



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Disminución de la viabilidad de *Taenia crassiceps* y
aumento en la expresión del ARNm de Peroxiredoxina
(Prx) por estrés oxidativo”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
FELIPE VACA PANIAGUA



MEXICO, D. F.
EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

NOVIEMBRE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Abel Gutiérrez Ramos
Vocal:	Felipe Cruz García
Secretario:	Abraham Landa Piedra
1er suplente:	Bertha Espinoza Gutiérrez
2do suplente:	Nayelli Nájera García

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra. Este trabajo de Investigación fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN210603, "Enzimas del metabolismo detoxificante blancos para el desarrollo de nuevos inhibidores contra *Taenia solium*".



Dr. Abraham Landa Piedra
Asesor



Felipe Vaca Paniagua
Sustentante

A Gloria, Sergio y Moisés

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente al Dr. Abraham Landa Piedra por el apoyo, la infinita paciencia y todo el tiempo que me concedió en charlas interminables. Sus observaciones y recomendaciones han sido claves en mi formación. Agradezco, con toda sinceridad, la amistad y la confianza.

También quiero agradecer al profesor Abel Gutiérrez Ramos y al Dr. Felipe Cruz García, mis sinodales, por las finas precisiones a mi trabajo.

Debo mucho a mis compañeros de trabajo, Biol. Alicia Ochoa, Dra. Lucía Jiménez, Biol. Alejandro Castellanos, Biol. María Antonieta, por haberme entrenado y asistido en el uso de las técnicas y métodos de investigación que usé, así como por atender mis dudas al momento. De igual modo, debo al Dr. Juan Molina por prestarme su laboratorio y reactivos sin limitantes.

Quiero hacer una mención especial a mis queridos amigos, Víctor, Rodrigo, Anayetsin, Resnick, Miss Clau, Carlos y Roy por soportarme en el trance hipnótico, penetrante neurosis, de la *tramitología* de mi titulación (“37 sencillos pasos”), y por brindar consejo indispensable.

A Maribel, Iaraset, Hugo, Isela, Richi, por su amistad incondicional.

Al inmortal, por su temple.

A Rodolfo y Nacho por las gustosas reflexiones científicas.

A Sofia, por todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Epidemiología	10
1.2 <i>Taenia solium</i>	11
1.2.1 Clasificación	11
1.2.2 Morfología externa.....	11
1.2.3 Morfología interna	13
1.2.4. Ciclo de vida.....	15
1.2.5 Manifestaciones clínicas.....	18
1.2.5.1 Teniosis.....	18
1.2.5.2 Cisticercosis.....	18
1.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	19
1.4 Diagnóstico	19
1.4.1 Teniosis	19
1.4.2 Cisticercosis	20
1.5 Tratamiento	21
1.6 Medidas de control.....	22
1.7 Estrés oxidativo	22
1.8 Peroxiredoxinas	24
1.8.1 Estructura y clasificación de las peroxiredoxinas	25
1.8.2 Mecanismo de reacción	27
1.8.3 Principales funciones de las peroxiredoxinas	30
1.9 Modelo murino de <i>Taenia crassiceps</i>	31
2 HIPÓTESIS	32
3 OBJETIVO GENERAL	32
Objetivos particulares	32
4 MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1 Material biológico.....	33
4.2 Oxidación ferrosa con anaranjado de xilenol versión 1.....	34
4.3 Cultivos.....	34
4.5 Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Implementación del modelo cisticercosis en ratón	36
5.2 Hidroperóxido de cumeno en medio RPMI.....	37
5.3 Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad del parásito.....	40
5.4 Efecto del tiempo post-infección sobre la viabilidad de cisticercos sometidos a estrés oxidativo	42
5.5 Recuperación de los parásitos por supresión del insulto oxidativo	44
5.6 Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión del ARNm de la Prx 2-Cys.....	45
6 DISCUSIÓN.....	48
7 CONCLUSIONES.....	52

8 PERSPECTIVAS.....	52
9 ANEXOS	53
I. Esquemas de las diluciones empleadas en los ensayos de detección de peróxido por el método FOX-1	53
II. Secuencia del transcrito de la Prx 2-Cys.....	54
III. Curva de ADNc puro amplificado para la Prx 2-Cys ($R^2 = 0.9924$).....	55
REFERENCIAS	56

