

142  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA  
GLUTATION PEROXIDASA (GSH - Px) DE  
CISTICERCOS DE Taenia crassiceps.

T E S I S  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
HEIDI MOYAO LOPEZ



México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



## **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 está 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.

## INDICE.

|   | Página |
|---|--------|
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1      |
| 1. VISION PANORAMICA DE LA CISTICERCOSIS /<br>TENIASIS .....  | 1      |
| 2. CLASIFICACION DE <u>Taenia solium</u> Y <u>Taenia</u><br><u>crassiceps</u> .....                 | 6      |
| 3. MODELOS EXPERIMENTALES DE <u>Taenia solium</u> Y<br>OTROS TENIDOS .....                          | 6      |
| 4. <u>Taenia crassiceps</u> COMO MODELO EXPERIMENTAL DE<br>CISTICERCOSIS .....                      | 10     |
| 5. MORFOLOGIA DE LOS CISTICERCOS DE <u>Taenia</u><br><u>solium</u> Y <u>Taenia crassiceps</u> ..... | 11     |
| 6. SIMILITUD ANTIGENICA ENTRE <u>Taenia solium</u> Y<br><u>Taenia crassiceps</u> .....              | 19     |
| 7. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LA GLUTACION<br>PEROXIDASA (GSH-Px) .....                         | 22     |
| 7.1. Clasificación Internacional .....  | 23     |
| 7.2. Estructura de la proteína .....  | 23     |
| 7.3. Estabilidad .....  | 25     |
| 7.4. Pureza .....   | 25     |
| 7.5. Reacción enzimática .....  | 26     |
| 7.6. Propiedades cinéticas .....  | 28     |
| 7.7. Glutación peroxidasa no dependiente del<br>selenio .....                                       | 30     |

|  | Página |
|--|--------|
| 7.8.Glutati6n peroxidasa de <u>Taenia taeniaeformis</u> .....                            | 32     |
| 8.RADICALES LIBRES DE OXIGENO .....  | 33     |
| 8.1.Naturaleza de los radicales de oxigeno ....  | 33     |
| 8.1.1.Radicales derivados del oxigeno .....  | 36     |
| 8.1.2.Producci6n biol6gica de radicales ....   | 41     |
| 8.2.Defensas biol6gicas contra los radicales .....                                       | 43     |
| 9.PARTICIPACI6N DE LA GSH-Px EN LA RESPUESTA INMUNE Y EN LOS MECANISMOS DE EVASI6N ..... | 45     |
| II. HIP6TESIS .....  | 47     |
| III. OBJETIVO .....  | 47     |
| IV. MATERIAL Y M6TODOS .....   | 48     |
| 1.MODELO EXPERIMENTAL .....  | 48     |
| 2.PURIFICACI6N DE LA GLUTATI6N PEROXIDASA (GSH-Px) .....                                 | 49     |
| 2.1.Obtenci6n del extracto total .....   | 49     |
| 2.2.Cromatograf6a de intercambio cati6nico ....  | 50     |
| 2.3.Ensayo enzim6tico de la glutati6n peroxidasa .....                                   | 51     |
| 2.4.Determinaci6n y cuantificaci6n de prote6nas .....                                    | 52     |
| 2.5.Electroforesis en geles de poliacrilamida .....                                      | 53     |

|  | Página |
|--|--------|
| 2.6.Obtención de anticuerpos anti-glutación<br>peroxidasa .....  | 54     |
| 2.7.Análisis de la reacción cruzada entre<br>GSH-Px comercial y cisticercos de <u>T.</u><br><u>crassiceps</u> .....  | 55     |
| 2.8.Electroelusión .....   | 57     |
| 3.REACCIÓN DEL SUERO Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO<br>EN ENFERMOS CON NEUROCISTICERCOSIS EN PRESENCIA<br>DE GSH-Px DE LARVAS DE <u>T. crassiceps</u> CEPA ORF .... | 58     |
| V. RESULTADOS .....  | 60     |
| 1.PURIFICACIÓN DE LA GLUTACIÓN PEROXIDASA .....  | 60     |
| 2.REACCIÓN DEL SUERO Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO<br>EN ENFERMOS CON NEUROCISTICERCOSIS EN PRESENCIA<br>DE GSH-Px DE LARVAS DE <u>T. crassiceps</u> CEPA ORF .... | 64     |
| VI. DISCUSIÓN .....  | 75     |
| VII. CONCLUSIONES .....  | 82     |
| VIII.BIBLIOGRAFÍA .....  | 83     |
| IX. APÉNDICE .....   | 90     |
| X. GLOSARIO .....  | 106    |

## I. INTRODUCCIÓN.

### 1. VISIÓN PANORAMICA DE LA CISTICERCOSIS/TENIASIS.

La cisticercosis humana es causada por la presencia de la larva de Taenia solium (Linnaeus, 1758) en el sistema nervioso central (SNC), el ojo, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo (Flisser, 1986). El ciclo de vida se inicia cuando el hombre aloja al adulto en el intestino delgado y el parásito desprende parte del mismo (proglótidos grávidos con huevos) y salen al exterior junto con las heces. Los cerdos y el hombre ingiere los huevos, y éstos rompen sus cubiertas liberando a las oncosferas, que penetran a través de la pared intestinal hacia los vasos sanguíneos o linfáticos y son llevadas a diversos a organos, donde se instalan transformándose en cisticercos. Cuando el hombre come carne de cerdo cruda o mal cocida con cisticercos, las membranas del mismo son digeridas y el cisticercos se instala en el intestino por medio del escólex, alcanzando su estado adulto en 6 ó 7 meses (Lamothe, 1983) (figura 1). El hombre es hospedero intermediario accidental de T. solium, ya que no contribuye en la transmisión del metacéstodo en el ciclo de vida; sin embargo es el único hospedero definitivo del parásito en estado adulto (Flisser, 1986).

El binomio de la teniasis/cisticercosis prevalece en sitios donde existen malas condiciones de vivienda e higiene, fecalismo al aire libre y otras condiciones ambientales como la contaminación fecal de agua y de alimentos, el uso de

**CICLO DE VIDA**  
**Taenia solium**

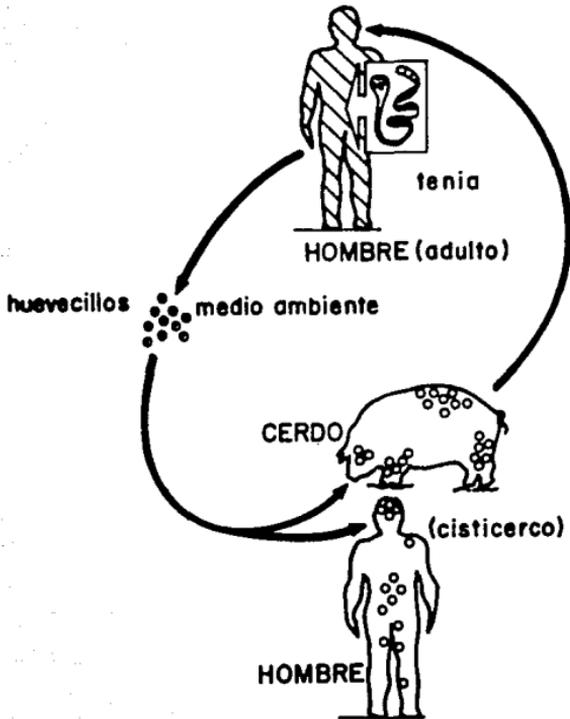


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (tomado de Sciutto, 1990).

aguas negras no tratadas para regar hortalizas, así como, condiciones socio-económicas que favorecen la infección (Lawson y Gemmell, 1983).

En países en vías de desarrollo esta parasitosis se considera como un problema de salud pública debido a su alta frecuencia y porque en ocasiones llega a ser una enfermedad grave (Flisser, 1986). Esta parasitosis se encuentra en Africa, Asia y Latinoamérica (Woodhouse y col. 1982; Schenone y col. 1982; Mahajan, 1982). México y Brasil son los países más afectados del Continente Americano (Sarti, 1989). La frecuencia de neurocisticercosis en México es alta comparada con la registrada para otros países de Latinoamérica en hospitales de Neurología y Neurocirugía así como en estudios anatomo-patológicos de hospitales generales (Schenone, 1973). En México los estados en que fue más alta la frecuencia de neurocisticercosis en los años de 1983 a 1985 fueron Guerrero (24.4 ‰), Michoacán (12.7 ‰), Estado de México (12.0 ‰), San Luis Potosí (7.8 ‰) y Puebla (7.1 ‰). En lo que se refiere a la teniasis en México, la prevalencia varió de 0.5 ‰ al 6.0 ‰ durante los últimos cinco años; además, la alta prevalencia de cisticercosis que afecta al hombre concuerda con las notificaciones para teniasis humana y cisticercosis porcina, como se observa en Morelos (11.4 ‰), Distrito Federal (8.7 ‰), Guanajuato (7.8 ‰) y Michoacán (7.1 ‰) (Sarti, 1989). Por otro parte, esta enfermedad porcina afecta la producción, ya que en 1981 las pérdidas de carne de puerco por decomiso de carne infectada sumó más de 906 millones de pesos (Acevedo, 1982).

La historia natural de la cisticercosis humana es variable: los parásitos alojados en el músculo esquelético y en el tejido subcutáneo ocasionan en general un daño mínimo; la enfermedad se manifiesta principalmente cuando los cisticercos se encuentran en el ojo y en el SNC. La neurocisticercosis también es variable pudiendo ser: asintomática, un padecimiento crónico cuando el parásito bloquea la circulación del líquido cefalorraquídeo ocasionando hipertensión endocraneal e hidrocefalia, o cuando irrita al tejido nervioso causa crisis convulsivas; aracnoiditis basal o una enfermedad fatal aguda (Flisser, 1986).

Todos los autores coinciden en la dificultad para establecer el diagnóstico de la cisticercosis debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas. La neurocisticercosis humana es una parasitosis que clínicamente puede confundirse con otras enfermedades del SNC, razón por la que se han realizado una gran variedad de técnicas inmunológicas para su diagnóstico; sin embargo, hasta hace poco ninguna de ellas había logrado detectar el 100 % de los casos, además se obtienen resultados de falsos positivos en proporciones variables. Tsang (1989) empleó la electroinmunotransferencia (EIT) en la que usó glicoproteínas de cisticercos de T. solium como antígeno para diagnosticar la cisticercosis, logrando determinar que EIT tiene una sensibilidad del 98 % y de especificidad el 100 % como prueba de diagnóstico. Además, Feldman y col. (1990) realizaron una comparación del ensayo inmunoenzimático (ELISA) y EIT con dos

tipos de muestras, suero y saliva, también para el diagnóstico de la neurocisticercosis; en este trabajo se usó como antígeno para ELISA extracto total de cisticercos de T. solium y para EIT glicoproteínas del mismo parásito. Con estos ensayos encontró que la saliva es más sensible que el suero en ELISA (82.1 % y 74.1 % respectivamente); y en EIT el resultado fué inverso, 100 % para el suero y 70.4 % para la saliva. Actualmente en el Instituto de Investigaciones Biomédicas se emplea el ELISA para el diagnóstico de la neurocisticercosis, método que se consideró menos costoso y con buena sensibilidad. En los resultados de Plancarte y col. (1989) se detectó el 85 % de los casos cuando se empleó suero como muestra, el 95 % con el uso de líquido cefalorraquídeo (LCR) y el 100 % si se utilizaban ambas muestras de cada individuo y si buscaban anticuerpos de las clases IgG e IgA.

A pesar de que en muchos individuos existen anticuerpos específicos circulantes contra el parásito, se ha observado que el cisticerco logra sobrevivir por periodos muy prolongados durante varios años pasando casi desapercibidos probablemente porque ejercen diversos mecanismos de evasión inmune (Correa y col., 1989). Los estudios tanto de los mecanismos de evasión inmune como en general de la relación hospedero - parásito se facilitan con el empleo de modelos experimentales entre los que están los de T. solium y T. crassiceps.

2. CLASIFICACIÓN DE Taenia solium Y Taenia crassiceps (Cheng, 1976).

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: Taenia

Especie: Taenia solium (Linnaeus, 1758)

Taenia crassiceps (Zeder 1800,  
Rudolphi, 1810)

3. MODELOS EXPERIMENTALES DE Taenia solium Y OTROS TENIDOS.

El estudio de la relación hospedero - parásito ha demostrado ser de gran utilidad, no sólo para ayudar al diagnóstico de la enfermedad, sino también para determinar los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, las partes del sistema inmune que confieren inmunidad y los mecanismos responsables de éstos, además de las acciones que emplean los parásitos para evadir al sistema inmune. Esta información permite en muchos casos tomar medidas de control que alteren específicamente el equilibrio de la parasitosis (Correa y col., 1989). Se ha buscado el modelo experimental más adecuado para el estudio de la cisticercosis.

Existen muchas estrategias para abordar el estudio experimental de la cisticercosis, las que varían en las fases de infección que reproducen y el tipo de información que generan. Entre ellas están las técnicas de cultivos de parásitos in vitro que permiten estudiar efectos de intervenciones experimentales directamente sobre el parásito, pero aíslan a los cisticercos de su nicho ecológico. Por otra parte, las estrategias in vivo adolecen de la falta de

detalle molecular, dada la complejidad de las redes interactuantes de un organismo, el significado de estos experimentos parecería más relevante pero no siempre es así (Sciutto, 1990).

En lo que se refiere a la instalación de la T. solium, ya sea larva o adulto, en animales de laboratorio, los resultados más alentadores distan aún de ser apropiados para reproducir el desarrollo completo del parásito, de acuerdo a las condiciones naturales de transmisión (Sciutto, 1990).

Entre los modelos experimentales de T. solium se puede mencionar el de la instalación del parásito adulto en crisetos (Mesocrisetos auratus) inmunosuprimidos. Los primeros intentos con éxito fueron los de Verster (1971, 1974) en crisetos dorados previamente inmunosuprimidos químicamente o por irradiación por medio de la ingestión de cisticercos de T. solium. Después de 10 días de infección se recuperan del intestino delgado del criseto tenias con proglotidos estériles. Este modelo permite estudiar la fase crítica en la diferenciación del parásito, como es la transformación del cisticerco en adulto aunque las reglas que rigen esta relación son probablemente diferentes a la natural.

Un modelo para establecer a T. solium en estado larvario, fue propuesto por Molinari y col. (1988). Este modelo consiste en infectar ratones (Mus musculus) con oncosferas obtenidas a partir de huevos de T. solium, procedentes de tenias recuperadas de pacientes tratados con niclosamida. Los ratones fueron infectados por vía endovenosa

con 736 oncosferas por ratón y al mes fueron sacrificados. La carga parasitaria se cuantificó macroscópicamente por recuento de larvas implantadas en los distintos tejidos; la implantación ocurrió prácticamente en los pulmones en un promedio de seis larvas por ratón. Si bien las larvas no alcanzaron a desarrollarse completamente, como se observa en su hospedero intermediario natural, el 100 % de los ratones infectados presentaron en promedio la implantación de seis larvas por ratón y esta implantación disminuyó por inmunización previa del hospedero con antígenos del parásito. El empleo de este modelo se limita a la disponibilidad de oncosferas de T. solium, lo que implica primero obtener una tenia adulta y gravida, ya que en general es muy difícil localizar a un portador del gusano; otro punto es que la enfermedad se da en los pulmones; además, su utilización es de alto riesgo, pero sin duda se pueden buscar condiciones que optimicen el manejo de estos parásitos.

Es importante mencionar para este trabajo el modelo experimental de Taenia taeniaeformis, ya que a partir de de los trabajos del Leid (en prensa) surgió esta tesis. T. taeniaeformis es un céstodo que en estado adulto parásita al gato y como metacéstodo se aloja en ratas. Cuando el hospedero intermediario (rata) esta infectado con el cisticerco de T. taeniaeformis se da la inmunidad concomitante, ya que si este hospedero es reinfectado por huevos de T. taeniaeformis la presencia previa de los cisticercos origina resistencia a la reinfección, por lo que el parásito puede sobrevivir en el hígado de este animal.

Esto nos lleva a pensar que existen mecanismos que permite que estos parásitos evadan la respuesta inmune del hospedero (Leid, 1977; Musoke y col., 1978).

Suquet y col. (1984) purificaron de los metacéstodos de estos parásitos un potente inhibidor de tripsina y quimiotripsina, llamado "taeniaestatina" que es una proteinasa que bloquea la estimulación de los linfocitos por interleucina-1 e inhibe la producción de interleucina-2 (Leid y col., 1986). También se ha observado que este parásito elabora enzimas capaces de inactivar moléculas citotóxicas del hospedero; estas moléculas las producen los linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y células cebadas. En una serie de investigaciones de este metacéstodo se determinó la existencia de enzimas que inactivan metabolitos intermediarios del oxígeno y peróxidos; como ejemplo tenemos el trabajo de Leid y Suquet (1986) quienes identificaron y purificaron a la superóxido dismutasa (SOD).

Otra enzima que ha sido identificada, purificada y parcialmente caracterizada en la larva de *T. taeniaeformis* es la glutatión peroxidasa, responsable de la inactivación del peróxido de hidrógeno y se propone que sea otro medio por el que este parásito evade los mecanismos de defensa del hospedero (Leid, en prensa).

Un modelo experimental es el de *Taenia crassiceps* que es un parásito natural del ratón. Esta cisticercosis murina presenta características atractivas para ser considerada como un modelo de trabajo, ya que *T. crassiceps* presenta similitud antigénica con *T. solium* (Larralde y col., 1989; 1989; 1990;

en prensa), además no es necesario reproducir todo el ciclo de vida pues los cisticercos tienen la capacidad de reproducirse por gemación en el peritoneo de los ratones, y esto sucede por pases intraperitoneales entre ratones inyectándoles cisticercos por medio de una jeringa.

#### 4. Taenia crassiceps COMO MODELO EXPERIMENTAL DE CISTICERCOISIS.

Un ratón (Mus musculus) sano infectado intraperitonealmente con escasos cisticercos de T. crassiceps puede desarrollar al poco tiempo una gran cantidad de parásitos en esta cavidad. Esto se observó al hacer varias series de pases intraperitoneales de ratones a ratones, se comenzó con 15 cisticercos progenitores de T. crassiceps cepa ORF (Ontario Research Foundation) por roedor en el primer pase intraperitoneal. En general la carga parasitaria que se registró fue de 67 parásitos cada 49-51 días (Freeman, 1962). La reproducción asexual por gemación múltiple es una característica muy atractiva para el modelo experimental del metacéstodo de T. crassiceps, ya que permite infectar intraperitonealmente a ratones con unos cuantos parásitos y recuperar cientos de cisticercos en unas cuantas semanas (Freeman, 1962). Además, los cisticercos son fácilmente cuantificables macroscópicamente por conteo individual de los mismos o por medición del volumen que ocupan. Estas variables presentan un alto índice de correlación, y pueden ser utilizadas indistintamente cuando se trata de medir altas cargas parasitarias (Sciutto, 1990). Esta forma de división

permite mantener tanto in vivo (Freeman, 1962) como in vitro (Taylor, 1963; Siebert y Good, 1979) a los cisticercos. In vivo, los cisticercos crecen y se multiplican óptimamente en la cavidad peritoneal de los ratones, lo que permite un fácil acceso experimental a la relación hospedero - parásito. In vitro, su crecimiento es más lento, pero pueden mantenerse durante un par de meses en los medios de cultivo convencionales (Sciutto, 1990). Es también importante destacar que la estructura macroscópica de T. crassiceps y T. solium es muy parecida tanto de los cisticercos como de los adultos, además su ciclo de vida es indirecto, es decir, requieren de un hospedero intermediario para el metacéstodo, roedores o topos en el caso de T. crassiceps (Freeman, 1962) y ganado porcino para T. solium, así como un hospedero definitivo para el estado adulto del parásito, como el zorro rojo, lobo y coyote de manera natural, así como por infección experimental al perro en T. crassiceps y el hombre para T. solium (Figuras 1 y 2).

