitro" de otros cestodes.

El primer estadio corresponde a la desenvaginación del cisticerco y alargamiento del cuello del mismo. Este estadio ocurre en *T. hydatigena* en la misma solución desenvaginante, estando todos los cestodes en este estadio a las 20 horas de tratamiento.

El segundo estadio corresponde a la separación del escolex del resto del cisticerco. El cuello se rompe por una zona en la que las cutículas parecen estrecharse y que ya es visible en el estadio anterior, quedando el escolex libre de su respectiva "masa". Este estadio ocurre en el 100 por ciento de los cisticercos entre el 1.º y 3.º día de la siembra en los frascos conteniendo el medio para dicha finalidad. Este proceso de separación, quizás sea consecuencia de tres factores: a) los activos movimientos del escolex del cisticerco desenvaginado, ayudados por la resistencia causada por la fase sólida al intento de penetración en la misma por los escolex; b) los componentes de las soluciones enzimáticas, tanto de la solución péptica como de la solución desenvaginante, ya que quizás la pepsina actúe sobre los tejidos de la zona de rotura aún incluso mientras el cisticerco permanece invaginado, pues las experiencias citadas con tratamiento péptico poco intenso no condujeron al 100 por ciento de roturas; c) la actuación de enzimas endocelulares que tras alguna estimulación, bien en la digestión péptica o en presencia de algún factor de la solución desenvaginante, se pongan en funcionamiento con autólisis de los tejidos de la zona de rotura y cuyo papel no debe descartarse. La influencia de estos tres factores está siendo objeto de estudio para su confirmación.

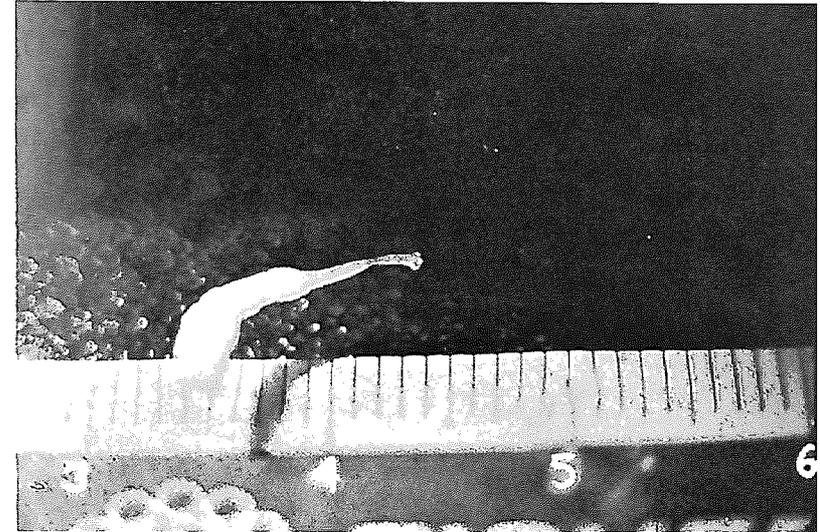


Fig. n.º 1.—Escolex desenvaginado "in vitro". Se aprecia, tras el alargamiento del cuello, la zona por donde se realizará la "rotura"



Fig. n.º 2.—Se observa el estrechamiento existente en el cuello del cisticerco desenvaginado, antes de realizarse la separación del escolex del resto del cisticerco (100 x)



Fig. n.º 3.—Se aprecia la zona de “rotura” en un escolex ya libre del resto del cisticerco. Puede observarse una zona donde la cuticula se adelgaza hasta desaparecer. (100 ×)

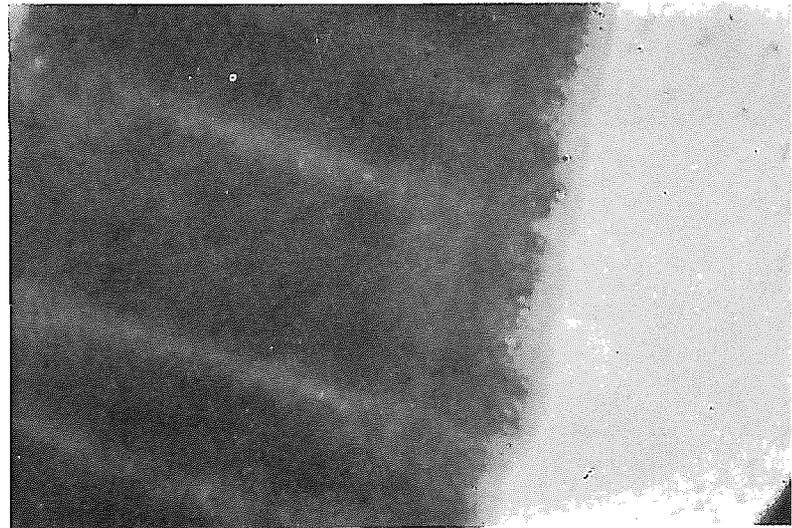


Fig. n.º 4.—Cultivo “in vitro” de *T. hydatigena*: Segmentación (100 ×)