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aa	Aminoácidos
Act	Actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
°C	Grados Celsius
CAT	Catalasa
Cys	Cisteina
DEPC	Dietilpirocarbonato
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FOX-1	Oxidación ferrosa con anaranjado de xilenol versión 1
g	Constante de la gravedad
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
HCu	Hidroperóxido de Cumeno
kDa	Kilo Daltones
min	minutos
µg	Microgramos
µM	Micromolar
mM	Milimolar
µL	Microlitro
mL	Mililitro
PBS	Amortiguador de fosfatos Salina pH 7.4
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Prx	Peroxiredoxina
P.S.	Péptido señal
PX	Peroxidasa
R	Coficiente de correlación
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SOD	Superóxido dismutasa
U	Unidades

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica del escólex de <i>Taenia solium</i>	12
Figura 2. Escólex, cuello y estróbilo de <i>T. solium</i>	13
Figura 3. Fase adulta de <i>T. solium</i>	13
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	16
Figura 5. Micrografía electrónica de un huevo con oncósfera de <i>T. solium</i>	17
Figura 6. Cisticerco de <i>T. solium</i>	17
Figura 7. Reacciones catalizadas por enzimas antioxidantes.....	25
Figura 8. Mecanismo de reacción de las Peroxiredoxinas.....	29
Figura 9. Curva patrón de hidróperóxido de cumeno (H ₂ O ₂) en H ₂ O y en medio RPMI empleando el método de detección colorimétrica FOX-1.....	39
Figura 10. Determinación de H ₂ O ₂ 10 μM disuelto en RPMI a diferentes tiempos.....	39
Figura 11. Gel de agarosa al 1% mostrando la expresión por RT-PCR del efecto del H ₂ O ₂ sobre los ARNm para las Prx 2-Cys y Actina.....	45
Figura 12. Gráfica de la medición semicuantitativa del efecto del H ₂ O ₂ sobre la expresión de los ARNm para las Prx 2-Cys y Act por RT-PCR.....	47

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar si las larvas de *Taenia crassiceps* incrementan la expresión del ARNm para la peroxiredoxina 2-Cys ante el insulto oxidativo provocado por el hidroperóxido de cumeno. Las peroxiredoxinas son proteínas que reducen e inactivan peróxidos generados por estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un mecanismo de defensa importante del hospedero contra los cestodos. En contraste, los sistemas antioxidantes participan en la sobrevivencia de estos parásitos. Debido al impacto en salud y economía que la teniosis y la cisticercosis tienen en México, es importante conocer como se expresan los genes de estos parásitos. Asimismo, la dificultad para obtener cisticercos de *Taenia solium* y su gran similitud biológica y bioquímica con *T. crassiceps* hacen importante el estudio de esta última, por lo que se empleó el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* en ratón para obtener cisticercos. Los cisticercos se cultivados *in vitro*, para estudiar su viabilidad a diferentes tiempos y concentraciones de hidroperóxido de cumeno. Se observó que los cisticercos de *T. crassiceps* resisten 2.5 mM de hidroperóxido de cumeno por 30 minutos. En ratones con infecciones mayores a 5 meses siempre existe una población de cisticercos capaz de sobrevivir a la respuesta del hospedero, sin embargo estos también fueron muertos por la dosis de 2.5 mM de hidroperóxido de cumeno. El hidroperóxido de cumeno incrementa la expresión del ARNm para la peroxiredoxina 2-Cys en cisticercos de *T. crassiceps*. Este es el primer estudio en cisticercos de *T. crassiceps* en donde se demuestra el efecto que tiene el hidroperóxido de cumeno sobre la viabilidad y la expresión de un ARNm específico para la peroxiredoxina 2-Cys.

Puesto que las tenias carecen de otras enzimas para inactivar peróxidos, nuestros resultados muestran que la peroxiredoxina 2-Cys es importante en esta labor en estos parásitos.