##### 5. MORFOLOGIA DE LOS CISTICERCOS DE Taenia solium Y Taenia crassiceps.

El cisticercos de T. solium fue descrito por primera ocasión por Aristóteles en su libro titulado "Historia Natural". Este fue identificado como un parásito por Redi y Malpighi; en 1550 Paranoli fue el primero en describirlo en un cerebro humano, pero no fue sino hasta 1855 que Kuckenmeister y Leuckart describieron el ciclo de vida de T. solium (Nieto, 1982). Laenac fue quien propuso el nombre de

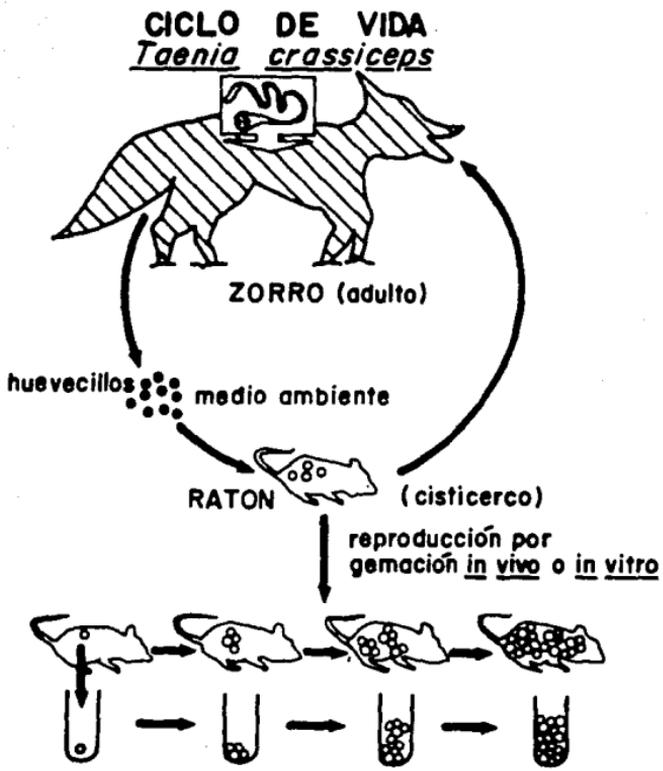


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps* (tomado de Sciutto, 1990).

cisticerco; y Rudolphi le asignó el nombre de Cisticercus cellulosea pero como es la larva y en estado adulto es T. solium actualmente se le conoce como cisticerco celulosa (CC) a la larva de T. solium por su afinidad al tejido conectivo; en 1860 Virchow describió otro tipo de cisticerco, el racemoso (CR) (Rabiela y col., 1989). Se ha encontrado otra variante morfológica del cisticerco en algunos casos de neurocisticercosis humana, su apariencia sugiere que podría ser un estado del cisticerco de forma intermedia (CFI) en la transformación de forma celulosa a racemosa. Estudios de 10 años (1974 - 1984) sobre la morfología del cisticerco demuestran que el CFI y el CR son larvas de T. solium (Rabiela y col., 1985).

El cisticerco celuloso es una pequeña vesícula (0.5 - 1.5 cm) redonda u oval con una pared vesicular translúcida llena de líquido; en observaciones a nivel de microscopio electrónico de barrido (MEB) se determinó que la superficie vesicular presenta una apariencia rugosa dada por las prominencias recubiertas de microvellosidades y un poro por donde evagina el escólex (Rabiela, y col., 1989). La superficie que presenta el cisticerco a su hospedero es un tegumento citoplásmico, sincitial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. A través de la vesícula se puede observar un pequeño gránulo excéntrico que es un escólex invaginado; igual que la tenia adulta, el escólex tiene cuatro ventosas y un rostelo con dos hileras de ganchos uniformes. El número de ganchos puede variar entre 22 y 32. Sus características morfológicas son las mismas en el cerebro

y en el músculo, tanto en el hombre como en los cerdos y frecuentemente esta separado del tejido cerebral por una delgada cápsula de tejido colágeno entre la que puede permanecer vivo, o llegar a calcificarse (Rabiela y col., 1982; Aluja y col., 1987; Aluja y Vargas, 1988).

El cisticerco racemoso es de color blanco amarillento, y sus dimensiones llegan a ser hasta de 10 - 20 cm, tiene gran tamaño por el desarrollo de su membrana con una estructura semejante a la del CC a nivel de MEB. Algunos cisticercos racemosos llegan a presentar en una parte de su superficie pliegues orientados paralelamente, similares en disposición y forma a los descritos en el cuello del gusano de T. solium, esta morfología no ha sido descrita en la membrana del CC en observaciones con el MEB. Los cisticercos racemosos son como un conjunto de vesículas no individualizadas semejantes a un ramillete de uvas, o bien, pueden semejar una gran vesícula con escasas lobulaciones o ser redondeados (Rabiela y col., 1989, 1985). Este tipo de metacéstodo llega a tener hasta 60 ml de fluido vesicular (Rabiela y col., 1985). La característica más importante de ésta forma parasitaria es que macroscópicamente el escólex no ha sido visto; sólo se ha detallando en estudios histológicos, pueden revelarse algunos vestigios del escólex, como ganchos que miden 3 a 4 m, formando en conjunto la corona de ganchos (Rabiela y col. 1985 y 1989).

El cisticerco de forma intermedia es grande y parece segmentado por una o varias gemas, lo que quizás represente el estado inicial en la transformación del cisticerco

celuloso a la forma más activa de crecimiento que es el cisticerco racemoso. Esta forma larvaria muestra inicios de un gran desarrollo de la membrana vesicular, como en el CR, sus dimensiones varían entre 3.5 y 8 cm; además la superficie tegumentaria de la membrana muestra prominencias características, recubiertas de vellosidades, presentes en el CC. La principal característica del CFI es que el escólex es claramente visible a través de la vesícula y está total o parcialmente evaginado (Rabiela y col., 1985 y 1989).

Es interesante notar que las formas racemosas e intermedias se localizan únicamente en la cavidad ventricular en la cisterna basal meníngea, lo que sugiere la necesidad de espacio para crecer; no se conoce el mecanismo de transformación de CC a CR (Rabiela y col., 1989).

El cisticerco de T. crassiceps fue descrito por Rudolphi en 1819, infecta naturalmente a pequeños roedores y al topo. La larva por infección natural se desarrolla generalmente en forma subcutánea o en la cavidad pleural y es menos frecuente en la cavidad abdominal. El metacéstodo es una vesícula casi esférica de 5x3 mm con una membrana translúcida blanquecina llena de un fluido vesicular, presenta un escólex semejante al de T. solium, con cuatro ventosas y dos coronas de ganchos rostellares que varían en número de 32 a 36, sólo que no son uniformes, algunos son grandes de 155 a 187  $\mu$  y otros pequeños de 107 a 142  $\mu$ , esta particularidad es característica de la especie (Freeman, 1962).

El cisticerco inicia su reproducción asexual por gemación múltiple aproximadamente en la tercera semana de

infección experimental; algunos presentan gemas endógenas y/o exógenas en el polo opuesto al escólex. Las gemas exógenas son las más comunes y llegan a estar unidas al cisticerco hasta 30 ó 40 gemas, su progenitor es alargado y diferenciado; cuando las gemas alcanzan aproximadamente 2 mm se desprenden y forman nuevos individuos, la mayoría de éstos presentan una muesca, región que dá origen al escólex y al poro de evaginación, ésta no se distingue en el metacéstodo en desarrollo temprano, originado directamente del huevo; algunos de los metacéstodos no desarrollan por completo el escólex o lo hacen cuando están gemando. Las pocas gemas que quedan unidas al cisticerco progenitor sí lo desarrollan. Los cisticercos con escólex invaginado varían de 2x1 mm a 6x4 mm (Freeman, 1962).

Debido a la variedad de estados del cisticerco de T. crassiceps, Freeman (1962) propone llamar "gemas" a todos aquellos metacéstodos con muesca o con un escólex pequeño, o no diferenciado sobre el poro del mismo y que esten unidas al cisticerco progenitor; "cisticerco" a las larvas con ventosas y rostelo desarrollado pero que carezca de gemas unidas a él; "progenitor" a los cisticercos con gemas unidas a él; y "progenitores de larvas gemantes" a la fuente original de gemas, ya sea el cisticerco originado por un huevo o los que fueron inyectados al hospedero intermediario (Figura 3).

Existen varias cepas de cisticercos de T. crassiceps; las que se emplearon en este trabajo fueron la ORF (Freeman, 1962) y la HYG (Sally y col., 1976). La cepa ORF fue la primera que se aisló y se mantuvo en el laboratorio desde

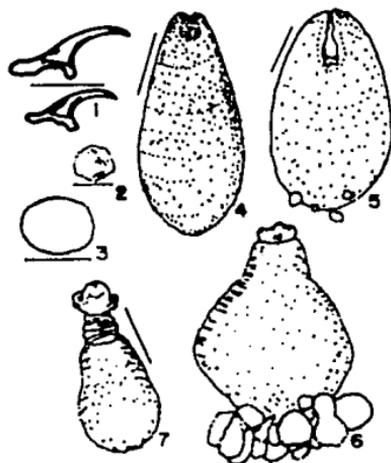


Figura 3. Metacéstodo de *T. crassiceps*. (1) Ganchos rostelares; (2) embrión; (3) larva joven; (4) larva con muesca, en donde se observa el principio de la formación del escólex; (5) larva joven con gemas; (6) progenitor con gemas; (7) cisticerco con escólex bien diferenciado (Freeman, 1962).

1952 (Freeman, 1962). El cisticerco se caracteriza por ser una vesícula llena de líquido sin escólex o con reminiscencias del mismo, la que perdió la capacidad de completar su ciclo sexual, sólo se reproduce asexualmente por gemación. La cepa ORF tiene una capacidad reproductiva más alta que HYG, posiblemente resultado de una mutación genética (Sciutto, 1990). La cepa HYG (Sally y col., 1976) es la que mantiene sus características estructurales normales, con escólex y doble corona rostral con cuatro ventosas, y la capacidad de completar el ciclo sexuado, también se puede reproducir asexualmente (Sally y col, 1976; Sciutto, 1990). Ambas cepas se pueden mantener en el laboratorio por medio de pases intraperitoneales de ratón a ratón.

## 6. SIMILITUD ANTIGÉNICA ENTRE Taenia solium Y Taenia crassiceps.

El cisticerco de Taenia crassiceps comparte gran cantidad de antígenos con el de Taenia solium; esto se ha observado claramente en la reacción cruzada antigénica de larvas de estas especies (Larralde y col., 1989, 1989, 1990; en prensa).

Por medio de la técnica de la EIT se detectaron reacciones cruzadas de estos metacéstodos, mediante el uso de las proteínas del líquido vesicular de cisticercos de T. crassiceps como antígeno revelado con sueros de pacientes con neurocisticercosis. Las bandas obtenidas de las reacciones cruzadas de anticuerpos anti-cisticerco de los sueros con el líquido vesicular de T. crassiceps son semejantes a las que se presentan en las EIT que emplean como antígeno el extracto total de cisticercos de T. solium revelados con sueros de enfermos (Larralde y col., 1989). Del conjunto de antígenos de T. crassiceps se han identificado aquellos que son reconocidos con alta frecuencia por individuos con cisticercosis (Sciutto, 1990). Esta información también podría ser de utilidad en la selección de antígenos para ser clonados y emplearse con fines diagnósticos (Larralde y col., 1986)

En el ELISA para detectar anticuerpos anti-cisticerco también se determinó que los antígenos de T. crassiceps son tan buenos como los de T. solium; esto se observó en el ELISA en el que emplearon como antígeno al líquido vesicular de cisticercos de T. crassiceps y se revelaron con 96 muestras

de líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes con neurocisticercosis y 96 LCR de otras variedades de enfermedades neurológicas. Los resultados de esta prueba se compararon con los del ELISA que usó LCR<sub>s</sub> como muestras, se determinó que en el que se utilizó extracto total de cisticerco de T. solium se encontró que los antígenos de cisticerco de T. crassiceps dan resultados esencialmente similares a los testigos positivos y negativos para la enfermedad. También se hizo la comparación con los ELISA<sub>s</sub> que usaron LCR y suero, en donde se observó que cuando se empleaba como fuente de antígenos de cisticercos de T. solium se obtiene la concordancia del diagnóstico original, ya sea positivo o negativo, del 96 % en LCR y 100 % en suero. Ahora bien, cuando se usó como antígeno extracto total de cisticercos de T. crassiceps la concordancia fué entre 94-97% en LCR y 100 % en suero. En hemaglutinación con suero, empleando como antígenos tanto extractos totales de los metacéstodos de T. solium como los de T. crassiceps fue del 100 % (Larralde y col., en prensa). En otro trabajo similar a este en la comparación de estos antígenos se determinó que cuando se emplea T. solium la sensibilidad es del 95 % y la especificidad del 96-98 %; y en T. crassiceps la sensibilidad es del 92-97 % y la especificidad es del 96-98 % (Larralde y col., 1990).

Este hallazgo es una alternativa para proporcionar antígenos para inmunodiagnóstico de neurocisticercosis (Larralde, 1989) sin deteriorar la sensibilidad y especificidad en la serología diagnóstica de cisticercosis

con la gran ventaja de contar con una mezcla antigénica de heterogeneidad controlada, ya que la discusión sobre el inmunodiagnóstico de la cisticercosis aún esta vigente, pues existe heterogeneidad en los procedimientos y confusión en los resultados. El uso de T. crassiceps podría favorecer la uniformidad de los antígenos empleados en el diagnóstico disminuyendo las posibles discrepancias (Sciutto, 1990).

El modelo experimental murino para el estudio de la cisticercosis podría ayudar a remediar el problema de la inaccesibilidad de los antígenos para realizar el diagnóstico de esta enfermedad tanto en aplicación clínica como epidemiológica (Larralde y col, en prensa). Actualmente, ya se están empleando los antígenos de T. crassiceps en proyectos epidemiológicos que incluyen tanto la determinación de la cantidad de anticuerpos por hemaglutinación y ELISA (Sciutto, 1990), técnicas probadas anteriormente con antígenos de T. solium (Larralde y col., 1986). Además de que se podría sugerir como un medio de estandarización de reactivos para cisticercosis (Larralde y col., en prensa).

Otro descubrimiento importante que apoya la similitud antigénica de estas especies de parásitos es que la vacunación de ratones con extracto antigénico de cisticercos de T. solium reduce el desarrollo de la carga parasitaria al retar a los roedores con cisticercos de T. crassiceps (Larralde, 1989; Sciutto, 1990). Además este hallazgo también apoya el uso del modelo experimental de T. crassiceps.

Por otro lado el uso de modelos experimentales para valorar y mejorar el inmunodiagnóstico y la inmunoprofilaxis,

se puede emplear la semejanza antigénica para estudiar los mecanismos de evasión de la respuesta inmune entre los que la glutatión peroxidasa parece ser muy importante (Flisser, comunicación personal).

#### 7. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px).

Las reacciones químicas en los sistemas biológicos requieren de catalizadores llamados enzimas, que son proteínas. Las enzimas son altamente específicas y poseen un gran poder catalítico. Las enzimas aumentan las velocidades de reacción al menos  $10^7$  veces, además no alteran los equilibrios de reacción y reducen la energía de activación de las reacciones químicas (Stryer, 1985). La glutatión peroxidasa es un ejemplo de la gamma de enzimas que existen en los seres vivos.

La presencia de la GSH-Px en eritrocitos de mamíferos fue establecida por primera vez por Mills en 1957 y confirmado por subsecuentes investigadores. La presencia de la GSH-Px se ha demostrado y purificado sólo en animales, pero no se ha encontrado en plantas (Mills, 1959; Tappel, 1978; Wendel, 1981). La glutatión peroxidasa en las células del hígado y pulmón de ratón, y eritrocitos de bovino, ovino y humano presenta propiedades muy similares (Tappel, 1978). En ratas los niveles de la enzima son altos en el hígado y bajos en los eritrocitos, corazón, pulmón y riñón. En los hepatocitos alrededor del 70 % de la actividad total está en el citoplasma y el 30 % restante en la matriz mitocondrial

(Tappel, 1978; Wendel, 1981). La GSH-Px actúa con el glutatión para la protección de las células de los efectos destructores del peróxido de hidrógeno (Huberman, 1988).

#### 7.1. Clasificación internacional.

De acuerdo a la nomenclatura internacional, la comisión de enzimas (EC) designó a la glutatión peroxidasa con el nombre sistemático de "Glutatión: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa" y el número "EC 1.11.1.9.". La primera cifra (1.) indica que pertenece a la clase de las oxidoreductasas, estas enzimas catalizan oxidoreducciones, donde el sustrato oxidado se refiere como un donador de hidrógeno o electrones. La segunda cifra (1.11.) se refiere a la subclase que actúa con  $H_2O_2$ . La tercera cifra (1.11.1.) representa la sub-subclase que incluye únicamente a las peroxidasas. La cuarta cifra (1.11.1.9.) es el número progresivo de la enzima en la sub-subclase (Bielka y col., 1979).

#### 7.2. Estructura de la proteína.

La glutatión peroxidasa tiene un peso molecular de  $84,000 \pm 5,000$  daltones (D), esta enzima es un tetrámero con cuatro subunidades o monómeros esféricos idénticos con el peso molecular de  $20,000 \pm 1,000$  daltones. Cada subunidad es de 182 aminoácidos. La enzima esta estructurada por un centro de dos cadenas paralelas y dos antiparalelas plegadas circundadas por cuatro  $\alpha$ -hélices. Una de las  $\alpha$ -hélices corre antiparalelamente a la cadena  $\beta$ vecina. La enzima tiene un radio de alrededor de  $19 \text{ \AA}$ . El sitio activo de la GSH-Px

contiene al residuo de aminoácido poco frecuente, la seleniocisteína (figura 4), en la que el átomo de azufre de la cisteína se ha sustituido por un átomo de selenio. La seleniocisteína está en la superficie de la subunidad circundada por residuos de aminoácidos aromáticos (sitio activo) (Lehninger, 1987). Esta proteína cuenta con cuatro átomos de selenio como cofactores, razón por la que se le ha llamado selenio-proteína o selenio-dependiente (Barman, 1974; Tappel, 1978; Wendel, 1981). El selenio se encuentra en forma reducida y no está unido al oxígeno. Se piensa que el selenio en la glutatión peroxidasa puede tener una estructura  $RSSeR'$  (Tappel, 1978), donde los grupos R y R' son cadenas laterales de aminoácidos y SSe el selenio (Stryer, 1985).

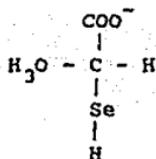


Figura 4. Seleniocisteína, análogo de la cisteína en la que el selenio sustituye al azufre. En el sitio activo de la GSH-Px se halla presente el residuo de la seleniocisteína (Lehninger, 1987).

### 7.3. Estabilidad.

La glutatión peroxidasa de sangre de bovino es relativamente estable en la línea de pH de 7 a 10 a la concentración de proteína alrededor de 1 mg/ml. El pH óptimo de la enzima es de 8 y no muestra actividad significativa a pH 6 (Mills, 1959); Plagia y Valentine, 1967); también es estable con el fosfato de potasio a 2.5 mM y a 1.2 mM ambas concentraciones a pH 7. La liofilización es posible en presencia de manitol-ficol 1%. Alrededor del 30 % de los solventes orgánicos, como metanol, etanol, acetona o dimetil sulfóxido, son tolerados hasta -20°C. En presencia de sulfato de amonio, azida de sodio y cianuro de potasio conserva su actividad, pero el cianuro de potasio la disminuye un 30 %. La GSH-Px en una variación de temperatura de 22.5°C a 37°C presenta el 100 % de actividad; a 45°C la disminuye al 88 %, pero a partir de 50°C a 60°C la actividad se inhibe totalmente (Plagia y Valentine, 1967). La enzima experimenta autooxidación pero puede ser reactivada por incubación con GSH (Wendel, 1981).