Fig. n.º 5.—Cultivo de *T. hydatigena*. Segmentación, formación de estróbilos. Vision global

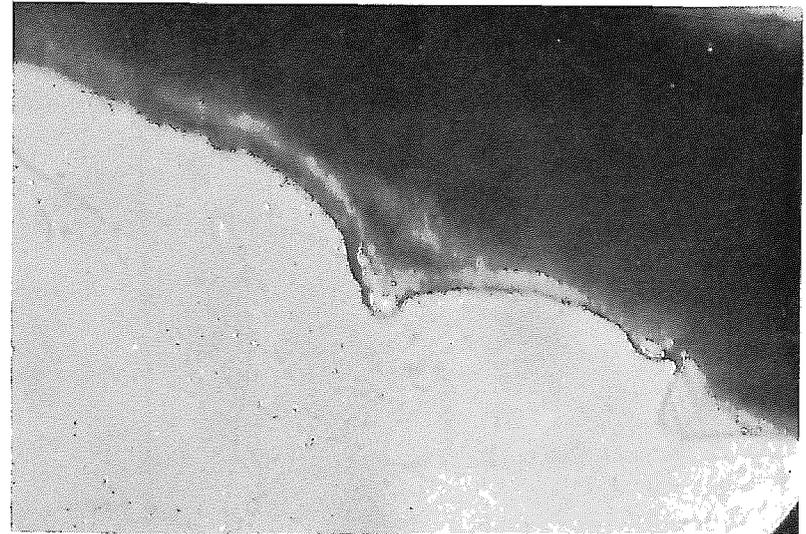
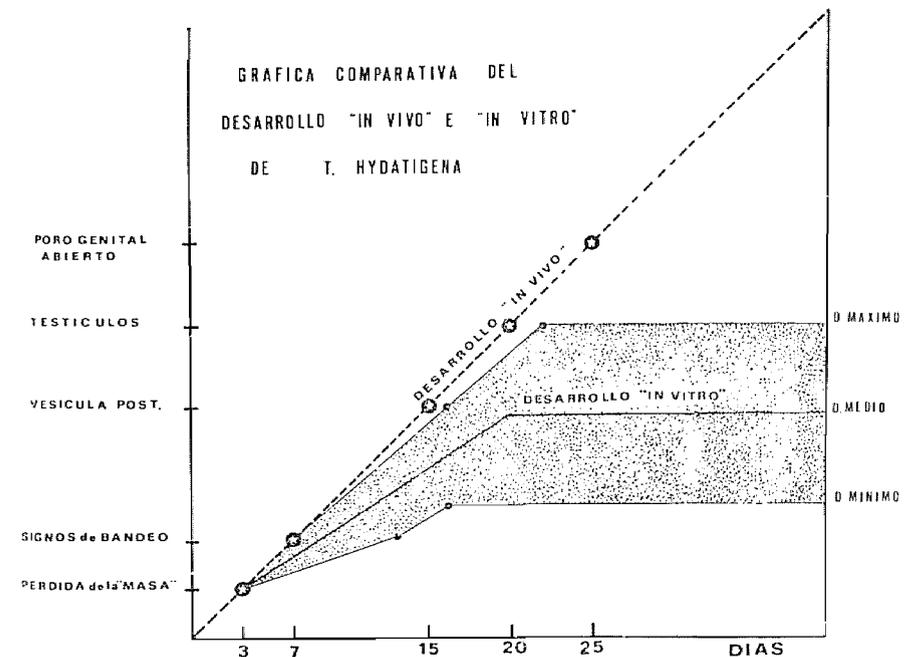


Fig. n.º 6.—Cultivo de *T. hydatigena*. Velum formado. Se observa el inicio del poro genital

Comparando la máxima evolución "in vitro" lograda en *E. granulossus*, *T. serialis* y *T. crassiceps* por SMYTH y colaboradores (6, 7, 8, 1), con la lograda por nosotros en *T. hydatigena*, comprobamos que los resultados obtenidos son similares en todos los casos: anillos con diferenciación genital pero no anillos grávidos. Quizás, por tanto, *T. hydatigena* tenga unos requerimientos biológicos similares a los necesarios para la evolución de los cestodes antes citados. No debemos olvidar la similitud de habitat "in vivo" de estos cestodes, así como la semejanza de los medios de cultivo empleados para su desarrollo "in vitro".