1 INTRODUCCIÓN

Las parasitosis son un serio problema de salud pública principalmente en los países en desarrollo como México. Debido a la situación socioeconómica que priva en estos lugares, en la que existen pobres condiciones educativas, sanitarias e higiénicas, además de ciertas condiciones culturales que favorecen la existencia, reproducción y diseminación de muchas enfermedades, sobresaliendo las parasitarias.¹

Las enfermedades que ocasiona el parásito *Taenia solium* son la teniosis y la cisticercosis. Ambas prevalecen en muchas regiones de nuestro país. Estas parasitosis tienen un impacto socioeconómico importante debido a la morbilidad crónica que producen, la disminución en la productividad de las personas afectadas y los costos médicos del diagnóstico y tratamiento.²

1.1 Epidemiología

Las infecciones por este céstodo son muy comunes en países en desarrollo, así como en países desarrollados, particularmente en zonas rurales debido a la migración de poblaciones de países pobres a ricos.³ En los pueblos endémicos más del 10% de la población presenta anticuerpos contra el parásito y esta proporción puede alcanzar hasta el 25%. Es muy frecuente encontrar reacciones seropositivas transitorias y casos de neurocisticercosis asintomáticos determinados por el número de parásitos, el estado inmune del hospedero, la edad al momento de la infección o una combinación de esos factores. La cría doméstica de cerdos es un factor característico en la prevalencia de la cisticercosis y la

teniosis. Muchos granjeros en países en desarrollo no pueden pagar una vaca pero pueden comprar cerdos. Estos animales son baratos y comercializables, lo que los convierte en una fuente conveniente de carne y dinero. Además, no se necesita invertir en ellos debido a que los cerdos están libres comiendo basura y materia fecal. Los grados de infección porcina varían en lugares endémicos entre 30-60% de animales seropositivos.⁴

1.2 *Taenia solium*

1.2.1 Clasificación

El parásito *Taenia solium* tiene la siguiente clasificación taxonómica. Reino: Animalia; Phylum: Plathelminthes; Clase: Cestoidea; Orden: Cyclophyllidea; Familia: Taeniidae; Género: *Taenia*; Especie: *solium*.

1.2.2 Morfología externa

El adulto puede dividirse en tres regiones anatómicas comenzando desde su cabeza hasta el final de su cuerpo:

a) *Escólex* o cabeza (Figura 1) es el órgano de fijación al intestino, mide aproximadamente 1 milímetro de diámetro, tiene cuatro ventosas y una doble corona con 22-34 ganchos de 0.110 y 0.180 mm de largo que se adhieren a la mucosa del yeyuno, en el intestino delgado.

b) *Cuello* (Figura 2), es la zona de tejido indiferenciado situado inmediatamente después del escólex; es la zona no segmentada del cuerpo del parásito y produce por septación transversal a los proglótidos, que componen el estróbilo; de ahí que la infección persista mientras el escólex y el cuello permanezcan unidos a la pared del intestino del hospedero.⁵

c) *Estróbilo* o cuerpo (Figura 3) es largo y variable, mide 2-7 m y está compuesto de varios segmentos o proglótidos que se extienden por el ileon.⁶ Los proglótidos se clasifican, dependiendo de su cercanía con el escólex, en inmaduros, maduros y grávidos. Los proglótidos crecen a partir del cuello siendo los primeros inmaduros, en donde apenas se distinguen las formas celulares que originarán a los órganos reproductores femeninos y masculinos que alberga cada segmento. Después siguen los proglótidos maduros, son de forma cuadrangular, en ellos se observan los órganos reproductores completamente desarrollados conteniendo entre 150 y 200 testículos. Finalmente aparecen los proglótidos grávidos o fecundados que son de forma rectangular. Los proglótidos grávidos contienen $50-60 \times 10^3$ huevos fértiles dispuestos en 7-13 ramas uterinas que ocupan casi su totalidad.⁷



Figura 1. Micrografía electrónica del escólex de *Taenia solium*. Tomado de <http://www.inzine.sk/article.asp?art=9139>



Figura 2. Escólex, cuello y estróbilo de *T. solium*. Tomado de <http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/slides/Lab4d>

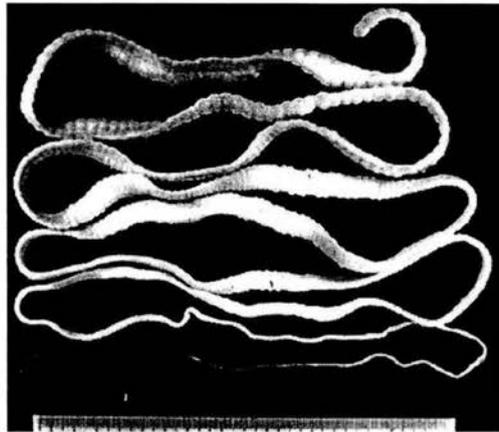


Figura 3. Fase adulta de *T. solium*. Tomado de: <http://www.inzine.sk/article.asp?art=9139>