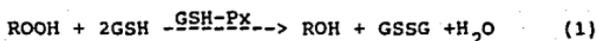
### 7.4 Pureza.

Aunque la enzima de sangre de bovino pura presenta una amplia zona en discontinuidad al ser sometida a electroforesis en el gel de poliacrilamida, a veces se distinguen tres bandas, pero en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) solo se detecta una banda. La enzima con alta actividad con 400 unidades/mg o más fácilmente se cristaliza, por ejemplo al incubar con 1.25mM de fosfato de potasio a pH

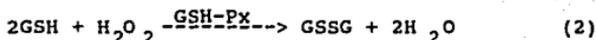
7.0 en un fondo plano se obtienen cristales rómbicos de la enzima. El contenido de selenio de esta proteína es un índice confiable de pureza (Wendel, 1981).

#### 7.5.Reacción enzimática.

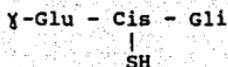
Esta proteína es altamente específica in vitro para el sustrato donador de hidrógenos o electrones, el glutatión (GSH). Sin embargo, acepta una gran variedad de hidroperóxidos (ROOH). La reacción consiste en la desoxificación del peróxido de hidrógeno por la oxidación de glutatión reducido, para la eliminación de peróxidos (Mills, 1959; Plagia y Valentine, 1967; Tappel, 1978; Wendel, 1981):



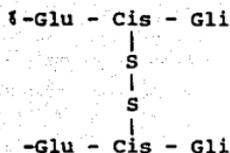
O bien:



El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido que contiene g-glutamil, cistenil y glicina ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ ) con un peso molecular de 307.3 D; el glutatión oxidado (GSSG) está formado por dos tripéptidos iguales al GSH unidos por un enlace disulfuro entre cisteínas ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$ ) con el peso molecular de 612.6 D (Ulrich-Bergmeyer, 1974; Stryer, 1985). Siguiendo la actividad relativa de la enzima con diferentes compuestos sulfhidrúlicos se encontró que el GSH realiza el 100 %; ditiotreititol, 10 %; cisteína y N-acetilcisteína, 6 %; y homocisteína, 5 % (Tappel, 1978).



Glutati3n reducido  
(GSH)



Glutati3n oxidado  
(GSSG)

Figura 5. Glutati3n reducido (GSH) y glutati3n oxidado (GSSG) (Stryer, 1985).

Esta enzima solo puede actuar con hidroper3xidos con estructura general de ROOH y presenta muy poca actividad cuando el sustrato peroxidado es ROOR. Se han probado varios sustratos peroxidados que reaccionan en presencia de la enzima lo que ha permitido determinar la siguiente actividad relativa de estos compuestos: per3xido de hidr3geno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es del 100 %, hidroper3xido de Cumene, 97 %; hidriper3xido de tert-butil, 84 %, hidroper3xido de lauril 77 %, per3xido de ditert-butil 5 % y per3xido de dicumene 5 %.(Barman, 1974; Tappel, 1978). Tambi3n puede actuar con otros per3xidos como el de etil, de 3cido linol3ico y sus 3steres metilados, 17-hidroxiper3xido de alopregnanolon, 17 $\alpha$ -hidroxiper3xido de pregnenolon, 17 $\beta$ -hidroxiper3xido colesterol e hidroxiper3xido de timina, y en la constante peroxidaci3n del DNA (Wendel, 1981).



de  $5.0 \times 10^{-3}$  M es  $K_m = 2.5 \times 10^{-5}$  M. Sin embargo, estudios posteriores han determinado que esta enzima presenta un mecanismo de reacción de ping-pong (Tappel, 1978; Wendel, 1981; Folh , 1984) que es cuando se libera uno o más productos antes de que todos los sustratos se hayan enlazado, por lo que la verdadera constante de Michaelis de esta enzima no se puede dar como la de cualquier reacción en la que los sustratos dependen uno del otro (Wendel, 1981).

No se han encontrado inhibidores específicos para la enzima. Sin embargo, hay ciertas sustancias inhibitorias para esta enzima, 5 mM de plata ( $Ag^+$ ) la inhibe instantánea y completamente. El iodoacetato (Plagia y Valentine, 1967; Wendel, 1981) y cloroacetato reducen irreversiblemente la mitad del selenio de la enzima, sin embargo, con la iodoacetamida no se ve efecto. El fosfato de potasio es reversiblemente inhibitorio (Wendel, 1981).

En la tabla I se resumen las propiedades de la glutatión peroxidasa.

Tabla I. Propiedades de la glutatión peroxidasa de eritrocitos de bovino (Wendel, 1981).

|                                     |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| Peso molecular                      | 84,000 D                         |
| Subunidades                         | 4x21,000                         |
| Punto isoeléctrico                  | 5.6-6.0                          |
| pH óptimo                           | 8                                |
| Temperatura  ptima                  | 22.5.-37.C                       |
| Aminoacidos                         | 4x182                            |
| Grupo protético                     | 4 átomos Se<br>(seleniocisteína) |
|                                     | o                                |
| Radio de los monómeros              | 19A                              |
| Densidad cristalina de la proteína  | 1.32g/cm <sup>3</sup>            |
| Pureza:                             |                                  |
| Gel de poli(acrilamida)             | 3 bandas                         |
| Gel de poli(acrilamida) con SDS     | 1 banda                          |
| Sustratos de la reacción enzimática | GSH y ROOH                       |

### 7.7. Glutación peroxidasa no dependiente del selenio.

Hay dos enzimas en el hígado de ratón con actividad de glutación peroxidasa cuando se usa como sustrato peróxido de Cumene. Una de las GSH-Px requiere como cofactor al selenio (Glutación: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.9) y la otra parece ser independiente del selenio. La actividad de las dos enzimas varía enormemente entre tejidos y animales (Pierce y Tappel, 1978).

El peso molecular de la GSH-Px selenio independiente es de 35,000 D y el de la subunidad es de 17,000 D. La GSH-Px selenio independiente usa como sustratos a hidroperóxidos orgánicos, pero no al peróxido de hidrógeno; la selenio-enzima es menos específica. La reducción de ácidos grasos hidroxiperóxidados es un mecanismo importante de protección in vivo. Esta reducción de hidroperóxidos por GSH-Px selenio-dependiente contribuye como función protectora. La actividad de la GSH-Px selenio-independiente puede proteger a los animales del daño producido por la peroxidación lipídica pero no es una respuesta primaria de este grupo de enzimas la que no se inhibe cuando se incuba con ácido iodoacético 1mM durante 10 minutos; en contraste a la selenio-dependiente que si se inhibe aún cuando se preincuba en glutación que reduce la enzima. Sin embargo, esta enzima se inhibe ante la presencia de KCN. El mecanismo de reacción de esta enzima es secuencial. La  $K_m$  de la glutación es de 0.20 mM y la  $K_m$  del hidroperóxido de cumene es de 0.57 mM. La enzima se inhibe con N-etilaleimida. La inhibición por cianuro de potasio es competitiva con respecto

al glutatión y la constante de inhibición ( $K_i$ ) por cianuro de potasio es de 0.95 mM. (Pierce y Tappel, 1978). La actividad de la glutatión peroxidasa selenio-independiente en hígado de rata puede ser atribuida a la glutatión S-transferasa. La especificidad de los peróxidos aromáticos e hidrofóbicos concuerdan con la especificidad de los substratos hidrofóbicos de la glutatión S-transferasa. El mecanismo de reacción secuencial se parece a las de glutatión S-transferasa en concentraciones de alrededor de 0.1 mM. Además la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 0.2 mM determinada para glutatión en ensayos de glutatión peroxidasa es idéntica a la de la glutatión S-transferasa. El peso molecular de la enzima es similar a esta transferasa y también consiste de dos subunidades. Debido a que esta enzima presenta muchas similitudes a la glutatión S-transferasa se sugirió que la glutatión peroxidasa selenio-independiente y la glutatión S-transferasa son la misma (Pierce y Tappel, 1978).

Se han observado reacciones catalizadas por las glutatión S-transferasas que reaccionan con varios peróxidos orgánicos pero no metabolizan al peróxido de hidrógeno. Estas transferasas son diferentes a la glutatión peroxidasa en estructura y no son dependientes del selenio (Tappel, 1978; Wendel, 1981), sin embargo, algunas de ellas se sobreponen en actividad y función (Flohé y Günzler, 1984).

#### 7.8. Glutación peroxidasa de Taenia taeniaeformis.

La GSH-Px fue purificada y parcialmente caracterizada de la larva de T. taeniaeformis; es la primera GSH-Px purificada de un parásito. Como es la responsable de la inactivación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Leid (en prensa) sugiere que la GSH-Px es uno de los medios por los que el parásito evade a los mecanismos de defensa del hospedero. Cuando se analiza esta enzima en un gel de gradiente de poliacrilamida con SDS en condiciones no reducidas, sólo es evidente una banda de 26,000 D y en condiciones reducidas esta banda es de 24,900 D. Su peso molecular es de 45,000 D en geles de filtración. A un pH 2 se inhibe el 100 % de la actividad enzimática de la GSH-Px, mientras que a pH 3 únicamente el 30%. A un pH de 4 a 9 no disminuye su actividad enzimática pero a un pH de 10 lo hace en un 25 %. Las variaciones de temperatura también fluctúan la actividad enzimática, si la enzima se incubaba durante 30 minutos a 56°C o 3 minutos a 100°C se inhibe completamente, pero si permanece de 1 a 4 horas a 37°C se reduce la actividad biológica entre 22 y 25 %. Además, la enzima no se inactiva en presencia de KCN con variaciones de 50 a 150 mM con 2 a 10 mM de GSH. La GSH-Px de T. taeniaeformis tampoco se inactiva en ácido iodoacético durante 10 minutos a 37°C (Leid, en prensa).

## 8. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.

Los procesos metabólicos de la respiración y de la fosforilación oxidativa son los que proporcionan los metabolitos intermediarios o radicales libres de oxígeno (figura 6). El oxígeno puede ser, a su vez, una molécula tóxica con efectos deletéreos sobre diversos sistemas biológicos; es por esto que el oxígeno y sus derivados desempeñan un papel primordial en las lesiones tisulares y celulares producidas en una gran variedad de procesos patofisiológicos (Huberman, 1988).

### 8.1. Naturaleza de los radicales de oxígeno.

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es fundamentalmente un birradical, ya que tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro (paralelo). Esto impide que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en las que interviene, puesto que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo. Por esta razón, el oxígeno solo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno. Muchas enzimas del tipo de las oxidasas y de las oxigenasas contienen metales de transición en el sitio activo, puesto que son capaces de aceptar y donar electrones únicos (figura 7) (Huberman, 1988).

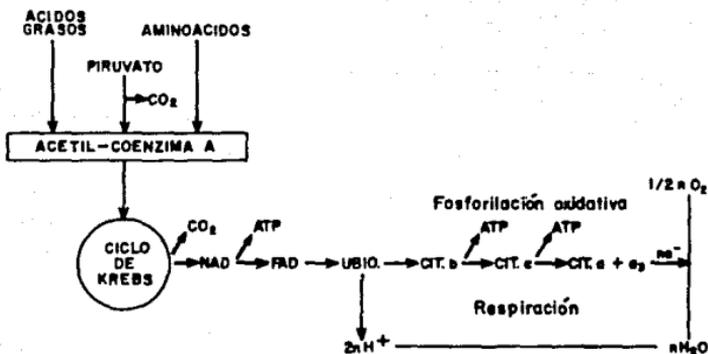


Figura 6. Oxidación de nutrientes. Consumo de oxígeno molecular y liberación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Huberman, 1988).

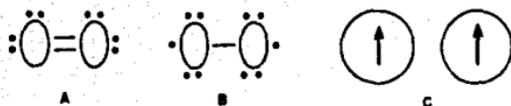
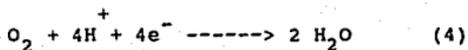


Figura 7. Estructura electrónica del oxígeno molecular ( $O_2$ ), (A) representación convencional. (B) representación real en la que aparece un electrón no apareado por cada átomo de oxígeno (birradical). (C) representación de los vectores magnéticos de los electrones no apareados del oxígeno. Nótese que son paralelos (Huberman, 1988).

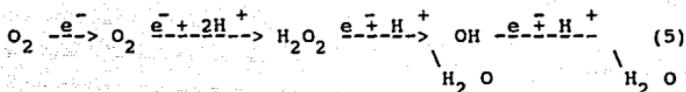


Figura 8. (A) estructura electrónica del radical anión superóxido ( $O_2^-$ ). Nótese que el oxígeno ha sufrido una reducción univalente por captación de un electrón, pero sigue siendo un radical pues tiene un electrón no apareado. (B) peróxido. En la reducción univalente se obtiene peróxido de hidrógeno (reacción 5 página 36) (Huberman, 1988).

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo oxidasa (Citocromo  $a + a_3$ ) de la cadena respiratoria mitocondrial (figura 6), según la siguiente reacción global (Huberman, 1988):



En realidad, y por las razones expuestas anteriormente, esta reducción se hace en 4 pasos univalentes (Huberman 1988):



Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y por lo general no se difunden al resto de la célula (Huberman, 1988).

### 8.1.1. Radicales derivados del oxígeno.

Cuando la molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, el anión superóxido. Este se representa con el signo negativo de la carga aniónica y un punto que indica que se trata de un radical (o sea, la presencia de un electrón no apareado):  $O_2^{\cdot -}$  (figura 8A) (Huberman, 1988).

El segundo producto es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de la reacción (5), no es realmente un radical (figura 8B)

(Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988) porque todos los electrones de su orbita externa estan apareados, pero su importancia radica en que, por captación de un electrón y un protón, puede dar lugar a la formación de una molécula de agua y a un radical hidroxilo  $\text{OH}^-$ , este último es el más reactivo de los derivados del oxígeno (Figura 9) (Huberman, 1988).

Por otro lado el oxígeno molecular puede absorber energía (22 kcal/mol) y convertirse en una molécula sumamente reactiva, el "singulete" de oxígeno, llamado así porque su espectro da una sola señal, no es realmente un radical (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988), ya que los dos electrones no apareados se han unido, formando un par antiparalelo y se representa graficamente como  $^1\text{O}_2$  (figura 10) (Huberman, 1988).

Por absorción de otras 15 kcal/mol, este "singulete" puede convertirse en otro, representado gráficamente como  $^1\text{O}_2^{..}$ , que tampoco es un verdadero radical, puesto que uno de sus electrones ha invertido su giro y ahora es un par antiparalelo, pero sumamente inestable pues se convierte tan rápido como se forma en el "singulete"  $^1\text{O}_2$  (figura 11) (Huberman, 1988).

En la figura 12 se resumen las diferentes modificaciones que puede sufrir el oxígeno molecular para dar especies moleculares que son verdaderos radicales o que, en el curso de su metabolismo, dan origen a radicales.



Figura 9. Radical hidroxilo. En la reducción univalente (reacción 5 página 36) se produce  $H_2O$  y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) el más reactivo de los radicales derivados del oxígeno (Huberman, 1988).



Figura 10. El singlete  $^1O_2^\cdot$ , llamado así porque su espectro da una sola señal, no es realmente un radical, ya que los dos electrones no apareados se han unido, formando un par antiparalelo (Huberman, 1988).



Figura 11. El singlete de  $^1O_2^{\cdot\cdot}$  tampoco es un verdadero radical, puesto que uno de sus electrones ha invertido su giro y ahora este par antiparalelo, pero sumamente inestable, se convierte casi tan rápido como se forma en el "singlete"  $^1O_2^\cdot$  (Huberman, 1988).

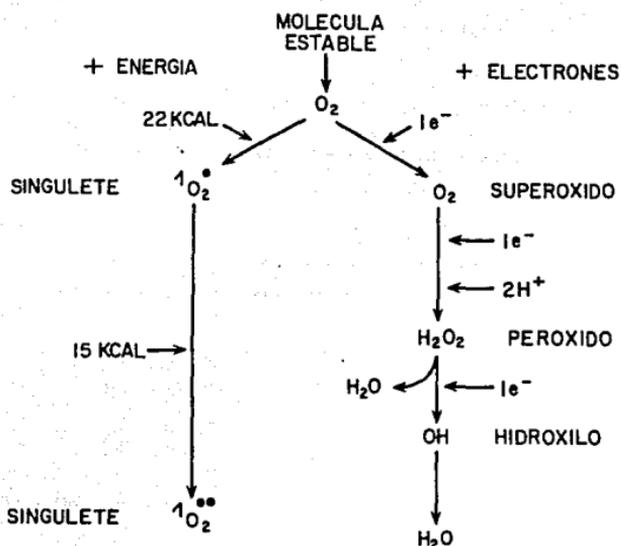


Figura 12. Resumen de los cambios que pueden sufrir el oxígeno molecular estable por reducciones univalentes sucesivas o por captación de energía (Huberman, 1988).

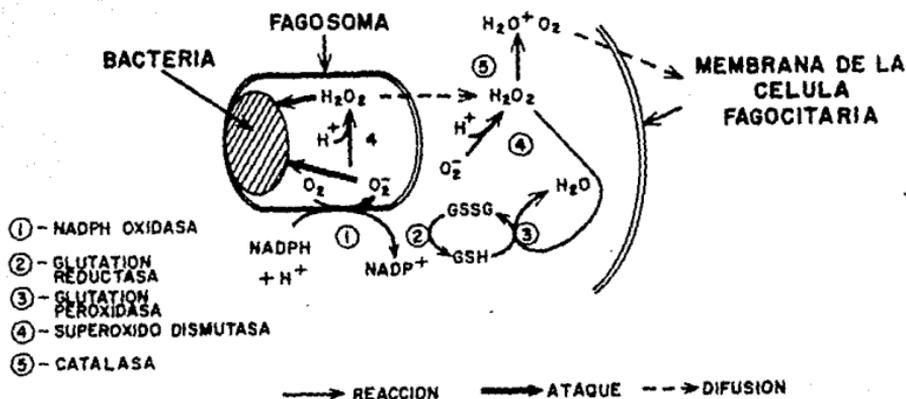
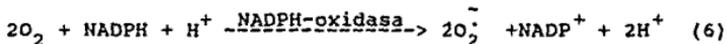


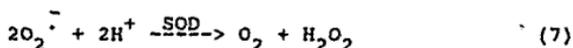
Figura 13. Formación de radicales de oxígeno bactericidas en el interior de una célula fagocitaria y mecanismos de protección citoplásmicos. Nótese que la membrana de fagosoma es un fragmento de la membrana celular (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988).

### 8.1.2. Producción biológica de radicales.

A) Anión superóxido. Una pequeña proporción del  $O_2$  utilizado en la respiración mitocondrial escapa como superóxido (1-2 % del  $O_2$  total consumido). Quizás la fuente más importante de producción de radicales superóxido in vivo sea la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocitarias (macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos) activadas por contacto con partículas extrañas. En la membrana citoplasmática de estas células fagocitarias se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH-oxidasa, que cataliza la reacción 1 de la fig. 13 (página 40) con la siguiente estequiometría (Fridovich, 1987; Huberman, 1988):



La presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el citoplasma produce la siguiente reacción:

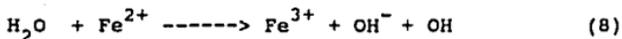


Los fagocitos contienen también una mieloperoxidasa, que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para transformar los halogenuros en hipohalogenuros, que reaccionan con el peróxido de hidrógeno formando halogenuros, agua y el "singulete"  $^1O_2$ .