Estos tres cestodes antes señalados llegan "in vitro" a la segmentación en 14, 11 y 4 días, respectivamente, lo que ocurre con *T. hydatigena* aunque a los 7-9 días. Las diferencias en el tiempo en que se consigue la segmentación, entendemos que son debidas a la variabilidad típica de cada especie.

Por otra parte, *T. hydatigena* sufre, bajo nuestras condiciones experimentales, una evolución casi idéntica, en los primeros estadios a la descrita por D. W. FAETHERSON (1969) (2), "in vivo". (Gráfica n.º 1).



Al séptimo día de desarrollo "in vivo", muestra *T. hydatigena* signos de estrobilación, e "in vitro" aparece "bandedado". Quizás los signos de estrobilación de los que habla FEATHERSON corresponden a este inicio de segmentación que es el bandedado.

Al 15.º día "in vivo", cita FEATHERSON que aparece la vesícula en el proglotis distal, "in vitro" sucede al 16.º día.

El que estos helmintos no lleguen a adultos fértiles, quizás dependa de la falta de algún componente indispensable en el medio o, como indica SMYTH en 1974 (7) para *E. granulossus*, de "la falta de una cierta presión de las vellosidades intestinales sobre el verme, con la cual el cirro llegaría a verse forzado a penetrar en el poro genital".

RESUMEN

Se cultiva *T. hydatigena* desde la fase de cisticerco hasta iniciación del estado adulto.

Se describen las técnicas estériles de disección y tratamientos enzimáticos preparatorios al cultivo.

Se ha empleado un medio difásico a base de Suero bovino coagulado por calor como fase sólida, y como fase líquida CMRL 1066 (Gibco) modificado con FCS, Extracto de levadura, Glucosa y Cloruro potásico. Como fase gaseosa se emplean CO₂, N₂ y O₂.

AGRADECIMIENTO

Nuestro mayor agradecimiento a doña Amelia Zarza por su eficiente ayuda técnica.

REFERENCIAS

1. ESCH, G. W.; SMYTH, J. D. (1976).—Studies on the "in vitro" culture of *Taenia crassiceps*. Int. J. for Parasitol., 6: 143-149.
2. FEATHERSTON, D. W. (1969).—*Taenia hydatigena*. I. Growth and development of adult stage in the dog. Exp. Parasitol., 25: 329-338.
3. FEATHERSTON, D. W. (1971).—*Taenia hydatigena*. II. Evagination of cysticerci and establishment in dogs. Exp. Parasitol., 29: 242-249.
4. A. OSUNA-CARRILLO y D. GUEVARA-POZO (1974).—Cultivo "in vitro" de *Taenia hydatigena*. Experiencias preliminares. Proc. Third International Congress of Parasitology, 1: 458. Sec. B - 6.
5. A. OSUNA-CARRILLO y D. GUEVARA-POZO (1976).—Experiencias de desevaginación del cisticerco y de organogénesis del estróbilo de *T. hydatigena* cultivada "in vitro". Proc. 1.º Congreso Nacional Parasitología. Granada: 72.

6. SMYTH, J. D. (1969).—Parasites as biological models. Parasitol., 59: 73-91.
7. SMYTH, J. D.; DAVIES, Z. (1974).—"In vitro" culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulossus* (sheep strain): a review of basic problems and results. Intern. J. Parasitol., 4: 631-644.
8. SMYTH, J. D.; DAVIES, Z. (1974).—Occurrence of physiological strains of *Echinococcus granulossus* demonstrated by "in vitro" culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. Inter. J. Parasitol., 4: 443-445.
9. SMYTH, J. D.; DAVIES, Z. (1975).—"In vitro" suppression of segmentation in *E. multilocularis* with morphological transformation of protoscoleces into monozoic adults. Parasitol., 71: 125-135.
10. WEBSTER, G. A.; CAMERON, T. W. M. (1963).—Some preliminary observations on the development of *Echinococcus* "in vitro". Can. J. Zool., 41: 185-195.