1.2.3 Morfología interna

Los céstodos carecen de sistema digestivo, en su lugar poseen una superficie externa de gran importancia fisiológica, con actividad metabólica, a través de la cual absorben selectivamente, ya sea por difusión o por transporte activo, las sustancias que requieren para

su nutrición.⁸ Este tejido llamado tegumento, o cubierta externa del cuerpo, es un sincicio anucleado cubierto de extensiones citoplásmicas en forma de microvellosidades variables en tamaño y número que cubren toda la superficie del parásito, amplificando su área de absorción. El tegumento contiene enzimas y sistemas específicos para el transporte de moléculas e iones. Por otra parte, es un órgano de protección empleado en la locomoción. El elemento más externo del tegumento es el glicocálix, una cubierta protectora que inactiva algunas enzimas del hospedero y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos⁹. Una característica común es la presencia de cuerpos calcáreos. Debajo del tegumento se ubica una capa de músculos longitudinales y circulares no estriados.²

El parénquima tiene la función de sostén, también es considerado como centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno y otras proteínas. Es un tejido sincitial y fibroso que limita el tegumento en el que se encuentran incluidos los órganos del aparato reproductor, excretor y los del sistema nervioso, así como dos paquetes de fibras musculares que dividen el parénquima en dos zonas, la cortical y la medular.

El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios cerebroides en el escólex unidos mediante comisuras transversas. De los ganglios cerebroides salen cuatro cordones nerviosos amielínicos; dos anteriores que inervan el escólex y dos posteriores que corren a lo largo del estróbilo, inervándolo totalmente y conectándose por medio de comisuras transversas interproglótideas. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones laterales. Algunos de los neuropéptidos descritos de importancia en la transmisión de estímulos nerviosos en estos parásitos son la serotonina y la acetilcolina.²

La osmoregulación y la excreción dependen de un sistema protonefridial, con 2 pares de canales laterales y conexiones transversas. El aparato excretor está formado por células

flamígeras, dispuestas en grupos de cuatro en el extremo libre de los túbulos. Estos últimos son prolongaciones capilares de los túbulos colectores que contienen moléculas solubles como la urea. Por lo general son cuatro, dos dorsolaterales y dos ventrolaterales. Todos corren paralelamente a lo largo del estróbilo uniéndose a nivel del escólex. Los ventrales se conectan entre sí en el extremo posterior de cada segmento por medio de un tubo transversal.

1.2.4. Ciclo de vida

La *Taenia solium* es hermafrodita y tiene tres estadios: huevo, larva (cisticerco) y adulto. Su ciclo de vida se compone de dos hospederos (Figura 4). El adulto o Tenia que se desarrolla en el humano, algunas especies de simios y hamsters, causando la teniosis. El gusano causa únicamente una inflamación ligera en el lugar de implantación.¹⁰ La fase larvaria o cisticerco, se desarrolla en cerdos, humanos, algunas especies de simios, camellos, osos, perros, gatos y otros carnívoros y roedores, causando una parasitosis más peligrosa, la cisticercosis.¹¹

Los huevos de *Taenia solium* (Figura 5) son de forma esférica y miden 30-40 μm , en su interior alojan un embrión hexacanto llamado oncósfera. Los huevos se liberan de un proglótido excretado que ha sido roto en las heces y pueden sobrevivir en el ambiente por meses. El cerdo, el hospedero intermedio, frecuentemente ingiere los huevos en la materia fecal. La capa que cubre a la oncósfera, llamada embrióforo, está compuesta de tabiques de queratina y de un material cementante que los une. El embrióforo se rompe al contacto con el ácido clorhídrico, enzimas digestivas y la bilis en el intestino delgado, liberando a la oncósfera. Las oncósferas se adhieren al duodeno, penetran la pared intestinal y pasan a los capilares venosos o a las vesículas linfoides mesentéricas en aproximadamente 30 minutos.

Los parásitos son transportados y pueden establecerse en el tejido muscular, el cerebro, los ojos, riñones, hígado, etc.¹² Se instalan y comienzan a desarrollarse en forma de cisticerco (Figura 6), hasta alcanzar un tamaño final de aproximadamente 1 cm de diámetro en 2-3 meses.¹³ Cada cisticerco consta de una vesícula llena de fluido transparente y un escólex invaginado con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos. La superficie externa de la larva es un tejido tegumentario similar al del adulto con microvellosidades que protegen del contacto directo con el tejido del hospedero. El tejido del parásito muerto es reabsorbido lentamente dejando una concreción calcificada en el tejido muscular y cerebral.