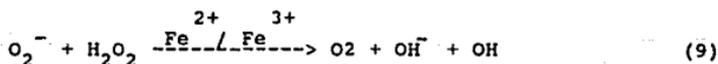
Como se puede visualizar en las reacciones, el aumento del consumo de oxígeno en la descarga respiratoria de los fagocitos está destinado a producir una gran cantidad de

metabolitos de oxígeno, como el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el "singulete" de oxígeno, que tienen poder bactericida o tóxico, aún cuando no todos sean propiamente radicales (Huberman, 1988).

B) Radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) formado en la reacción (7), a pesar de no ser en sí un radical, tiene una importancia vital, ya que en presencia de los metales de transición  $Cu^+$  o  $Fe^{2+}$ , da lugar a la reacción de Fenton (Huberman, 1988):



con la producción del radical hidroxilo. Por otro lado, el radical superóxido alimenta la producción de  $Fe^{2+}$ . Es decir, la dismutación del radical anión superóxido ( $O_2^-$ ) produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual, a su vez, se descompone en el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) con intervención del  $Fe^{2+}$  y la regeneración de este último por medio del radical anión superóxido, esto constituye el ciclo de Heber-Weiss (Huberman, 1988):



La coexistencia del radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro, es peligrosísima, ya que el radical hidroxilo (OH) formado es un oxidante extremadamente

reactivo que interactúa con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos, a velocidades sólo limitadas por su difusión.

C) "Singulete" de oxígeno: Como el "singulete" de oxígeno  $^1O_2$  no tiene electrones apareados, no es realmente un radical de  $O_2$  (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988), pero es incluido aquí por su gran reactividad e intervención en muchas reacciones en las que participa el oxígeno molecular. El "singulete" de oxígeno tiene una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo los lípidos de las membranas. Además tiende a formarse en grandes cantidades en los tejidos y órganos sometidos a las radiaciones ionizantes terapéuticas.

## 8.2. Defensas biológicas contra los radicales.

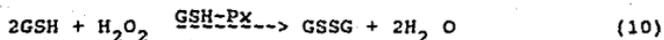
Una de las exigencias de la aerobiosis es contar con defensas contra los radicales de oxígeno que tienda a impedir su formación o que los neutralice una vez formados. Estas defensas tienen cinco niveles (Huberman, 1988):

El primer nivel consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno, mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva, sin liberar los intermediarios. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo oxidasa, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano (Huberman, 1988).

El segundo nivel lo constituye la presencia de enzimas especializadas, las superóxido-dismutasas, que son

metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, reacción 7 (página 41) (Fridovich, 1987; Huberman, 1988).

El tercer nivel de defensa esta constituido por un grupo de enzimas especializadas tales como la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas, o las peroxidases (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988) que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la glutatión peroxidasa (enzima citoplasmica que contiene Se) es la más importante, ya que cataliza la siguiente reacción (Huberman, 1988):



Por otro lado, la glutatión-reductasa convierte al glutatión oxidado (GSSH) en glutatión reducido (GSH) con intervención del NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH (Stryer, 1985; Huberman, 1988).

En el cuarto nivel, el radical hidroxilo producido en el ciclo de Heber-Weiss puede ser neutralizado por la vitamina E o a-tocoferol, que es un antioxidante que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente eficaz (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988).

Una vez producido el daño molecular, el quinto nivel de defensa lo constituye la reparación. La mayor parte de la moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo

que son periódicamente reemplazadas. En el caso del material genético, los radicales de oxígeno son capaces de producir rupturas en la cadena del DNA y aun de inducir mutagénesis (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988) pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten mantener la información genética (Huberman, 1988).

#### 9. PARTICIPACIÓN DE LA GSH-Px EN LA RESPUESTA INMUNE Y EN LOS MECANISMOS DE EVASIÓN.

Un hospedero generalmente produce una respuesta inmune contra los agentes extraños que lo infectan. No obstante, los parásitos sobreviven provocando incluso una afección crónica. La forma en que estos organismos sobreviven a las consecuencias potencialmente letales de inmunización es de profundo interés biológico.

Se ha visto que algunos parásitos y agentes patógenos como Leishmania, Toxoplasma, Listeria, Mycobacterium y Taenia taenaeformis (Leid, en prensa) presentan algunas enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y/o glutatión peroxidasa, enzimas que se caracterizan por neutralizar o eliminar a los metabolitos de oxígeno que son producidos por los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) y que tienen la importante función de eliminar a los agentes patógenos siendo su principal arma para ello la generación de radicales de oxígeno letales (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, iones hidroxilo) (Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988). No se conoce el mecanismo de acción real de estas enzimas, pero se cree que la acción de los metabolitos de oxígeno se frustra por las

enzimas posiblemente liberadas de los parásitos. Leid (en prensa) purificó y caracterizó parcialmente por primera vez a la GSH-Px de un parásito, el metacéstono de Taenia taeniaeformis; esta enzima tiene como componente esencial al selenio que es el responsable de la inactivación del peróxido de hidrógeno y lípidos peroxidados (Plagia y Valentine, 1967; Machlin y Bendich, 1987; Huberman, 1988) por lo que se sugiere que la larva libera a la glutatión peroxidasa e inhibe la acción de los macrófagos y no permite que se lleve a cabo el proceso de inflamación, éste puede ser uno de los medios por los que el parásito evade los mecanismos de defensa del hospedero.

## II. HIPÓTESIS.

La similitud antigénica entre cisticercos de Taenia crassiceps y Taenia solium permite emplear una especie como modelo de la otra en el estudio de la relación hospedero - parásito; este tipo de estudios se facilita con el empleo de macromoléculas en comparación al uso de extractos crudos; la glutatión peroxidasa es una macromolécula interesante ya que aparentemente participa como mecanismo de evasión inmune en cisticercosis por Taenia taeniaeformis. Se postula que la glutatión peroxidasa también se encuentra presente en Taenia crassiceps y que puede ser reconocida por anticuerpos séricos de enfermos con neurocisticercosis.

## III. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fué demostrar la presencia y purificar la glutatión peroxidasa de larvas de Taenia crassiceps, así como la evaluación de la enzima en inmunodiagnóstico; ésta macromolécula podrá ser evaluada posteriormente como mecanismo de evasión inmune del parásito.

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 1. MODELO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron larvas de Taenia crassiceps de las cepas ORF e HYG, mantenidas por infección artificial en ratones (Mus musculus) hembras cepa Balb/c de cuatro a seis semanas de edad.

Para el mantenimiento y el uso de las cepas de los metacéstodos de T. crassiceps se aprovechó su capacidad reproductora asexual; esto se realizó mediante pases intraperitoneales de larvas a ratones sanos (Freeman, 1962). A un ratón con 30 días de infección se le disecó el abdomen, se extrajeron los parásitos y se colocaron en Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma) - ácido clorhídrico (Tris-HCl) 0.01M pH 8 a 4°C. Los cisticercos se lavaron cinco o seis veces en Tris-HCl, eliminando tanto a los parásitos calcificados como los restos del hospedero. Las series de pases intraperitoneales se hicieron inyectando en la cavidad peritoneal de cada ratón 10 a 20 larvas con una jeringa de 1 ml a través de una aguja de 20x25 mm. Las larvas que se emplearon para todos los experimentos se mantuvieron y reprodujeron durante seis meses.

## 2. PURIFICACIÓN DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px).

### 2.1. Obtención del extracto total.

Se recolectaron 160 ml de larvas no calcificadas de T. crassiceps del peritoneo de 3 ó 4 ratones previamente infectados, en Tris-HCl a 4°C en un vaso sumergido en hielo y se lavaron con la misma solución cinco o seis veces. Se les agregó KCl 3.0 M en Tris-HCl en una proporción de 1 ml de esta solución por cada 3 ml de cisticercos. Los parásitos se homogenizaron en un Polytron (Brinkmann Instruments) enfriándose en un baño de hielo durante un minuto (Flisser y col., 1980). Esta operación se repitió entre seis y ocho veces hasta quedar perfectamente licuados. El extracto se agitó suavemente durante 24 horas a 4°C, después se centrifugó (Beckman J2-21) a 20,000 r.p.m. durante 60 minutos a 4°C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 horas a 4°C contra cinco litros de Tris-HCl con azida de sodio (Sigma) con cuatro cambios del mismo amortiguador. Después, se centrifugó nuevamente a 20,000 r.p.m. durante 60 minutos a 4°C; el precipitado también se descartó y el sobrenadante constituyó el extracto total de cisticercos de T. crassiceps; el que se mantuvo a 4°C hasta su uso.

## 2.2. Cromatografía de intercambio catiónico.

Para obtener semipura a la GSH-Px se realizó una cromatografía de intercambio catiónico con el extracto total de T. crassiceps para lo que se preparó una columna de QAE-Cellex (Bio-Rad) de 3x30 cm equilibrada con Tris-HCl 0.01 M pH 8 y un gradiente salino a 4°C. El gradiente se logró al colocar dos vasos de precipitado conectados entre sí, sobre un agitador magnético; uno de los vasos contenía Tris-HCl y el otro NaCl 0.5M en Tris-HCl, cada uno con 250 ml. En la salida de la columna se conectó un colector (Retriener ISCO) de 200 tubos; cada fracción fue de 70 gotas (3 ml).

Se pasaron 150 ml en la línea entre de 2.7 a 5.5 mg/ml de extracto total por la columna; una de cada cinco fracciones se leyó en el espectrofotómetro (Beckman DU-65) a 280 nm para determinar la presencia o ausencia de proteínas, al entrar todo el extracto se continuó con Tris-HCl hasta alcanzar una densidad óptica de cero, por lo que indica que se lavó la columna. En seguida se procedió a instalar el gradiente salino, es decir, se comunicó la columna al vaso con Tris-HCl que se conectaba con el que contenía la sal, se dejó que fuera aumentando gradualmente la concentración salina en el vaso con Tris-HCl y de ésta manera pasarla a la columna. Se dejó fluir por la columna todo el volumen del gradiente (500 ml). Las fracciones que se colectaron en esta parte de la cromatografía se redujeron a 35 gotas (1.5 ml) y se leyó la densidad óptica a 280 nm en una de cada cinco fracciones. En seguida se procedió a lavar la columna con dos litros de Tris-HCl con el fin de eliminar el exceso de sal en

la misma. Las fracciones se guardaron en refrigeración.

A partir del tubo en que se inició el gradiente salino se determinó la conductividad (mS) para conocer el comportamiento del gradiente salino en la columna.

### 2.3. Ensayo enzimático de la Glutación Peroxidasa.

Se realizó un ensayo específico para determinar la actividad enzimática de la Glutación Peroxidasa de acuerdo con el método de Plagia y Valentine (1967) descrito en el apéndice.

La actividad enzimática de la GSH-Px se determinó cada cinco fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico. En cada fracción se le agregó el amortiguador de ensayo (GSH, NADPH, GSSG-R y amortiguador de fosfato de potasio 0.25 M pH 7) e hidroperóxido de Cumene, componentes necesarios para que se llevara a cabo la reacción en caso de que existiese la enzima. El testigo positivo consistió en adicionar nuevamente GSH, NADPH, GSSG-R y amortiguador de fosfato de potasio 0.25 M pH 7 más la GSH-Px comercial y al último hidroperóxido de Cumene. Al testigo negativo únicamente se le puso el amortiguador de ensayo y el hidroperóxido de Cumene. Cada tubo se leyó en el espectrofotómetro a 366 nm, el que fue previamente se calibró a ceros con el testigo positivo. Después se leyó el testigo negativo y en seguida las fracciones. En todos los tubos en los que la densidad óptica fue menor al valor del testigo negativo se consideró que contenía la enzima.

Una vez determinadas las fracciones con actividad enzimática, se reunieron en un conjunto, al que se denominó GSH-Px semipura, y se dializaron contra dos litros de Tris-HCl con dos cambios durante 24 horas a 4°C.

#### 2.4. Determinación y cuantificación de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951) descrito en el apéndice.

Se hizo una curva patrón con 10, 20, 50 y 100 ug/ml de albumina sérica bovina. Se interpolaron las densidades ópticas experimentales de las fracciones dializadas en la curva patrón y se calcularon sus concentraciones. A la curva patrón se le calculó la pendiente (m), ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación lineal para comprobar si su comportamiento era lineal y constante y a su vez se pudieran interpolar los valores experimentales en la misma. La concentración protéica de la GSH-Px semipura se determinó en tres o cuatro volúmenes diferentes, después se concentró por ultrafiltración con presión negativa (nitrógeno gaseoso en concentradores Amicon); las membranas que se emplearon permitían el paso de moléculas de hasta 10,000 daltons. Todo esto a 4°C.

Hasta este paso se emplearon cisticercos de T. solium y de T. crassiceps cepas ORF e HYG. En adelante se describirá la parte en la que se trabajó únicamente con T. crassiceps cepa ORF.

## 2.5. Electroforesis en geles de acrilamida.

Se preparó el gel separador al 10% y el concentrador al 5 %, ambos de poliacrilamida siguiendo la técnica de Laemmli (1970). Las muestras se trabajaron según se describe en el apéndice en la sección de electroforesis. Se emplearon 10 canales; en el primero se colocó el estándar de peso molecular bajo (Bio-Rad) en los subsecuentes carriles (A-D) se agregó: en el "A" extracto total de cistcerco, en el "B" una muestra de la primera parte de la cromatografía en la que se obtenía el primer pico de la corrida antes del gradiente salino, en el "C" la GSH-Px semipura con actividad enzimática, en el "D" una de las fracciones finales que forman el segundo pico de la curva después del gradiente salino y otro estándar de peso molecular bajo (PM). Cada una de las muestras se trató con y sin mercaptoetanol. La electroforesis se corrió en el gel concentrador a 20 mA y en el gel separador a 100 mA a 4°C. Se tiñó el gel con azul de Coomassie y se destiñó el exceso con ácido acético al 10 % (Apéndice).

## 2.6. Obtención de anticuerpos anti-glutatión peroxidasa.

Con la finalidad de obtener anticuerpos anti-GSH-Px se inmunizaron a dos conejos blancos cepa Nueva Zelanda de 1.5 a 2 kilos y de 2.5 a 3 meses de edad con GSH-Px de eritrocitos de cabra (Sigma). Los conejos se sangraron un día antes de ser inmunizados, a cada conejo se le extrajeron 10 ml de sangre; los que se dejaron coagular dos horas y el suero se separó por centrifugación (Sorvall RT6000) a 2000 rpm durante 10 minutos; se hicieron alicuotas de éstos de 200 ul y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En cada una de las dos primeras inmunizaciones se emplearon 250 ug de GSH-Px por conejo vía subcutánea; se preparó para inmunizar a dos conejos la mezcla de 2 ml de adyuvante completo de Freund (ACF) y 1 mg de GSH-Px comercial disueltos en 2 ml del amortiguador de fosfatos los que se mezclaron perfectamente en una jeringa de 5 ml y formaron una fase. La primera dosis de GSH-Px se aplicó el día uno, la segunda el día 15. La tercera dosis también fue de 250 ug de enzima pero sin ACF y se inyectó el día 30 por vía intramuscular. Los sangrados se hicieron a partir del segundo refuerzo de GSH-Px y siete días después de cada inmunización, estos sueros también se almacenaron en alicuotas a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La actividad de los sueros se probó por medio del ensayo inmunoenzimático (ELISA) técnica original de Voller y col. (1976) que se detalla en el apéndice. La GSH-Px comercial se dializó con amortiguador de carbonatos a pH 9.6 y se acopló 100 ul a cada una de los pozos de Inmulon I a concentraciones

de 20 ug/ml y 1 ug/ml toda la noche a 4°C. Se lavó con amortiguador de fosfatos salino - Tween 20 (AFS/T; ver apéndice) se agregó como primer anticuerpo suero de conejo pre-inmunizado ó post-inmunizado diluido 1:100, 1:500 y 1:1000; como segundo anticuerpo se usó un conjugado de anti-IgG de conejo producido en cabra, acoplado a fosfatasa alcalina y diluido 1:1000. Como sustrato se empleó dietanolamina (DAB) y se leyó la absorbancia a 405 nm, en un lector de ELISA (Bio-Rad).

#### 2.7. Análisis de la reacción cruzada entre GSH-Px comercial y cisticercos de T. crassiceps.

Se realizó el ELISA y se usó como antígeno a la GSH-Px semipura obtenida en la cromatografía de intercambio catiónico para determinar si o no existía reacción cruzada entre los anticuerpos anti-GSH-Px comercial con la GSH-Px de cisticercos de T. crassiceps. Los antígenos se pegaron a los pozos de la placa de ELISA a las concentraciones de 1 ug/ml y 20 ug/ml, el testigo del antígeno fué GSH-Px comercial acoplada a los pozos en las mismas concentraciones que los antígenos; como primer anticuerpo se usaron los sueros de conejo normal y de conejo inmunizado con GSH-Px comercial a las diluciones 1:50 y 1:500; como segundo anticuerpo el conjugado anti-IgG de conejo acoplado con fosfatasa alcalina producidos en cabra (Sigma) a la dilución de 1:500. Los detalles de la técnica se encuentran en el apéndice.

También se evaluó la reacción cruzada de los mismos antígenos por electroinmunotransferencia (EIT) (Towbin, 1979, ver apéndice). Para la transferencia se hicieron dos geles preparativos de poliacrilamida al 10 % de 0.75 mm con peine de tres carriles, dos pequeños y uno grande. En el primer gel se empleó como muestra al extracto total de cisticercos de T. crassiceps a una concentración de 2.67 mg/ml de la que se usaron 200 ul (534 ug) en el carril grande; en el segundo gel se empleó a la GSH-Px semipura con actividad enzimática comprobada a una concentración de 292 mg/ml del que se tomó 100 ul (29 mg) y se puso en el carril grande. En ambos geles se adicionaron por carril 5 ul del estándar de peso molecular bajo, y se colocaron en el primer y último carril de cada gel. La electroforesis se corrió en el gel concentrador a 50 mA y en el separador a 150 mA a 4°C. Se cortó un extremo del gel que abarcó uno de los estándares de peso molecular y parte de la muestra corrida, se tizó con azul de Coomasie. En seguida se transfirieron del gel al papel de nitrocelulosa las proteínas; esto se hizo en una hora a 25 V a 1 A. En seguida, se cortó el papel de nitrocelulosa en tiras de 3x80 mm. Después se procedió a hacer un EIT con las tiras de papel transferido incubandose con sueros de conejo normal o de conejo con anticuerpos anti-GSH-Px; las diluciones que se manejaron fueron: 1:10, 1:100 para los sueros y el conjugado con anti-IgG de conejo acopladas con peroxidasa producidas en cabra (Sigma) 1:1000. Se reveló con 3,3'diaminobenzidina.

## 2.8. Electroelusión.

Una vez que se localizó la banda por EIT se eligió la técnica de electroelusión para purificar a la GSH-Px. Se procedió a realizarla corriendo geles preparativos en los que se cortó la banda de interés para posteriormente electroeluir la.

Se hicieron geles de poliacrilamida al 10 %, cuatro de 0.75 mm y dos de 6.0 mm. Se empleó como muestra a la GSH-Px semipura; a los cuatro geles se les agregó a cada uno 7.9 mg en 450 ul, los otros dos 15.8 mg en 900 ul por gel. Se corrió la electroforesis a 50 mA cuando las muestras estaban en el gel concentrador y a 150 mA en el gel separador.

Todos los geles al finalizar la electroforesis se lavaron con agua destilada de 10 a 20 segundos; después se sumergieron en acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 4 M con ayuda de una lámpara se visualizaron, las bandas proteicas. Se cortó en cada gel la banda de GSH-Px que correspondía al peso molecular que se reveló en el EIT por los anticuerpos anti-GSH-Px. Las tiras con las bandas de la enzima se lavaron con agua destilada durante una hora cambiandola cada 20 minutos; se almacenaron en frío previamente escurridas en un tubo de ensaye hasta su uso.