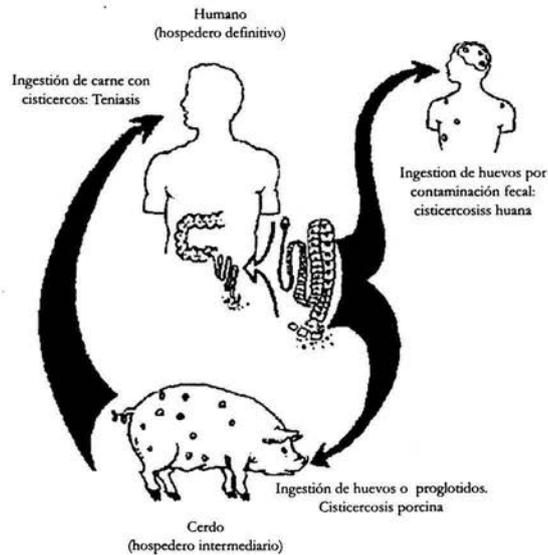


Figura 4. Ciclo de vida de *T. solium*. *Adaptado de ³³.

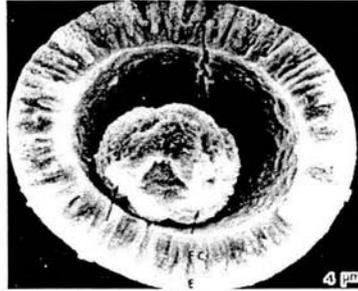


Figura 5. Micrografía electrónica de un huevo con oncósfera de *Taenia solium*. Tomado de: <http://www.inzine.sk/article.asp?art=9139>

Cuando el hombre se infecta con heces fecales de un portador del gusano adulto e ingiere los huevos, se convierte en hospedero intermediario accidental y desarrolla cisticercosis. Cuando el hombre consume carne de puerco mal cocida con parásitos con cisticercos, estos se activan por los fluidos gástricos e intestinales y liberan su escólex (evaginan) asiéndose a la pared intestinal donde se desarrollan hasta adulto.

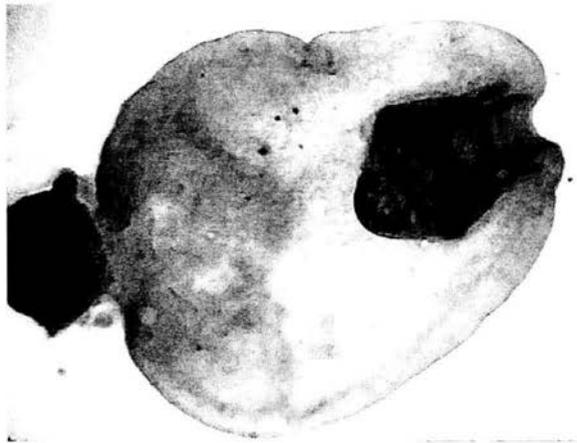


Figura 6. Cisticerco de *T. solium*. Tomado de: <http://www.inzine.sk/article.asp?art=9139>

Los cisticercos se mueren a temperaturas de 45-50°C, pero pueden sobrevivir en trozos gruesos de carne si el centro no es cocinado adecuadamente. Los cisticercos pueden sobrevivir hasta 70 días a 0°C. Salar la carne no es una medida efectiva en contra de la larva. Adicionalmente, los cisticercos sobreviven a la muerte de su hospedero aproximadamente cuatro semanas a 18-20°C.²

1.2.5 Manifestaciones clínicas

1.2.5.1 Teniosis

Las manifestaciones clínicas son ligeras, produciéndose en 2 a 3 meses después de la ingestión de los cisticercos. Inicia con malestar general, alteraciones del apetito y pérdida de peso. En ocasiones se puede presentar también astenia y adinamia, dolor abdominal, náusea de predominio matutino, diarrea que puede alternarse con con periodos de constipación y el prurito anal es frecuente.¹⁴