En una columna de vidrio de 4x13 cm se preparó un gel de poliacrilamida al 5 % de 1 cm de altura. Abajo del gel se colocó una bolsita de diálisis de 7.6x6.0 cm con 30 ml de amortiguador de corrida para electroforesis teniendo la precaución de no hacer burbujas. En un cristizador con el mismo tampon se sumergió la mitad de la bolsa de diálisis.

Las bandas de GSH-Px se fragmentaron en segmentos muy pequeños y se colocaron sobre el gel en la parte interior de la columna embebidos con el mismo amortiguador en este extremo se colocó el polo positivo y en amortiguador que rodeaba a la bolsa de diálisis el polo negativo. La electroelusión se corrió durante 5 horas a 25 mA, cuando terminó este período de tiempo se invirtieron los electrodos durante 5 minutos para despejar a la enzima de la membrana de diálisis.

Se dializó la enzima electroeluida contra AFS 1x pH 7 con cuatro cambios del mismo cada dos horas; además se hizo la cuantificación de proteínas. En seguida, se concentró por ultrafiltración a presión negativa; y finalmente se corrió un gel analítico de poliacrilamida al 10 %. En el gel se colocaron 110 ug en 25 ul de GSH-Px electroeluida en condiciones no reducidas, junto con su respectivo estándar de peso molecular bajo.

### 3. REACCIÓN DEL SUERO Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE ENFERMOS CON NEUROCISTICERCOSIS A LA GLUTATIÓN PEROXIDASA.

Con el proposito de saber si la GSH-Px reacciona con anticuerpos de enfermos con neurocisticercosis como posible antígeno para diagnóstico de la misma, se hizo una EIT de la misma. En un gel preparativo de poliacrilamida al 10 % para transferencia se corrieron 660 ug en un volumen de 150 ul de GSH-Px electroeluida de cisticerco de T. crassiceps; y se transfirió a papel de nitrocelulosa. La electroforesis y la transferencia se realizaron en las mismas condiciones que las

descritas anteriormente. Con las tiras de nitrocelulosa con GSH-Px pura se realizó la prueba de EIT de dos sueros humanos normales y cuatro positivos para cisticercosis; así como de dos líquidos cefalorraquídeos (LCR) negativos y cinco positivos para la misma enfermedad. Los sueros se diluyeron 1:50 y los LCR 1:5; el conjugado anti-IgG de humano producido en cabra (Sigma) se empleó a la dilución 1:1000 (Apéndice).

## V. RESULTADOS.

### 1. PURIFICACIÓN DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA.

Se determinó la presencia de la enzima glutatión peroxidasa en los metacéstodos de T. solium y T. crassiceps cepas ORF e HYG. Esto se logró con la obtención de la GSH-Px semipura por medio de la cromatografía de intercambio catiónico (CIC) que se realizó con una columna de QAE-Cellex equilibrada con Tris-HCl 0.01M pH 8 a la que se le agregó 150 ml de extracto total de cisticercos. El extracto total de las larvas de T. solium presentó en promedio la concentración de 5.5 mg/ml de proteína total, el de T. crassiceps cepa ORF 2.7 mg/ml y el de T. crassiceps cepa HYG 3.15 mg/ml.

La CIC se repitió ocho veces en el caso de T. solium y T. crassiceps cepa ORF; y para T. crassiceps cepa HYG tres veces.

Una de cada cinco fracciones de la columna fue leída a 280 nm para determinar el comportamiento de las proteínas en la columna. Los tres tipos de larvas presentaron una curva patrón muy similar con dos picos bien definidos. En el primero, para T. solium la densidad óptica máxima promedio de las diferentes corridas fué de 1.936 nm. En T. crassiceps cepa ORF fue de 0.496 nm y en la cepa HYG 0.185 nm; cuando disminuyó la densidad óptica entre cero y 0.035 nm se agregó el gradiente salino, y comenzó a desprenderse la proteína que se había adsorbido a la celulosa, formándose el segundo pico en el que para T. solium la densidad óptica promedio más alta

fue de 2.84 nm, para T. crassiceps cepa ORF fué de 2.069 nm y en la cepa HYG fue de 1.533 nm (Tablas II, III, IV y figuras 14, 15, 16).

Para ubicar a las fracciones con glutati6n peroxidasa se realiz6 el ensayo de actividad enzimática propuesto por Plagia y Valentine (1967). Dicho ensayo se hizo cada cinco fracciones iniciando por el tubo en el que se conect6 a la columna el gradiente salino. La actividad se ley6 a 366 nm, el testigo positivo present6 densidad 6ptica de cero (calibrador del espectrof6metro), y el testigo negativo de 0.2 nm. A las fracciones que presentaron densidad 6ptica menor a la del testigo negativo se les consider6 con actividad enzimática y por lo tanto con glutati6n peroxidasa. Los tres tipos de larvas, presentaron densidades 6pticas con actividad enzimática desde 0.04 hasta 0.18, pero s6lo en la cepa ORF de T. crassiceps lleg6 a alcanzar valores de la absorbancia de cero de la actividad de la enzima. Con este ensayo, el promedio de la actividad enzimática de la GSH-Px de todos los ensayos realizados fue del 80 %. El n6mero de fracciones con glutati6n peroxidasa vari6 mucho, ya que se obtuvieron desde 6 hasta 48 en la diferentes CIC. En la curva de la salida de prote6nas (280 nm) la glutati6n peroxidasa de acuerdo al ensayo se localiza en el segundo pico entre las primeras densidades 6pticas m6s altas o en el centro de este mismo pico (Tablas II, III, IV y figuras 14, 15, 16).

En general la actividad de la GSH-Px se encuentra en la l6nea promedio de 5.35 - 10.28 mS (Tablas II, III, IV y figuras 14, 15, 16).

En la figura 17 se presenta un gel de poliacrilamida al 10% en donde se corrió el extracto total y diferentes fracciones de *T. crassiceps* cepa ORF obtenidas en la columna de QAE-Cellex en condiciones reducidas. En este gel se puede observar la secuencia de la curva de proteínas (280 nm); en donde se notan las diferencias entre: el extracto total de cisticercos (carril A), una fracción con alta densidad óptica del primer pico de la curva (carril B), la GSH-Px semipura (carril C) y una fracción final del segundo pico de la curva (carril D); se pudo observar de manera general, que las muestras son poco diferentes, en el extracto total de cisticercos se observa una gama de bandas que van desde 98 kD hasta 14 kD; en la fracción con alta densidad óptica del primer pico se presentan nueve bandas con pesos moleculares de 66 kD a 30 kD; la GSH-Px semipura es muy similar al extracto total de cisticercos, pero se ven en menor intensidad y no se define ninguna banda como la posible glutatión peroxidasa (Tabla III, figura 15).

Se probó la reactividad del suero anti-GSH-Px producido en conejo por medio del ELISA. Este ensayo inmunoenzimático empleó como antígeno a la GSH-Px comercial, como primer anticuerpo a los sueros de conejo normal ó inmune contra GSH-Px y como segundo anticuerpo IgG de chivo anti-IgG de conejo acopladas con fosfatasa alcalina (conjugado). Los resultados del ELISA se obtuvieron a partir de la lectura de la absorbancia a 405 nm; los sueros pre-inmunes tuvieron absorbancia de cero, mientras que los inmunes fueron mayores de 2.0 en las tres diluciones del suero (1:100, 1:500,

1:1000) lo que indicó que el suero anti-GSH-Px sí reaccionaba con la glutatión peroxidasa.

Para determinar la reacción cruzada entre la GSH-Px comercial y la del cisticerco se hicieron las pruebas de ELISA e EIT en los que se empleó como antígeno al extracto total de cisticercos. En el ELISA los resultados de la lectura a 405 nm en suero normal fueron casi idénticos a los del suero postinmune, aunque los testigos presentaron datos similares a los obtenidas en evaluaciones anteriores, 0.124 nm en la dilución 1:100 y 0.194 nm en la dilución 1:500 para el suero normal de conejo y mayor de 2.0 nm para las dos diluciones en suero con IgG-anti-GSH-Px..

En el EIT se emplearon las tiras de papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto total de T. crassiceps cepa ORF y la GSH-Px semipura. Los sueros pre y postinmunizados se revelaron con anticuerpos anti-IgG de conejo producidos en cabra y acoplados a peroxidasa. Con ambos antígenos se presentaron dos bandas específicas muy cercanas de aproximadamente 30 kD en los sueros inmunes, que no se presentaron en los sueros pre-inmunes de conejo (figuras 18 y 19).

Estas bandas de 30 kD dieron la pauta de la purificación de la GSH-Px por medio de la electroelusión. Se hicieron varios geles de poliacrilamida al 10 %, en los que se corrió el conjunto proteico con GSH-Px. Se corto de cada gel las dos bandas de 30 kD y se electroeluyeron. De 63.36 mg de proteína total empleada en la electroforesis se recuperaron 4.5 mg de GSH-Px pura, esto se corroboró con un gel analítico de

poliacrilamida al 10 % en donde se observaron las dos bandas de aproximadamente 30 kD, lo que indicó que estaba pura la GSH-Px (figura 20, carril de GSH-Px).

## 2. REACCIÓN DEL SUERO Y LIQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE ENFERMOS CON NEUROCISTICERCOSIS EN PRESENCIA DE GSH-Px DE LARVAS DE T. crassiceps CEPA ORF.

Se realizó una EIT, de la GSH-Px pura de cisticercos de T. crassiceps. Como primer anticuerpo se emplearon dos sueros negativos y cuatro positivos y dos LCR negativos y cinco positivos en ELISA para disgnosticar cisticercosis. Los sueros se diluyeron 1:50 y los LCR 1:5, el conjugado 1:1000. En la EIT se pudo obsevar que todas las muestras positivas que previamente habían sido sometidas al ELISA eran tanto sueros como los LCR de enfermos positivos mientras que reafirmó la negatividad los testigos negativos se frente a la GSH-Px del metacéstodo de T. crassiceps cepa ORF (figura 20).

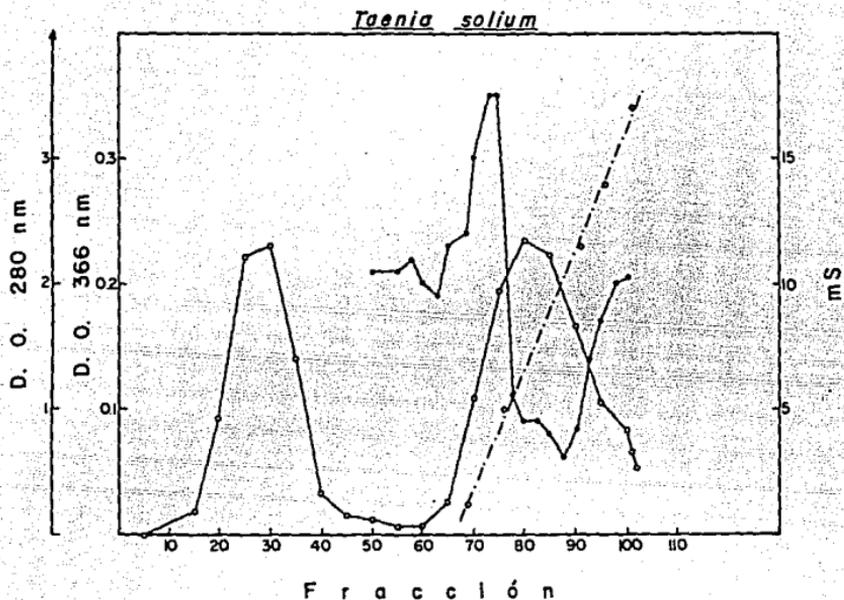


Figura 14. Cromatografía de intercambio catiónico en QAE-Cellex de *T. solium* donde se muestra la actividad enzimática de la GSH-Px. Proteína: absorbancia 280 nm (o—o) actividad enzimática (●—●); conductividad (◇ - - ◇). Ver tabla II.

TABLA II. Datos de la cromatografía de intercambio catiónico a 280 nm (lectura de proteínas); ensayo enzimático específico para la GSH-Px a 366 nm y la conductividad (mS) del gradiente salino de L. solium, ver figura 14.

| Fracción | 280 nm | 366 nm | mS   |
|----------|--------|--------|------|
| 5        | 0.0    |        |      |
| 10       | 0.0    |        |      |
| 15       | 0.194  |        |      |
| 20       | 0.920  |        |      |
| 25       | 2.220  |        |      |
| 30       | 2.290  |        |      |
| 35       | 1.400  |        |      |
| 40       | 0.322  |        |      |
| 45       | 0.162  |        |      |
| 50       | 0.102  | 0.21   |      |
| 53       |        | 0.21   |      |
| 55       | 0.064  | 0.21   |      |
| 58       |        | 0.22   | 0.3  |
| 60       | 0.070  | 0.20   |      |
| 63       |        | 0.19   |      |
| 65       | 0.272  | 0.23   |      |
| 68       |        | 0.24   | 2.5  |
| 70       | 1.095  | 0.30   |      |
| 73       |        | 0.35   |      |
| 75       | 1.956  | 0.35   | 5.0  |
| 78       |        | 0.11   |      |
| 80       | 2.350  | 0.091  |      |
| 83       |        | 0.09   |      |
| 85       | 2.232  | 0.08   |      |
| 88       |        | 0.06   |      |
| 90       | 1.670  | 0.085  | 11.5 |
| 93       |        | 0.14   |      |
| 95       | 1.050  | 0.17   | 14.0 |
| 98       |        | 0.20   |      |
| 100      | 0.830  | 0.20   |      |
| 101      | 0.676  | 0.20   | 17.0 |
| 102      | 0.533  |        |      |

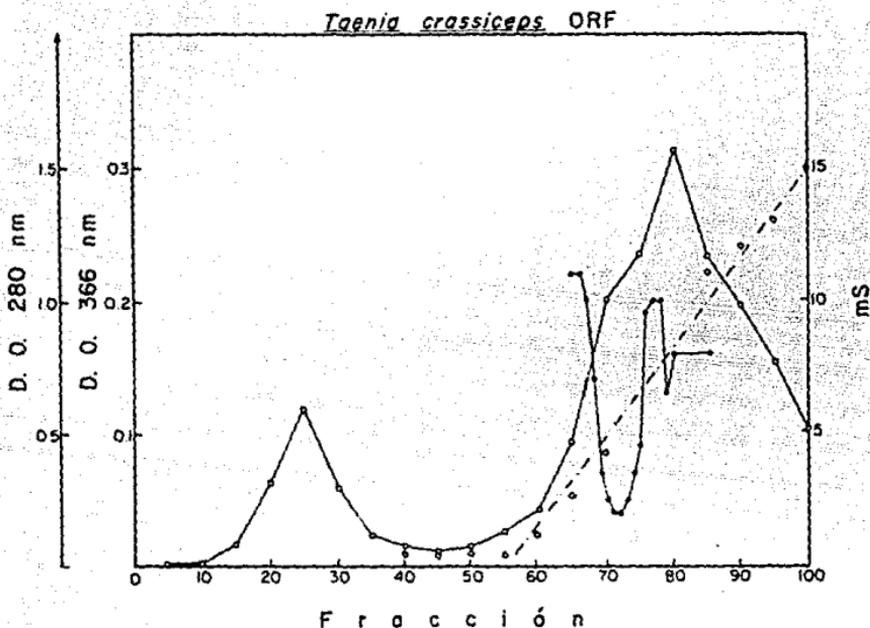


Figura 15. Cromatografía de intercambio catiónico en QAE-Cellex de *T. crassiceps* cepa ORF donde se muestra la actividad enzimática de la GSH-Px. Proteína: absorbancia 280nm (o—o); actividad enzimática (●—●); conductividad (◇—◇). Ver tabla III y fig. 17.

TABLA III. Datos de la cromatografía de intercambio catiónico a 280 nm (lectura de proteínas); ensayo enzimático específico para la GSH-Px a 366 nm y conductividad (mS) de T. crassiceps cepa ORF, ver figura 15.

| Fracción | 280 nm | 366 nm | mS   |
|----------|--------|--------|------|
| 5        | 0.009  |        |      |
| 10       | 0.011  |        |      |
| 15       | 0.086  |        |      |
| 20       | 0.318  |        |      |
| 25       | 0.594  |        |      |
| 30       | 0.297  |        |      |
| 35       | 0.122  |        |      |
| 40       | 0.077  |        | 0.5  |
| 45       | 0.054  |        | 0.4  |
| 50       | 0.070  |        | 0.4  |
| 55       | 0.147  |        | 0.4  |
| 60       | 0.207  |        | 1.2  |
| 65       | 0.465  | 0.22   | 2.7  |
| 66       |        | 0.22   |      |
| 67       |        | 0.20   |      |
| 68       |        | 0.14   |      |
| 69       |        | 0.07   |      |
| 70       | 1.004  | 0.05   | 4.3  |
| 71       |        | 0.04   |      |
| 72       |        | 0.04   |      |
| 73       |        | 0.05   |      |
| 74       |        | 0.07   |      |
| 75       | 1.361  | 0.09   |      |
| 76       |        | 0.19   |      |
| 77       |        | 0.20   |      |
| 78       |        | 0.20   |      |
| 79       |        | 0.13   |      |
| 80       | 1.568  | 0.16   | 7.3  |
| 85       | 1.322  | 0.16   | 11.0 |
| 90       | 0.965  |        | 12.0 |
| 95       | 0.767  |        | 13.0 |
| 100      | 0.509  |        | 15.0 |

*Taenia crassiceps* HYG

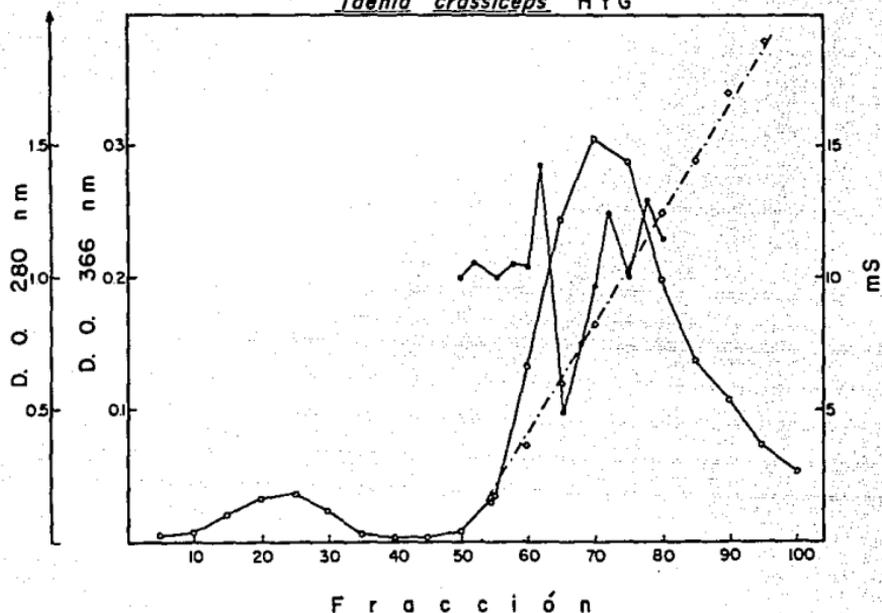


Figura 16. Cromatografía de intercambio catiónico en QAE-Cellex de *T. crassiceps* cepa HYG donde se muestra la actividad enzimática de la GSH-Px. Proteína: absorbancia 280nm (○—○), actividad enzimática (●—●); conductividad (◇—◇). Ver tabla IV.