1.2.5.2 Cisticercosis

La cisticercosis es una enfermedad pleomórfica. Dicho pleomorfismo se debe a diferencias individuales en el número y localización de los parásitos, así como a la amplia variación que existe en la respuesta inmune del hospedero frente al parásito. La epilepsia es la manifestación clínica más frecuente de la neurocisticercosis. La práctica de estudios de neuroimagen es de fundamental importancia en todo paciente con epilepsia de inicio tardío con el objeto de confirmar o descartar la sospecha clínica de neurocisticercosis. Los signos clínicos más frecuentes son: déficit motor, signos de liberación piramidal, ataxia cerebelosa, signos de disfunción de tallo cerebral y movimientos involuntarios. Estas manifestaciones

usualmente siguen un curso progresivo, por lo que es difícil el diagnóstico diferencial con neoplasias o con otros procesos infecciosos del sistema nervioso.¹¹

1.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Los cisticercos de *Taenia solium* y otros ténidos poseen en su superficie y secretan proteínas que afectan la respuesta inmune del hospedero en distintas formas. Entre ellas se encuentran la paramiosina que inhibe la activación del complemento a nivel de C1q,¹⁵ la taeniaestatina que inhibe la vía clásica y alterna, así como polisacáridos sulfatados que activan el complemento lejos del parásito.¹⁶ Además, los cisticercos secretan proteasas que inducen apoptosis,¹⁷ hidrolizan las inmunoglobulinas G del hospedero¹⁸ y a proteínas de membrana de las células inflamatorias, contribuyendo en la evasión y disminución de la respuesta inmune.¹⁹ Por otra parte, el parásito secreta moléculas (pobremente descritas) que desvían la producción de anticuerpos. Asimismo, tienen receptores para la fracción cristalizable de los mismos.²⁰ Aunque los anticuerpos parecen no participar significativamente en la inmunidad.²¹ Otros mecanismos de patogenicidad incluyen producción de factores anticomplemento²² y absorción de proteínas y anticuerpos del hospedero.²³ Así como la participación de enzimas antioxidantes como la Superóxido dismutasa y glutatión S-transferasas que frenan las *especies reactivas de oxígeno* (ERO) provenientes de la respuesta inmune.^{24,25,26}

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Teniosis

Existen dos problemas en el diagnóstico de la teniosis: la baja sensibilidad de la microscopía de luz y la gran similitud morfológica entre los huevos de *Taenia solium* y *Taenia*

saginata y otros ténidos. En las raras ocasiones en que el escólex del gusano es encontrado, la presencia del rostelo armado define la identificación de la especie. La morfología de los genitales maduros en los proglótidos proporciona también la identificación de la especie. Pero raramente se obtienen proglótidos grávidos en las heces del paciente, lo cual hace que su utilización para el diagnóstico sea técnicamente difícil.²⁷ Actualmente se emplean purgantes inmediatamente antes del tratamiento antiparasitario para limpiar el intestino y recuperar el escólex. También se cuenta con métodos de diagnóstico molecular, entre ellos se encuentran ensayos inmunoenzimáticos de coproantígenos (ELISA),²⁸ reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando genes mitocondriales a partir de ADN aislado de huevos²⁹ e inmunoelectrotransferencia utilizando una fracción de excreción-secreción.³⁰ Aunque ninguno ha demostrado tener la suficiente sensibilidad ni especificidad para su uso a gran escala como prueba diagnóstica, la técnica de coproantígenos es la más efectiva. Empero, este tipo de técnicas son caras y no pueden realizarse en las zonas donde se encuentran las personas infectadas, ya que requieren de equipos que sólo están en las ciudades. Otra técnica de diagnóstico que ha caído en desuso debido a su baja sensibilidad y dificultad, es la búsqueda de huevos en las heces por microscopía mediante técnicas de sedimentación y flotación.

1.4.2 *Cisticercosis*

En el caso de la cisticercosis una herramienta muy útil en el diagnóstico es la tomografía computarizada, ya que con esta técnica se obtienen imágenes que ponen de manifiesto la presencia de cisticercos en cualquier parte del cuerpo. Desgraciadamente esta técnica es extremadamente cara y no está al alcance de las comunidades endémicas. Otra opción en el diagnóstico es la biopsia, aunque no siempre es posible realizarla. La presencia

de cisticercosis extracerebral facilita considerablemente el diagnóstico de esta entidad en pacientes debido a que los parásitos pueden identificarse por radiografías o por palpación. Cuando la cisticercosis es ocular, el diagnóstico se hace por examen oftalmológico. La técnica serológica más utilizada para el diagnóstico de la cisticercosis es la inmunoelectrotransferencia que emplea una fracción de glicoproteínas, la que logra detectar individuos parasitados hasta con 2 cisticercos.²⁹

1.5 Tratamiento

La cisticercosis fuera del sistema nervioso es una infección benigna y no merece tratamiento específico. La neurocisticercosis está asociada con alta morbilidad y mortalidad. Hasta 1978, los únicos tratamientos disponibles eran la cirugía para extraer a la larva y el tratamiento con esteroides para reducir la inflamación. El primer fármaco empleado contra los cisticercos porcinos fue el prazicuantel.³¹ Después se utilizó en humanos y apareció el albendazol, que resultó ser más barato y efectivo.^{32,33} Debido a que muchos casos de neurocisticercosis cursan sin síntomas, la comunidad médica ha aceptado que el uso de medicamentos antiparasitarios conlleva a una reacción inflamatoria innecesaria debida a la liberación de los antígenos del parásito por su muerte. Por consiguiente, la terapia anticisticercosa debe ser el resultado de un estudio riguroso del paciente, el número, localización y viabilidad de los parásitos en el sistema nervioso. Se ha concluido que cisticercos en crecimiento deben ser tratados con medicamentos o removidos quirúrgicamente. Aunque lo anterior sólo puede ser dictaminado por un experto en el área, tomando en cuenta que existen muchas complicaciones relacionadas al tratamiento.³⁴

1.6 Medidas de control

Se han propuesto algunas medidas preventivas para controlar y prevenir la teniosis y la cisticercosis en zonas endémicas, entre ellas se encuentran campañas educativas que incluyan la información para prevenir la adquisición del parásito, hábitos de higiene, identificación de carne infectada, cocimiento de ésta, evitar el fecalismo al aire libre; la vacunación de cerdos, el tratamiento de cerdos con medicamentos antiparasitarios, tratamiento humano en masa para la erradicación del parásito adulto en los portadores, campañas de salud que incluyan inspecciones rigurosas en los rastros, modernización de la cría de cerdos, creación de mejores condiciones sanitarias y sistemas epidemiológicos para identificar a los portadores del parásito adulto.³⁵ Actualmente no se cuenta con una vacuna comercial.

1.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes en favor del primero.³⁶ Por lo tanto, el estrés oxidativo puede ser un resultado de un aumento en la exposición a oxidantes, una disminución en las defensas antioxidantes o ambos factores.³⁷ Debido a que la vida se ha desarrollado en una atmósfera rica en oxígeno, el estrés oxidativo es inevitable. Los radicales de oxígeno son generados por productos del metabolismo aerobio y por exposición a múltiples factores ambientales. Estas moléculas, llamadas ERO, son muy peligrosas, ya que causan daño a las principales clases de macromoléculas biológicas produciendo oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, despolimerización de polisacáridos y daño al ADN (mutaciones, ruptura de hebras, etc.).³⁸ Entre ellas se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el

radical hidroxilo (HO). Las ERO son generadas por la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria y como productos asociados a una gran variedad de reacciones metabólicas normales en el citoplasma, retículo endoplásmico, en la membrana plasmática y en los peroxisomas.³⁹ Además, en algunas situaciones algunos organismos necesitan protección contra las ERO que surgen de la exposición a radiación, drogas redox, exposición a metales o las producidas por células del sistema inmune como eosinófilos, neutrófilos y macrófagos activados. Para contrarrestar los efectos destructivos de las ERO, células, tejidos, órganos, y organismos utilizan muchos niveles de defensas antioxidantes de remoción de daños, reemplazo o sistemas de reparación para lidiar con los daños causados por el oxígeno.⁴⁰ Estas defensas son enzimáticas y no enzimáticas. Entre las no enzimáticas están el α -tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), urato, flavonoides, dihidroubiquinona, dihidrolipoato, β -caroteno, el glutatión, entre otras moléculas.⁴¹ Las enzimas que funcionan como defensa antioxidante son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y peroxidasa (PX) que contienen grupos hemo. Uno de los avances más importantes en el campo del estrés oxidativo ha sido el descubrimiento de que los genes que codifican para estas enzimas antioxidantes y reparadoras que pueden responder a niveles cambiantes de ofensas oxidativas. Ahora se sabe que organismos desde las bacterias hasta mamíferos pueden adaptarse exitosamente al estrés oxidativo incrementando rápidamente su producción de enzimas antioxidantes y reparadoras. Una batería de 30-40 genes en bacterias, levaduras y mamíferos se activa en una respuesta rápida y coordinada contra la oxidación. Esta respuesta genética hace posible que las células resistan exposiciones oxidativas que normalmente serían letales.⁴²