TABLA IV. Datos de la cromatografía de intercambio catiónico a 280 nm (lectura de proteínas); ensayo enzimático específico para la GSH-Px a 366 nm y la conductividad (mS) del gradiente salino de T. crassiceps cepa HYG, ver figura 16.

| Fración | 280 nm | 366 nm | mS   |
|---------|--------|--------|------|
| 5       | 0.023  |        |      |
| 10      | 0.030  |        |      |
| 15      | 0.104  |        |      |
| 20      | 0.165  |        |      |
| 25      | 0.186  |        |      |
| 30      | 0.110  |        |      |
| 35      | 0.032  |        |      |
| 40      | 0.025  |        |      |
| 45      | 0.025  |        |      |
| 50      | 0.04   | 0.20   |      |
| 52      |        | 0.21   |      |
| 55      | 0.177  | 0.20   | 1.5  |
| 58      |        | 0.21   |      |
| 60      | 0.665  | 0.20   | 3.5  |
| 62      |        | 0.183  |      |
| 65      | 1.224  | 0.08   | 6.0  |
| 68      |        | 0.147  |      |
| 70      | 1.533  | 0.193  | 8.2  |
| 72      |        | 0.25   |      |
| 75      | 1.446  | 0.20   | 1.0  |
| 78      |        | 0.25   |      |
| 80      | 0.998  | 0.23   | 12.5 |
| 85      | 0.699  |        | 14.5 |
| 90      | 0.544  |        | 17.0 |
| 95      | 0.377  |        | 19.0 |
| 100     | 0.276  |        | 20.0 |

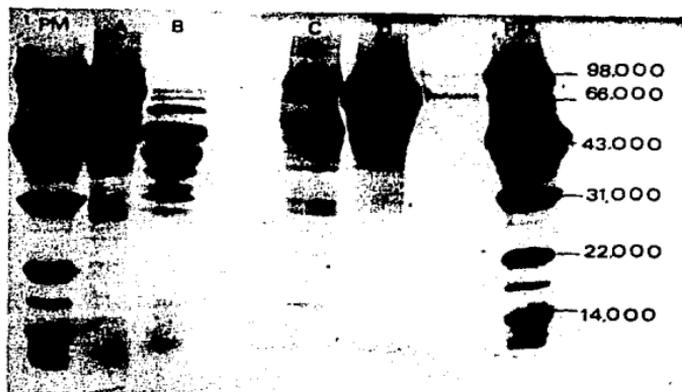


Figura 17. Gel reductor de poliacrilamida al 10% donde se muestran diferentes fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico (QAE-Cellex). (A) extracto total de larva de *T. crassiceps* cepa ORF, (B) fracción 25 correspondiente al primer pico de proteínas a 280 nm, (C) fracción 66 que es la GSH-Px semipura correspondiente al segundo pico de proteínas a 280 nm, (D) fracción 75 fin de la curva a 280 nm, (PM) estándar de peso molecular bajo.

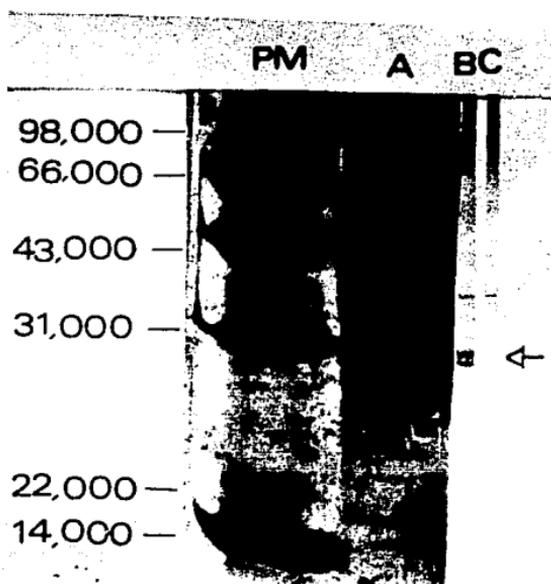


Figura 18. EIT del extracto total de T. crassiceps cepa ORF: (PM) estándar de peso molecular bajo, (A) extracto total revelado con tinta china, (B) EIT revelado con suero de conejo inmunizado con inmunoglobulinas tipo IgG anti-GSH-Px de cabra, (C) EIT revelado con suero de conejo pre-inmune. La flecha señala las dos bandas de 30 kD.

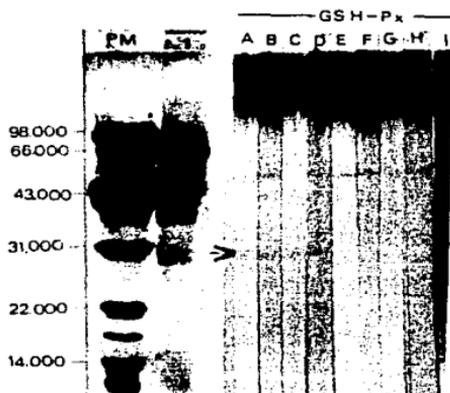


Figura 19. Gel de poliacrilamida al 10%, (PM) estándar de peso molecular bajo teñido con azul de Coomassie, (1) extracto total de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. EIT con GSH-Px semipura con actividad enzimática específica comprobada, cuyas bandas son de 30 kD. (A-D) Incubación de las tiras de nitrocelulosa con suero de conejo con anticuerpos IgG anti-GSH-Px, (E-H) incubación con suero de conejo pre-inmune, (I) GSH-Px semipura con actividad enzimática teñida con tinta china.

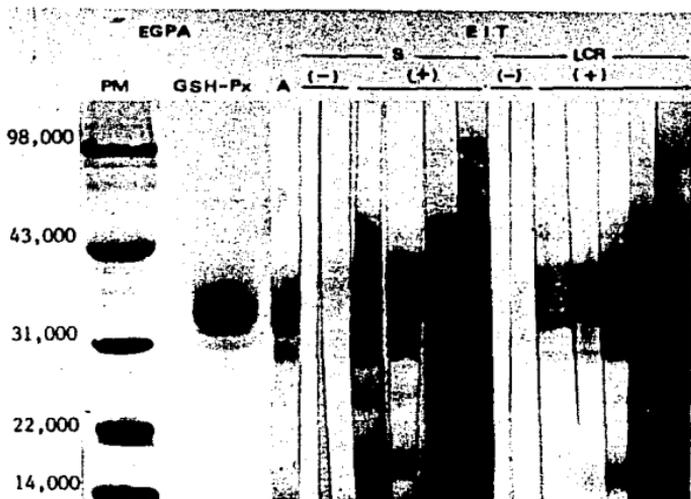


Figura 20. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (EGPA) revelado con azul de Coomassie, (PM) estándar de peso molecular bajo, (GSH-Px) glutatión peroxidasa purificada por electroelusión, EIT de la GSH-Px electroeluída revelada con: (A) amido negro y sueros (S; dilución 1:50) y líquidos cefalorraquídeos (LCR; dilución 1:5) negativos y positivos para neurocisticercosis. (S -) sueros negativos, (S +) sueros positivos, (LCR -) LCR negativos y (LCR +) LCR positivos.

## VI. DISCUSIÓN.

El hombre y el cerdo adquieren la cisticercosis ingiriendo huevos de T. solium, cuyos embriones por vía sanguínea se establecen en diversos tejidos y se transforman en larvas (Malagón, 1989), es frecuente que permanezcan latentes durante varios años y después sean destruidas por la respuesta inflamatoria (Willms y Merchant, 1980). Una posible explicación del establecimiento prolongado y desapercibido de los parásitos en el hospedero podría ser el que las larvas empleen algún mecanismo de evasión inmune (Leid y col., 1987) y conforme envejecen pierden la capacidad de evasión y entonces pueden actuar los componentes de la respuesta inmune e inflamatoria del hospedero (Flisser, comunicación personal).

Un mecanismo de evasión inmune del parásito es la degradación enzimática de los metabolitos intermediarios del oxígeno (MIO) producidos por los sistemas inflamatorios del hospedero. Dos de los MIO, anión superóxido y peróxido de hidrógeno son inactivados enzimáticamente por superóxido dismutasa y catalasa y/o glutatión peroxidasa respectivamente. Las evidencias recientes obtenidas con Leishmania tropica, L. donovani (Murray, 1981; Meshnik y Eaton, 1981), Crithidia fasciculata (LeTrant y col., 1983) y Toxoplasma gondii (Murray, 1981) sugieren que estos organismos son capaces de metabolizar  $O_2$  y  $H_2O_2$ , razón por la que pueden sobrevivir en el interior de los macrófagos del

hospedero; sin embargo, existen otros parásitos que no tienen enzimas desintoxicantes para MIO. Es importante recalcar que los parásitos antes mencionados son intracelulares y no se sabe realmente si el cisticercos actúe igual que estos parásitos. Leid (en prensa) purificó y caracterizó parcialmente a la glutatión peroxidasa del metacéstodo de Taenia taeniaeformis, ésta es la primera peroxidasa que se ha purificado en un parásito. La glutatión peroxidasa es responsable de la inactivación del peróxido de hidrógeno por lo que Leid (en prensa) sugiere que la enzima sea una de los medios por los que el parásito evade al hospedero.

El objetivo de esta tesis fue demostrar la presencia y purificar a la glutatión peroxidasa en larvas de T. crassiceps cepa ORF, que es una enzima que posteriormente se piensa evaluar como posible mecanismo de evasión inmune y posible antígeno para inmunodiagnóstico. El metacéstodo de T. crassiceps es un buen modelo experimental para estudiar la cisticercosis producida por T. solium debido a la facilidad del mantenimiento de las larvas en el laboratorio por medio de pases intraperitoneales de larvas de ratón a ratón (Freeman, 1962) y fundamentalmente porque ambas especies presentan una gran similitud antigénica (Larralde y col., 1989, 1989, 1990, en prensa)

La presencia de la glutatión peroxidasa se demostró en metacéstodos de T. crassiceps cepas ORF e HYG y T. solium, una vez que se obtuvo por cromatografía de intercambio catiónico (CIC) las GSH-Px semipuras de los tres metacéstodos de estas especies y se llevó a cabo el ensayo enzimático

(Plagia y Valentine, 1967) (Ver tablas II, III, IV y figs. 14, 15, 16). En general la actividad enzimática de los ensayos de las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio catiónico, en los tres tipos de cisticercos fué del 80 %, sólo la cepa ORF llegó a tener el 100 %; esto se vió porque fué el único de los metacéstodos que llegó alcanzar absorbancias de cero en el ensayo, posiblemente sea la larva que tenga mayor concentración de GSH-Px. Además, esta cepa únicamente presenta reminiscencias del escólex, y no puede concluir su ciclo de vida por la falta de esta parte esencial para dar origen a un parásito adulto (Freeman, 1962), por lo tanto, se sugiere que por una posible mutación favorable en esta cepa logró algunos mecanismos efectivos de evasión de su hospedero que ayudan a su sobrevivencia.

Para la purificación de la GSH-Px se produjeron sueros de conejo con GSH-Px comercial de cabra. Con el suero de conejo inmune se determinó la reacción cruzada entre la glutatión peroxidasa comercial de cabra y la de cisticerco de T. crassiceps cepa ORF por medio de ELISA y EIT en las que se empleó como antígeno al extracto total de cisticerco cepa ORF. El ELISA no fué una evaluación efectiva puesto que los resultados de esta técnica fueron negativos. Sin embargo, en la EIT se lograron observar dos bandas específicas perfectamente bien definidas de aproximadamente 30 kD en los sueros con anticuerpos anti-GSH-Px y estas dos bandas no se presentaron en los sueros normales; esto permitió pensar que esas bandas correspondían a la GSH-Px.

Nuevamente, se comparan estas dos pruebas inmunológicas, y se confirma lo que antes se han mencionado Tsang y col. (1989) y Feldman y col. (1990) quienes afirman que la prueba de EIT es más sensible que la ELISA, ya que la reacción cruzada entre las GSH-Px de cabra y la de cisticerco de T. crassiceps cepa ORF se determinó por EIT.

Estas bandas de 30 kD permitieron la purificación de la enzima por el método de electroelusión. De 63.36 mg que se emplearon para realizar las electroforesis y electroelusión, se recuperaron 4.5 mg de enzima en 1 ml de Tris-HCl 0.01 M pH 8, lo que indica que se tuvo un buen rendimiento de proteína, pues por lo general se requiere de varios cientos de mg de proteína para obtener entre unos pocos microgramos a fracciones de estos (Hunkapiller y col., 1983). En el gel de poliacrilamida analítico en el que se analizó el material que se obtuvo de la electroelusión se pueden observar fácilmente bandas en el peso molecular alrededor de 30 kD, lo que permitió pensar que esas bandas eran la enzima pura. A la enzima electroeluída no se le efectuó un ensayo de actividad ya que se sabe que algunos aminoácidos tales como triptófano, histidina y metionina se destruyen con los radicales libres u oxidantes de la matriz de los geles de poliacrilamida (Hunkapiller y col., 1983), además las enzimas son muy delicadas pues se desnaturalizan muy fácilmente por los cambios de temperatura y pH extremos, la exposición a detergentes como el SDS o por agitación vigorosa de la disolución de una proteína con la fase acuosa hasta que forma espuma (Strayer, 1985; Lehninger, 1987)

La glutatión peroxidasa de mamíferos es selenio dependiente y su estructura se constituye de un tetrámero con peso molecular de  $84,000 \pm 5000$  D. El tetrámero posee cuatro subunidades idénticas de  $21,000$  D de peso molecular (Tappel, 1978). La GSH-Px selenio independiente o glutatión transferasas de mamíferos (Jacoby, 1978; Pierce y Tappel, 1984; Warholm y col., 1985) son dímeros que en estado nativo tienen un peso molecular de  $35,000$  D. Las subunidades son de  $17,000$  D. El peso molecular aparente de la glutatión peroxidasa de T. taeniaeformis es de  $45,000$  D en gel de filtración;  $24,900$  D cuando se reduce y se analiza en un gel de poliacrilamida con SDS o  $26,000$  D cuando no se reduce, y se analiza en un gel de poliacrilamida con SDS (Leid, en prensa). La glutatión peroxidasa pura de T. crassiceps cepa ORF analizada por electroforesis en un gel de poliacrilamida al  $10\%$  con SDS produjo dos bandas de aproximadamente  $30,000$  D cuando no se redujo. Estos resultados podrían sugerir la presencia en el metacéstodo de T. crassiceps de la cepa ORF de una enzima selenio-independiente o glutatión transferasa; esto quizás se pueda afirmar probando varios inhibidores químicos de la glutatión peroxidasa selenio dependiente e independientes o glutatión transferasas.

La glutatión peroxidasa de T. crassiceps con el peso molecular de  $30$  kD contrasta con la de los mamíferos de  $84 \pm 5$  kD en condiciones reducidas, lo que se comprende ya que estos organismos están muy alejados filogenéticamente (Meglitsch, 1987) y sería muy probable que las enzimas de estos grupos de animales variaran, sin embargo, podrían

conservar la estructura y función principal de la enzima. No obstante, la glutatión peroxidasa de T. taeniaeformis tiene un peso molecular (26 kD) similar al de T. crassiceps (30 kD) y esto posiblemente sea porque ambas son especies de céstodos y filogenéticamente están muy cercanas, lo que nos lleva a pensar que las dos glutatión peroxidasa de estos parásitos quizás sean similares y sus características bioquímicas también lo sean.

Una diferencia marcada entre la glutatión peroxidasa de mamíferos y de T. taeniaeformis con la de T. crassiceps es que en los geles de poliacrilamida con SDS en condiciones no reductoras, es que la primera únicamente revela una banda (Wendel, 1981; Leid, en prensa) y en la última se ven dos bandas.

También se ha observado que la enzima de T. crassiceps cuando se almacena en congelación o con glicerol por más de un par de semanas, al utilizarla para correrla en geles de poliacrilamida no se revela con la misma nitidez que si estuviera fresca (Plancarte, comunicación personal), lo que hace suponer que es una enzima muy labil y se degrada fácilmente, por lo que su vida media es muy corta.

Finalmente en lo que se refiere a la glutatión peroxidasa como posible antígeno para el diagnóstico de la cisticercosis, esta enzima se probó en EIT. Es impresionante notar que en la primera evaluación de la glutatión peroxidasa de T. crassiceps cepa ORF, todos los sueros y líquidos cefalorraquídeos de humano tanto negativos como positivos en el diagnóstico de esta enfermedad por ELISA se hayan

confirmado, es decir, los que eran negativos resultaron negativos y lo mismo sucedió con los positivos; sin embargo, debe tomarse en cuenta que la enzima únicamente se probó en seis sueros de los que dos eran negativos y cuatro positivos, y siete LCR de los que dos eran negativos y cinco positivos; aunque este número de muestras es bajo dá la pauta para iniciar un proyecto tendiente a evaluar a la glutatión peroxidasa como un antígeno alternativo para diagnóstico de la neurocisticercosis, ya que frecuentemente es difícil coleccionar cisticercos de T. solium para antígeno, a diferencia de T. crassiceps que se puede mantener fácilmente a nivel de laboratorio.

## VII. CONCLUSIONES.

Los metacéstodos de T. crassiceps cepas ORF e HYG y T. solium tienen glutatión peroxidasa.

La glutatión peroxidasa de T. crassiceps es de un peso molecular aproximadamente de 30 kD en condiciones no reducidas, y es muy similar al de T. taeniaeformis de 26,000D en las mismas condiciones, aunque diferente de la de mamíferos (84,000 D).

La actividad enzimática de la glutatión peroxidasa del cisticerco de T. crassiceps cepa ORF obtenida en el ensayo a pH 7 y a 37.C es en promedio del 80%.

La evaluación de la glutatión peroxidasa del cisticerco de T. crassiceps como posible antígeno para diagnóstico de la cisticercosis de T. solium es favorable pues los resultados positivos y negativos para la enfermedad en ELISA son iguales a los del EIT en el que se empleó esta enzima pura.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

Acevedo-Hernández, A. (1982) Economic impact of porcine cysticercosis. En: Cysticercosis: present state of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 63-67

Aluja, A.; Escobar, A.; Escobedo, F.; Flisser, A.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Madrazo, I.; Velázquez, V. y Willms, K. (1987) Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por "Taenia solium". Inst. Nal. de Salud Pública y Fondo de Cultura económica. México. 115pp

Aluja, A. and Vargas, G. (1988) The histopathology of Porcine Cysticercosis. Vet. Parasitol. 28:65-77

Barman, T.E. (1974) Glutathione Peroxidase. Enzyme Handbook. Supplement I. 136-137

Bielka, H.; Horecker, B.L.; Jakoby, W.B.; Karlson, P.; Keil, B.; Liebecq, B. and Webb, E.C. (1979) Enzyme Nomenclature. Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the International of Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Acad. Press. U.S.A. 606pp

Cheng, C.T. (1976) General Parasitology. Academic Press. New York. 965pp

Correa, D.; Tovar, A.; Espinosa, B.; Plancarte, A. y Flisser, A. (1989) Cisticercosis humana: Relación Inmunológica Huésped-Parásito. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagon, F. CONACYT y Limusa Noriega. México. 31-43

Feldman, M.; Plancarte, A.; Sandoval, M.; Wilson, M. y Flisser, A. (1990) Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene. 84:559-562

Flisser, A.; Woodhouse, E. y Larralde, C. (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin. exp. Immunol. 39:27-37.

Flisser, A. (1986) Cisticercosis humana. Epidemiología, diagnóstico e inmunología. Rev. UIS-Medicina. 14(1):51-60

Flohé, L. and Günzler, W.A. (1984) Assays of Glutathione Peroxidase. Methods in Enzymology. 105: 114-119

Freeman, R.S. (1962) Studies on biology of Taenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda) Can. J. Zool. 40:969-990

Fridovich, I. (1987) The biology of oxygen radicals: General concepts. En: Halliwell, B. Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of Brook Lodge Symposium. Augusta, Michigan, U.S.A. April 27 to 29, 1987. 1-5

Huberman, A. (1988) Biología de los radicales libres. En: Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. Bioquímica e Inmunología. Vol. II. UNAM. México. 353-363

Hunkapiller, M.W.; Lujan, E.; Ostrander, F. y Hood, E. (1983) Isolation of microgram quantities of protein from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Methods in Enzymology. 91:227-236

Jacoby, W.B. (1978) The glutathione s-transferases: A group of multifunctional detoxification proteins. En: Meister, A.; Wiley, J. and Sons, N.Y. Advances in enzymology and related areas of molecular biology. 384-414

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 22(15):680-685

Lamothe-Argumedo, R. (1983) Introducción a la Biología de los Platelminetos. AGT EDITOR, S.A. México. 143pp

Larralde, C.; Laclette, J.P.; Owen, C.; Madrazo, I.; Sandoval, M.; Bojalil, R.; Sciuto, E.; Contreras, L.; Arzate, J.; Díaz, M.L.; Govezensky, T.; Montoya, R.M. and Goodsaid, F. (1986) Reliable serology of Taenia solium cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(5):965-973

Larralde, C.; Sciutto, E.; Grun, J.; Díaz, M.L.; Govezensky, T. and Montoya, R.M. (1989) Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by *T. crassiceps*: influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination. En: Cañedo, E.; Todd, L.E.; Packer, L. and Jaz, J. Cell Fention and Disease. Plenum Publishing Corporation. 325-331

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

Larralde, C.; Sotelo, J.; Montoya, R.M.; Palencia, G.; Padilla, A.; Govezensky, T.; Díaz, M.L. and Sciutto, E. (1990) Immunodiagnosis of Human Cysticercosis in Cerebrospinal Fluid. Arch. Pathol. Lab. Med. 114:926-928

Larralde, C.; Sotelo, J.; Montoya, R.M.; Palencia, G.; Padilla, A.; Govezensky, T.; Díaz, M.L. and Sciutto, E. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: Antigens from murine *Taenia crassiceps* in ELISA and hemagglutination tests of cerebrospinal fluid and serum. Arch. Pathol. Lab. Med. En prensa.

Lawson, J.R. and Gemmell, M.A. (1983) Hydatidosis and cysticercosis. The dynamics of transmission. Act. Parasitol. 22:261

Leid, R.W. (1977) Immunity to the metacestode of *Taenia taeniaeformis* in the laboratory rat. Am Soc. Trop. Med. Hyg. 26(6):54-60

Leid, R.W. and Suquet, C.M. (1986) A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. Mol. Biochem. Parasitol. 18:301-311

Leid, R.W.; Suquet, C.M.; Bouwer, H.G.A. y Hinrichs, D.J. (1986) Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, taeniaestatin. J. Immunology. 137:2700-2702

Leid, R.W. Glutathione Peroxidase. En prensa.

Lehninger, A. (1987) Introducción a la Bioquímica. Ciencias por una educación popular. 1013pp

LeTrant, N.; Meshnick, S.R.; Kitcher, K.; Easton, J.W. y Cerami, A. (1983) Iron-containing superoxide dismutase from Crithidia fasciculata. Purification, characterization and similarity to leishmanial and y trypanosomal enzymes. J. Biol. Chem. 258:125-130.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Lewis-Farr, A. and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275

Machlin, L.J. y Bendich, A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. The FASEB J. 1(6):441-445

Malagon, F. (1989) Elementos del binomio taeniasis / cisticercosis. Una sintesis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagon, F. CCNACyT y Limusa Noriega. México. 3-6

Mahajan, R.C. (1982) Geographical distribution of human cysticercosis. En: Cysticercosis: present state of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C; Beltrán, F. Academic Press. New York. 39-46

Meglitsch, P.A. (1987) Zoología de los invertebrados. Ciencias por una educación popular. 906pp

Meshnick, S.R. y Easton, J.W. (1981) Leishmanial superoxide dismutase: A posible target for chemotherapy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102:970-976.

Meyer, T.S. and Lamberts, B.L. (1965) Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of paratid saliva proteins on acrilamide-gels strips. Biochim Acta. 107:144-145

Mills, G.C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229: 189.

Mills, G.C. (1959) The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes. J. Biol. Chem. 243 (3):502-506

Molinari, J.L.; Tato, P.; Aguilar, T. and Palet, A. (1988) Immunity in mice to oncosphere infection by using oncospherical antigens from Taenia solium from Taeniaeniarrhynchus saginatus. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 30:325-333

Murray, H.W. (1981) Susceptibility of leishmani to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. J. Exp. Med. 153: 1302-1315

Musoke, A.J.; Williams, J.F. y Lied, R.W. (1978) Immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. VI. The role of immediate hypersensitivity in resistance to reinfection. Immunology. 34: 565-570

Nieto, D. (1982) Historical notes on cysticercosis. En: Cysticercosis: present state of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 1-7

Pierce, S. and Tappel, L. (1978) Glutathione peroxidase activities from rat liver. Biochim Biophys. Acta. 523:27-36

Plagia, D.E. and Valentine, W. (1967) Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70(1):158-169

Plancarte, A.; Espinosa, B.; Flisser, A. (1989) Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana por el ensayo inmunoenzimático (ELISA). En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagon, F. CONACYT y Limusa Noriega. México. 159-163

Rabiela, M.T.; Rivas, A.; Rodríguez, J.; Castillo, S. and Cancino, F.M. (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: Cysticercosis: present state of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 179-200

Rabiela, M.T.; Rivas, A.; Castillo, S. y Gonzalez, A. (1985) Pruebas morfológicas de C. cellulosae y C. racemosus son larvas de Taenia solium. Arch. Invest. Med. 16:83-92

Rabiela, M.T.; Rivas, A. and Flisser, A. (1989) Morphological types of Taenia solium cysticerci. Parasitology today. 5(11):357-359

Sally, C.J.; Chau, J. and Freeman, R.S. (1976) Intraperitoneal passage of Taenia crassiceps in rats. J. Parasitol. 62(5):837-839

Sarti, E. (1989) Epidemiología de la teniasis/cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagon, F. CONACyT y Limusa Noriega. México. 233-242.

Schenone, H.; Ramirez, R. y Rojas, A. (1973) Aspectos epidemiológicos de la neurocisticercosis en América Latina. Bol. Chil. Parasitol. 28:61

Schenone, H.; Villarroel, F.; Rojas, A.; Ramirez, R. (1982) Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En: Cysticercosis: present state of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Lacleste, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C; Beltrán, F. Academic Press. New York. 25-38

Sciutto, E. (1990) Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por Taenia crassiceps al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por Taenia solium. Tesis doctoral. Colegio de Ciencias y Humanidades. UNAM.

Siebert, A.E. y Good, A. (1979) Taenia crassiceps: Effects of normal and immune serum on metacestodes in vitro. Exp. Parasitol. 48: 164-174

Stryer, L. (1985) Bioquímica. 2a. ed. Madrid-Barcelona. Reverté, S.A. 871pp.

Suquet, C.; Green-Edwards, C. and Leid, W. (1984) Isolation and partial characterization of Taenia taeniaeformis metacestode proteinase inhibitor. Inter. J. Parasitol. 14(2): 165-172

Taylor, A.E. (1963) Maintenance of larval Taenia crassiceps (Cestoda: Cyclophyllidea) in a chemical defined medium. Exp. Parasitol. 14: 304-310

Tappel, A.L. (1978) Glutathione Peroxidase and Hydroperoxides. Methods in Enzymology. 52:506-513

Towbin, H. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Biochemistry. 76(9):4350-4354

Tsang,V.; Brand,A. y Boyer,A.E. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (Taenia solium). J. Infections Diseases. 159 (1):50-59

Ulrich-Bergmeyer,H. (1974) Methods. of enzymatic of Analysis. Vol. I. Acad. Press,Inc. U.S.A. 565pp

Verster,A. (1971) Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of Taenia solium Linneaus,1758 and Taenia saginata Goeze,1782. Onderstepoort. J. Vet. Res. 38:63-64

Verster,A. (1974) The golden hamster as a definitive host of Taenia solium and Taenia saginata. Onderstepoort. J. Vet. Res. 23-28

Voller,A.; Bidwell,D.E. and Bartlett,A. (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organ. 53:55-65

Warholm,M.; Guthenberg,C.; von Bahr,C. and Mannervik,B. (1985) Glutathione transferases from human liver. Methods in Enzymology. 113:499-504

Wendel,A. (1981) Glutathione Peroxidase. Methods in Enzymology. 77:325-332

Willms,K. and Merchant,M.T. (1980) The inflamatory reaction surrounding Taenia solium larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunology. 2:261-275.

Woodhouse,E.; Flisser,A.; Larralde,C. (1982) Seroepidemiology human cysticercosis in Mexico. En: Cysticercosis: present state of Knowledge and Perspectives. Flisser,A.; Willms,K.; Laclette,J.P.; Larralde,C.; Ridaura,C; Beltrán,F. Academic Press. New York. 11-24

## IX. APÉNDICE.

### I. SOLUCIONES.

#### A) Procesamiento y homogenado de cisticercos.

##### Tris-HCl 0.1M pH 8.

|   |          |
|---|----------|
| Tris(hidroxiometil)aminometano (Sigma)                        | 12.1g    |
| Agua destilada desionizada                                    | 1000.0ml |
| Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl)<br>antes de aforar. |          |

##### Tris-HCl 0.01M pH 8.

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Tris-HCl 0.1M pH 8         | 100.0ml |
| Agua destilada desionizada | 900.0ml |

##### KCl - Tris-HCl.

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Cloruro de potasio (KCl) 3.0 M | 11.18g |
| Tris-HCl 0.01M pH 8            | 50.0ml |

#### B) Cromatografía de intercambio catiónico.

##### Tris-HCl 0.1M pH 8.

|  |          |
|--|----------|
| Tris(hidroxiometil)aminometano (Sigma)                     | 12.1g    |
| Agua destilada desionizada                                 | 1000.0ml |
| Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl) antes de aforar. |          |

##### Tris-HCl 0.01M pH 8.

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Tris-HCl 0.1M pH 8         | 100.0ml |
| Agua destilada desionizada | 900.0ml |

##### NaCl - Tris-HCl.

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Cloruro de sodio (NaCl) 0.5 M | 4.38g   |
| Tris-HCl 0.01M pH 8           | 150.0ml |

### C) Electroelusión

|  |          |
|--|----------|
| Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (J.T. Baker) 4M | 328.5g   |
| Agua destilada desionizada                                     | 1000.0ml |

#### Gel de poliacrilamida al 5%.

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Acrilamida 30% - Bis 0.8% (1) | 3.5 ml  |
| Tris-HCl 2M pH 6.8 (2)        | 0.65 ml |
| SDS 10% (3)                   | 0.1 ml  |
| Persulfato de amonio (6)      | 0.2 ml  |
| Agua destilada-desionizada    | 11.5 ml |
| TEMED (Bio-Rad)               | 10.0 ul |
| Mezclar y agitar.             |         |

#### (1) Acrilamida.

|   |         |
|---|---------|
| Acrilamida (Bio-Rad) 30%                                      | 30.0g   |
| N,N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 0.8%                   | 0.8g    |
| Agua destilada-desionizada                                    | 100.0ml |
| La acrilamida se almacena en frío (4°C) y cubierta de la luz. |         |

#### (2) Tris-HCl 2.0M pH 6.8.

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Tris(hidroximetil)aminometano      | 24.228g |
| Agua destilada-desionizada         | 100.0ml |
| Ajustar el pH con HCl concentrado. |         |

#### (3) Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad) al 10%

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Agua destilada-desionizada | 10.0g   |
|                            | 100.0ml |

#### (4) Persulfato de sodio (Bio-Rad)

|  |        |
|--|--------|
| Agua destilada-desionizada                 | 10.0mg |
|  | 1.0ml  |
| Se prepara inmediatamente antes de usarse. |        |

#### Solución madre para el amortiguador de corrida.

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| Tris(hidroximetil)aminometano        | 12.0g |
| Glicina (Sigma)                      | 57.6g |
| Aforar con agua destilada a 1000 ml. |       |

#### Amortiguador de corrida o solución de trabajo 5x a pH 8.5.

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Solución madre                       | 200.0ml |
| SDS al 10%                           | 8.0ml   |
| Aforar con agua destilada a 1000 ml. |         |

II. ENSAYO ENZIMÁTICO DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px). Plagia y Valentine (1967).

1. SOLUCIONES.

a) Amortiguador de fosfato de potasio, pH 7.

|  |         |
|--|---------|
| Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (J.T. Baker) 0.25M | 8.5g    |
| Etilendiamino-ácido tetracético (EDTA) (Sigma) 2.5mM               | 232.5mg |
| Azida de sodio ( $\text{N}_3\text{Na}$ ) (Sigma) 2.5mM             | 40.6mg  |
| Agua destilada   | 250.0ml |

b) Amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con DTT.

|  |         |
|--|---------|
| Amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 100.0ml |
| Ditioeritriol (DTT) (Bio-Rad) 1mM        | 15.43mg |

c) GSH-Px comercial.

|   |        |
|---|--------|
| Amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4$                        | 13.0ml |
| GSH-Px comercial (Sigma) con 500 unidades                       | 6.5mg  |
| Agitar.   |        |
| Hacer alicuotas de 100 ul (4 unidades) y congelar hasta su uso. |        |

Preparar en fresco:

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| d) <u>Glutati6n.</u> (GSH) (Sigma) | 3.07mg |
| Agua destilada desionizada         | 10.0ml |

e) Nicotinamida adenin dinucle6tido fosfato forma reducida (NADPH) (Sigma)

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Agua destilada desionizada | 8.33mg |
|                            | 10.0ml |

f) Per6xido de hidr6geno cumene ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Sigma)

|   |        |
|---|--------|
| Agua destilada desionizada                    | 42.5ul |
| Preparar en el momento justo antes de usarse. | 25.0ml |

g) GSH-Px para el control positivo.

|  |         |
|--|---------|
| Amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ con DTT | 1.9ml   |
| Alicuota GSH-Px                                  | 100.0ul |

h) Amortiguador de ensayo:

|  |       |
|--|-------|
| GSH                                      | 5.0ml |
| NADPH                                    | 5.0ml |
| Amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 5.0ml |

Glutación reductasa (GSSG) (Sigma) 60-70 unidades  
Aforar con agua destilada desionizada a un volumem de 20ml.

2. ENSAYO ENZIMÁTICO DE FRACCIONES PROTEÍCAS PROVINIENTES DE LA CIC..

1. Agregar en cada tubo 400ul de la solución "h", 200ul de la muestra, 300ul de la solución "b" y todo finalmente debe ajustar a 900ul.

2. Preparar el control negativo (Ve-) con 400ul de la solución "h" más 500ul de la solución "b".

3. Preparar el control positivo (Ve+) con 400ul de de la solución "h" más una unidad de GSH-Px en 500 ul de la solución "b".

4. Incubar a todos los tubos 10 ó 15 minutos en baño "María" a  $37^{\circ}\text{C}$ ; enseguida adicionar 100ul de la solución "f" recién preparada ,agitar e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

5. Leer en el espectrofotómetro a 366 nm con lámpara de luz ultravioleta, calibrar con el control positivo. Primero se lee el control negativo seguido por las fracciones. Si en las últimas se obtiene una densidad óptica igual o mayor al control negativo entonces estas fracciones no presentan actividad enzimática; pero si la densidad óptica es menor al control negativo entonces dichas fracciones si tienen actividad enzimática de la GSH-Px.

### III. CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS. MÉTODO DE LOWRY (1951).

Se obtiene una curva patrón disponiendo en el eje de las abscisas las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 ug/ml de albumina sérica bovina y en el eje de las ordenadas los valores de absorbancia a 600 nm de las concentraciones mencionadas una vez realizado el procedimiento que se describe más adelante, con estos valores se calcula la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación.

Para determinar las concentraciones de las proteínas problema, se prueban dos o tres volúmenes diferentes porque no se sabe la concentración de las mismas, en seguida se intereplan los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón.

#### 1. SOLUCIONES.

##### a) Amortiguador de fosfato de sodio (AFS) 10x.

|   |         |
|---|---------|
| Fosfato de sodio dibásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )   | 6.9g    |
| Agua destilada desionizada                                | 400.0ml |
| Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 7.1g    |
| Cloruro de sodio (NaCl)                                   | 43.8g   |
| Azida de sodio ( $\text{N}_3\text{Na}$ )                  | 0.2g    |

Medir pH 7 y aforar a 500 ml con agua destilada desionizada.

##### b) Amortiguador de fosfato de sodio (AFS) 1x.

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| AFS 10x                              | 100.0ml. |
| Aforar a 1 litro con agua destilada. |          |

##### c) Solución de Lowry.

|  |       |
|--|-------|
| Carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2% (2) en                    |       |
| hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N (1)   | 9.8ml |
| Tartrato de sodio y potasio 2% (3)   | 0.1ml |
| Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 1% (4) | 0.1ml |

|   |         |
|---|---------|
| (1) <u>Hidróxido de sodio (NaOH)</u> 0.1N | 0.4g    |
| Agua destilada desionizada                | 100.0ml |

|   |         |
|---|---------|
| (2) <u>Carbonato de sodio anhidro</u> ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2%                       | 2.0g    |
| Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N  | 100.0ml |
| (3) <u>Tartrato de sodio y potasio</u> 2%   | 2.0g    |
| Agua destilada desionizada  | 100.0ml |
| (4) <u>Sulfato de cobre pentahidratado</u> ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 1% | 1.0g    |
| Agua destilada desionizada  | 100.0ml |

d) Solución de Folin: Reactivo de Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) más agua destilada en una proporción de 1:1 de v/v.

## 2. PROCEDIMIENTO.

1. Agregar a cada tubo el volumen de muestra que se eligió, tanto de la curva patrón como de los experimentales y aforar a 1ml con AFS 1x. Incluir un tubo solamente con 1ml de AFS 1x como control o blanco .

2. A todos los tubos (curva patrón, experimentales y blanco) se les adiciona 4ml de la solución de Lowry; agitar.

3. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

4. Adicionar a todos los tubos rapidamente 0.4ml de la solución de Folin y agitar mucho.

5. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

6. Leer las densidades ópticas de los tubos en el espectrofotometro a 600 nm con lámpara de luz visible (VIS) calibrado a ceros con el blanco.

7. Graficar las densidades ópticas de la curva patrón e interpolar las experimentales en la misma. Calcular la concentración de la proteína por un mililitro, ejemplo:

Si la absorbancia obtenida es de 0.078nm en 20ul de la muestra de proteína, esta absorbancia se interpola con la curva patrón y la concentración que dé en la curva es la que se tiene en 20ul. Finalmente se hace una regla de tres para saber cuanto se tiene de proteína total de la muestra trabajada.

#### IV. ELECTROFORESIS (Laemmli, 1970).

##### 1. SOLUCIONES

| <u>Composición de los geles.</u> | <u>Gel separador</u><br>10 % | <u>Gel concentrador</u><br>5 % |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Acrilamida 30% - Bis 0.8% (1)    | 11.0 ml                      | 3.5 ml                         |
| Tris-HCl 2M pH 8.8 (2)           | 6.0 ml                       | ---                            |
| Tris-HCl 2M pH 6.8 (3)           | ---                          | 0.65 ml                        |
| SDS 10% (4)                      | 0.3 ml                       | 0.1 ml                         |
| Persulfato de amonio (5)         | 0.5 ml                       | 0.2 ml                         |
| Agua destilada-desionizada       | 11.2 ml                      | 11.5 ml                        |
| TEMED (Bio-Rad)                  | 30.0 ul                      | 10.0 ul                        |

Mezclar y agitar.

##### (1) Acrilamida.

|   |         |
|---|---------|
| Acrilamida (Bio-Rad) 30%                    | 30.0g   |
| N,N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 0.8% | 0.8g    |
| Agua destilada-desionizada                  | 100.0ml |

La acrilamida se almacena en frío (4 C) y cubierta de la luz.

##### (2) Tris-HCl 2.0M pH 8.8.

|  |         |
|--|---------|
| Tris(hidroximetil)aminometano (J.T. Baker) | 24.228g |
| Agua destilada-desionizada                 | 100.0ml |

Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

##### (3) Tris-HCl 2.0M pH 6.8.

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Tris(hidroximetil)aminometano | 24.228g |
| Agua destilada-desionizada    | 100.0ml |

Ajustar el pH con HCl concentrado.

##### (4) Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad) al 10 %

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Agua destilada-desionizada | 10.0g   |
|                            | 100.0ml |

##### (5) Persulfato de sodio (Bio-Rad)

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Agua destilada-desionizada | 10.0mg |
|                            | 1.0ml  |

Se prepara inmediatamente antes de usarse.

Mezcla para solubilizar proteínas.

|   |         |
|---|---------|
| SDS   | 100.0mg |
| Mercaptoetanol (Bio-Rad)  | 100.0ul |
| EDTA (Sigma)  | 7.4mg   |
| Glicerina (J.T.Baker)   | 1.0ml   |
| Tris-HCl 0.05M pH 6.8 (6) aforar a 10.0 ml                          |         |
| Azul de bromofenol (Bio-Rad) lo suficiente para que de color.       |         |
| El mercaptoetanol se agrega al descongelar cada alicuota (10ug/ml). |         |

(6) Tris-HCl 0.05M pH 6.8.

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| Tris(hidroximetil)aminometano      | 121.14mg |
| Agua destilada-desionizada         | 20.0ml   |
| Ajustar el pH con HCl concentrado. |          |

Solución madre para el amortiguador de corrida.

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| Tris(hidroximetil)aminometano        | 12.0g |
| Glicina (Sigma)                      | 57.6g |
| Aforar con agua destilada a 1000 ml. |       |

Amortiguador de corrida o solución de trabajo a pH 8.5.

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Solución madre                       | 200.0ml |
| SDS al 10%                           | 8.0ml   |
| Aforar con agua destilada a 1000 ml. |         |

Solución para teñir geles (Meyer y Lamberts, 1965).

|   |         |
|---|---------|
| Azul de Coomasie R-250 (Bio-Rad)  | 1.25g   |
| Metanol al 50% (7)  | 454.0ml |
| Ácido acético al 7% (8)   | 46.0ml  |
| Se filtra para evitar que los sedimentos del colorante se peguen a los geles. |         |

(7) Metanol al 50%.

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Metanol Absoluto (J.T. Baker) | 250.0ml |
| Agua destilada                | 250.0ml |

(8) Ácido acético al 7%.

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Ácido acético (J.T.Baker) | 3.5ml  |
| Agua destilada            | 46.5ml |

### Solución para desteñir geles.

|                |         |
|----------------|---------|
| Ácido acético  | 100.0ml |
| Agua destilada | 900.0ml |

### 2. PREPARACIÓN DE GELES EN LÁMINA.

1. Hacer gel el separador al 10%. El tiempo mínimo para polimerización es de una hora.

2. Hacer el gel concentrador al 5%, antes de que polimerice se coloca el peine que forma o no los carriles del gel. Si se va a preparar un gel analítico se usa un peine para formar varios carriles. Si se va a preparar un gel preparativo para transferencia se usa el peine para formar tres carriles, dos chicos y uno grande. La polimerización tarda una hora.

#### Preparación de muestras para correr la electroforesis.

Todos las muestras que se vayan a correr en los geles de 0.75mm de grosor deben tener aproximadamente 30 ug de proteína por carril, los volúmenes pueden variar pero sin pasar de 75 ul para un gel con 10 carriles.

3. Las muestras se colocan en tubos de vidrio de 5ml más la mezcla para solubilizar a las proteínas en una proporción de 1:1 de v/v. Si se requiere un gel reductor se le agrega mercaptoetanol a la mezcla para solubilizar a las proteínas. A todos los geles se les debe poner en uno de sus carriles el control de peso molecular con la mezcla para solubilizar proteínas en condiciones reducidas. Los tubos se tapan, se sellan con papel adhesivo y se ponen en baño "María" durante 5 minutos.

2. Colocar las muestras en los carriles del gel. A los carriles que queden sin muestras se le agregan un poco de la mezcla para solubilizar a las proteínas. Llenar todos los carriles con amortiguador de corrida para electroforesis.

3. Correr las muestras en el gel concentrador a 40 mA y en el separador a 100 mA a 4°C.

4. Al terminar la electroforesis se tiñe al gel con azul de Coomassie; se deja por lo menos 6 horas o toda la noche.

5. Desteñir el gel con ácido acético al 10%; se le hacen los cambios necesarios hasta quedar totalmente transparente y con las bandas de proteína bien definidas.

V. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA). Voller, 1976.

1. SOLUCIONES.

a) Amortiguador de carbonatos.

|   |        |
|---|--------|
| Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (J.T.Baker) 0.03M | 0.159g |
| Ácido carbónico ( $\text{NaHCO}_3$ ) (J.T.Baker) 0.69M            | 0.293g |
| Azida de sodio ( $\text{N}_3\text{Na}$ ) 0.0061M                  | 0.02g  |
| Aforar a 50ml con agua destilada-desionizada, a pH 9.6.           |        |

b) APS-Tween 20.

|  |       |
|--|-------|
| NaCl 0.015M  | 16.0g |
| Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.0014M | 0.4g  |
| Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.02M      | 5.8g  |
| KCl 0.0026M  | 0.4g  |
| $\text{N}_3\text{Na}$ 0.0061M                                      | 0.4g  |
| Tween 20 (Sigma) 0.05%   | 1.0ml |
| Aforar a 2 litros con agua destilada-desionizada, a pH 7.2.        |       |

Amortiguador de dietanolamina al 10%.

|   |         |
|---|---------|
| Agua destilada-desionizada  | 800.0ml |
| $\text{N}_3\text{Na}$   | 0.2g    |
| Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T.Baker) | 100.0mg |
| Dietanolamina (Sigma)   | 97.0 ml |
| Ajustar el pH a 9.8 con HCl 1N.   |         |
| Guardar a 4 C y protegido de la luz.  |         |

Substrato.

|  |        |
|--|--------|
| Agua destilada-desionizada   | 5.0ml  |
| Fosfatasa alcalina (Sigma)   | 20.0mg |
| Amortiguador de dietanolamina  | 15.0ml |
| El amortiguador de dietanolamina debe estar a temperatura ambiente, se prepara la solución antes de agragarse a cada uno de los pozos. |        |

## 2. PROCEDIMIENTO DE ELISA.

1. En cada pozo (Inmulon II) de la placa colocar 100ul de antígeno a una concentración de 1ug/ml en amortiguador de carbonatos. Incubar a 4°C toda la noche.

2. Lavar tres veces los pozos con AFS-Tween 20 cada 5 minutos.

3. Incubar por dos horas a 37°C 100ul por pozo del primer anticuerpo (suero o IgG) dilución 1:1000.

4. Lavar tres veces los pozos con AFS-Tween 20 cada 5 minutos.

5. Incubar durante dos horas a 37°C 100ul por pozo del conjugado (anti-IgG acopladas con fosfatasa alcalina) diluida 1:1000 en AFS-Tween 20.

6. Lavar tres veces los pozos con AFS-Tween 20 cada 5 minutos.

7. Incubar durante 30 minutos a 37°C 100ul por pozo del sustrato (Sigma 104 p-nitrofenil fosfato disodio) que se prepara en el amortiguador de dietanolamina al 10%.

8. Leer la placa en el espectrofotómetro (Bio-Rad, Modelo 2550 lector ELISA) con un filtro de 405 nm.

V. ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (EIT). Towbin, 1979; y Tsang y col., 1986.

#### A) ELECTROFORESIS.

Todas las soluciones y amortiguadores son los mismos que se indican en la parte de electroforesis.

Gel preparativo de transferencia.

1. Preparar el gel separador al 10 % de 0.75mm de grosor.

2. Hacer el gel concentrador al 5 %, antes de polymerizar se coloca el peine que forma tres carriles, dos chicos y uno grande. La polymerización tarda una hora.

Preparación de muestras

3. Las muestras se colocan en tubos de vidrio de 5 ml más la mezcla para solubilizar proteínas en una proporción de 1:1 de v/v, no deben de sobrepasar de 800 ul para el carril grande. Todos los geles deben de llevar en los carriles chicos el control de peso molecular bajo con la mezcla para solubilizar proteínas con mercaptoetanol en la misma proporción. Los tubos se tapan, se sellan con papel adhesivo y se ponen en baño "María" durante 5 minutos.

4. Colocar las muestras en los carriles del gel. Llenar todos los carriles con amortiguador de corrida para electroforesis.

5. Correr las muestras en el gel concentrador a 40 mA y en el separador a 100 mA a 4°C.

6. Cortar un extremo del gel abarcando el control de peso molecular y parte de la muestra.

7. Teñir el gel con azul de Coomassie. Se puede dejar por seis horas o toda la noche.

8. Desteñir el gel con ácido acético al 10 %; hacer los cambios necesarios hasta que quede totalmente transparente y con las bandas de proteína bien definidas.

## B) TRANSFERENCIA DEL GEL A PAPEL DE NITROCELULOSA.

### 1. SOLUCIONES.

#### a) Amortiguador de transferencia.

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Tris(hidroximetil)aminometano 0.025M | 3.0 g   |
| Glicina 0.192M                       | 14.48g  |
| Metanol al 20%                       | 200.0ml |

Aforar con agua destilada-desionizada a 1 litro y ajustar a un pH de 8.3.

#### b) Amortiguador de fosfato de (AFS) 1x.

|   |          |
|---|----------|
| AFS 10x (1)   | 100.0ml. |
| Aforar a 1 litro con agua destilada.                      |          |
| (1) Amortiguador de fosfato de sodio (AFS) 10x.           |          |
| Fosfato de sodio dibásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )   | 6.9g     |
| Agua destilada desionizada                                | 400.0ml  |
| Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 7.1g     |
| Cloruro de sodio (NaCl)                                   | 43.8g    |
| Azida de sodio ( $\text{N}_3\text{Na}$ )                  | 0.2g     |

Medir pH 7 y aforar a 500ml con agua destilada desionizada.

### 2. PROCEDIMIENTO.

1. Cortar el papel de nitrocelulosa del tamaño del gel y empaparlo con amortiguador de transferencia.

2. Empapar las fibras, rejillas y papel filtro con amortiguador de transferencia.

3. Colocar en el siguiente orden en la cámara de transferencia con amortiguador: dos rejillas, electrodo negativo, una rejilla, fibra, papel filtro grueso, gel, papel de nitrocelulosa, papel filtro grueso, fibra, rejilla, electrodo positivo, tres fibras y la tapa de la cámara. En caso de que sean dos geles se coloca después del segundo papel filtro grueso, fibra, papel filtro grueso, gel, papel de nitrocelulosa, papel filtro grueso, fibra, se termina en el mismo orden.

4. Poner la cámara en su caja y conectar los electrodos a la fuente de poder. Correr la transferencia una hora a 1 ampere.

Para asegurar que se realizó adecuadamente la transferencia del gel al papel se corta una tira del papel de nitrocelulosa de 2x10cm se tiñe con amido negro , tinta china o india, y se destiñe con AFS 1x.

5. Guardar el papel de nitrocelulosa con el amortiguador de transferencia o en AFS 1x en congelación colocado entre dos papeles filtro gruesos en una bolsa de plástico, descongelar hasta su uso.

### C) REACCIÓN CON ANTICUERPOS (Tsang y col., 1986).

#### 1. SOLUCIONES.

##### a) Amortiguador de fosfato de sodio (AFS).

Preparar dos soluciones como sigue:

A. Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.01M 1.3799g

Cloruro de sodio (NaCl) 0.15M 8.766 g

Aforar con agua destilada-desionizada a un litro.

B. Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 2.6807g

Cloruro de sodio 0.15M 8.766 g

Aforar con agua destilada-desionizada a un litro.

Combinar y mezclar las soluciones A y B (aproximadamente 5 partes de solución A por 6 partes de solución B) hasta alcanzar un pH de 7.2. Esterilizar el AFS para esterilizar o usarlo inmediatamente.

##### AFS-Tween 0.3%.

AFS 1000.0ml

Tween 20 (Sigma) 3.0ml

Adicionar el Tween 20 lentamente y con agitación constante. Preparar en fresco.

##### AFS-Tween 20 al 0.3% - leche descremada al 5% (AFS/T/L).

AFS 100.0ml

Tween 20 0.3ml

Leche descremada 5.0g

Mezclar con agitador magnético de 10 a 15 minutos hasta disolverse.

Conjugado:

Dilución de 1:1000

|              |      |    |    |    |    |     |
|--------------|------|----|----|----|----|-----|
| No. de tiras |      | 16 | 35 | 55 | 75 | 95  |
| AFS/T        | (ml) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Conjugado    | (ul) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50  |

Conjugado:

Dilución de 1:2000

|              |      |    |    |    |    |    |
|--------------|------|----|----|----|----|----|
| No. de tiras |      | 16 | 35 | 55 | 75 | 95 |
| AFS/T        | (ml) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Conjugado    | (ul) | 5  | 10 | 15 | 20 | 25 |

Solución madre del sustrato (50 mg/ml).

AFS 20.0ml

3,3'Diaminobenzodina (DAB) (Sigma) 1.0g

Agitar durante 30 minutos.

Precaución: DAB es carcinogénico, usar guantes y tapabocas.

Solución madre de peróxido de hidrógeno al 3%.

H O 30.0ml

Agua destilada-desionizada 70.0ml

Diluir en un recipiente de plástico y no se debe utilizar en la solución madre.

Advertencia: en caso de que el H O caiga en la piel, lavarse con el chorro de agua fría.

Peróxido de hidrógeno (H O) al 3%.

H O al 30% 100.0ul

AFS 900.0ml

Diluir en un frasco de plástico de 1.5 ml y agitar en un vortex.

Sustrato DAB.

|                                      |      |     |     |     |     |     |
|--------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| No. de tiras                         |      | 25  | 35  | 45  | 55  | 65  |
| AFS                                  | (ml) | 15  | 20  | 25  | 30  | 35  |
| Sol. madre DAB                       | (ul) | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% | (ul) | 15  | 20  | 25  | 30  | 35  |

Preparar en fresco.

**Procedimiento:**

1. Descongelar el papel de nitrocelulosa, cortar tiras de 8 x 0.3 cm a temperatura ambiente.

2. Preparar AFS/T/L necesario para las diluciones de los sueros; cada tira requiere de 0.5ml de solución por suero diluido.

| Dilución | Suero   | AFS/T/L |
|----------|---------|---------|
| 1:10     | 100.0ul | 900.0ul |
| 1:100    | 10.0ul  | 990.0ul |
| 1:500    | 2.0ul   | 998.0ul |
| 1:1000   | 1.0ul   | 999.0ul |

3. En cada uno de los canales de la placa se adicionan 0.5ml de la dilución que le corresponde; colocar en estas las tiras de nitrocelulosa. Incubar durante dos horas a temperatura ambiente en un agitador de columpio de manera constante.

4. Lavar cuatro veces con AFS/T cada cinco minutos.

5. Agregar 500 ul del conjugado en cada una de los carriles de la placa, incubar por una hora a temperatura ambiente en un agitador de columpio.

6. Lavar cinco veces cada cinco minutos con AFS/T las primeras tres veces y los dos siguientes con AFS.

7. Adicionar 500 ul de sustrato de DAB en cada uno de los carriles de la placa. Inmediatamente después de que se observa la reacción se detiene ésta lavando con AFS cuatro o cinco veces. Todo en agitación constante y temperatura ambiente.

8. Colocar las tiras de nitrocelulosa en dos papeles filtro y aplastarlos para que se sequen y puedan guardarse a temperatura ambiente entre una mica transparente y evitar que se rompan.

## X. GLOSARIO.

**ANTICUERPO:** proteína creada por las células plasmáticas a causa de estímulos de antígenos.

**ANTÍGENO:** cualquier molécula o sustancia extraña al organismo que sea capaz de estimular una respuesta inmune.

**ARACNOIDITIS:** inflamación de la meninge aracnoideas.

**CATALIZADOR:** sustancia que modifica la velocidad de una reacción enzimática sin que tome parte de ella misma.

**CÉSTODO:** término propuesto por Rudolphi en 1808, se deriva del latín "cestus" que es cinta y hace referencia al aspecto típico de estos organismos, cuyo cuerpo es aplanado dorsoventralmente, puede dividirse de manera general en tres regiones: escólex, cuello y estróbilos.

**CISTICERCO:** forma larval del gusano plano con escólex dentro de una vesícula.

**CISTICERCOSIS:** enfermedad causada por el establecimiento de las formas larvales de *Taenia solium* en los tejidos de sus hospederos intermediarios, el cerdo y el hombre.

**CUELLO:** parte de la tenia situado inmediatamente después del escólex, es la zona no segmentada del cuerpo del parásito y produce, por septación transversal los proglótidos que componen el estróbilos.

**DISMUTAR:** es la oxidación del radical superóxido resultado del peróxido de hidrógeno y el oxígeno.

**ENZIMA:** es una proteína que cataliza, o acelera, una reacción termodinamicamente posible.

**ESCÓLEX:** órgano con el que el parásito se adhiere a la mucosa intestinal de su hospedero definitivo, presenta varias estructuras de fijación como las ventosas y los ganchos.

**ESPECIFICIDAD:** es el porcentaje obtenido de los individuos sanos detectados como negativos con respecto al número total de sanos.

No. Ind. Sanos negativos a la prueba

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{-----}}{\text{No. Total de individuos sanos}} \times 100$$

**ESTRÓBILO:** parte de la tenia que está constituido por un número variable de segmentos que aumentan su grado de madurez a medida que se alejan del cuello; los más cercanos a éste son los inmaduros, a continuación los proglótidos maduros en los que se observan los órganos reproductores completamente desarrollados. En la porción final del estróbilos se localizan los segmentos grávidos que con los huevos embrionados.

**HIDROCEFALÍA:** acumulación anómala de líquidos serosos en la cabeza.

**HIPERTENSIÓN:** aumento de la presión.

**HOSPEDERO:** es aquel organismo que es invadido por un parásito.

**HOSPEDERO INTERMEDIARIO:** es el organismo en donde se desarrollan las fases asexuales de un parásito o existen formas inmaduras de los mismos; el parásito no alcanza la madurez sexual.

**HOSPEDERO DEFINITIVO:** es el organismo en el que el parásito adquiere la madurez sexual.

**METACÉSTODO:** larva del céstodo.

**NEUROCISTICERCOSIS:** cisticercosis en el sistema nervioso central.

**NICHO:** en parasitología es la localidad definida en donde se da una enfermedad. El nicho es el resultado de la combinación única de factores ecológicos que favorecen el mantenimiento y transmisión del organismo productor de la enfermedad.

**OXIDACIÓN:** en transferencia de electrones es la pérdida de electrones.

**PARÁSITO:** es un organismo que depende de su hospedero para la síntesis de uno o más nutrientes esenciales para su metabolismo, por lo que requiere de enzimas del hospedero.

**PROGLÓTIDO:** segmento del estróbilo de los céstodos.

**REACCIÓN CRUZADA:** reacción antígeno-anticuerpo en donde el anticuerpo reacciona también con determinante(s) antigénico(s) muy parecidos al determinante antigénico específico.

**RADICAL LIBRE:** es una molécula que posee un número impar de electrones y tiene carga.

**REDUCCIÓN:** en la transferencia de electrones es la ganancia de electrones.

**SENSIBILIDAD:** es porcentaje obtenido de enfermos detectados por una prueba diagnóstica con respecto al número total de enfermos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{No. Enfermos Positivos a la Prueba}}{\text{No. Total de enfermos}} \times 100$$

**TENIASIS:** es una enfermedad causada por el establecimiento de la forma adulta de Taenia solium en el intestino de su hospedero definitivo, el hombre.