Se ha postulado que las enzimas antioxidantes son esenciales para los parásitos en su defensa contra las ERO generadas por los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del

hospedero.⁴³ Ellas actúan de manera secuencial comenzando por la SOD que cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Figura 7a). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por sí mismo puede causar daño oxidativo, pero es aún más importante que sea una fuente de ERO más agresivas como el radical hidroxilo (OH). Por lo tanto, las SODs no son benéficas en ausencia de un sistema que remueva H_2O_2 .⁴⁴ Esta tarea es realizada por la CAT o la GPX, que cataliza la hidrólisis del peróxido de hidrógeno a agua (Figura 7b), adicionalmente la GPX puede catalizar la hidrólisis de otros hidroperóxidos en alcoles y agua con la ayuda del glutatión (Figura 7c).

En el caso de los cestodos no se han encontrado la catalasa ni la glutatión peroxidasa, enzimas que inactivan al peróxido de hidrógeno.⁴⁴ Sin embargo, una nueva familia de enzimas antioxidantes ha sido encontrada, las *peroxiredoxinas* (Prx), en todos los reinos, incluyendo los céstodos.

1.8 Peroxiredoxinas

Estas enzimas son ubicuas, ya que han sido encontradas en levaduras, plantas, células animales, incluyendo protozoarios y parásitos helmintos y en la mayoría de las eubacterias y arqueas.⁴⁵ En eucariontes se presentan en múltiples isoformas. La primer peroxiredoxina encontrada se detectó en *Saccharomyces cerevisiae*,⁴⁶ donde su expresión es inducida específicamente por la exposición a estrés oxidativo.⁴⁷ La reacción catalizada por las Prx es la reducción de los peróxidos a su respectivo alcohol (Figura 7d).

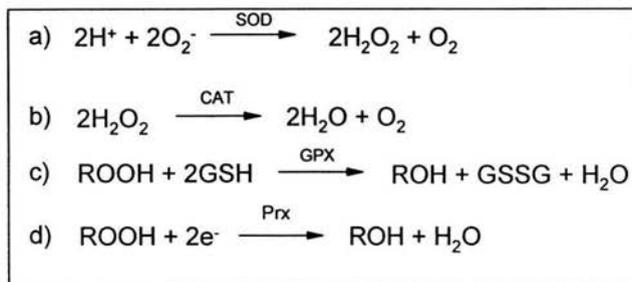


Figura 7. Reacciones catalizadas por enzimas antioxidantes.

Los peróxidos reducidos abarcan una gran cantidad de ERO, desde el peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, alquilhidroperóxidos y arilhidroperóxidos como el hidroperóxido de cumeno (HCU). Aunque las Prx se localizan principalmente en el citosol, también han sido encontradas en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, asociadas a membranas y al menos una se exporta.⁴⁸ Las Prx se producen a altos niveles en las células: ellas se encuentran entre las 10 proteínas más abundantes en *E. coli*,⁴⁹ la segunda o tercera en eritrocitos⁵⁰ y componen el 0.1-0.8% de las proteínas solubles en otras células de mamíferos.⁵¹

1.8.1 Estructura y clasificación de las peroxiredoxinas

Las peroxiredoxinas son proteínas de 22-23 kDa que no tienen cofactores metálicos, ni grupos prostéticos, sino que en su sitio activo poseen una o dos cisteínas. Todas las Prx tienen un residuo cisteína conservado en el extremo amino de la molécula, y la mayoría contiene otro residuo cisteína conservado en el extremo carboxilo.⁵² Un número pequeño de peroxiredoxinas carecen de la cisteína carboxilo terminal. Por lo tanto, las Prx se dividen estructuralmente en dos grupos: las 2-Cys, que contienen las cisteínas catalíticas en los extremos amino y carboxilo, y las 1-Cys, que contienen solamente la cisteína catalítica del

extremo amino.⁵³ Ambos grupos de peroxiredoxinas son homodímeros unidos con una orientación inversa, es decir, los extremos amino unidos a los extremos carboxilo de cada cadena polipeptídica. Adicionalmente, las peroxiredoxinas 2-Cys se subdividen en típicas y atípicas. Las típicas son homodímeros, mientras que las atípicas son monómeros.

Muchos organismos producen más de una isoforma de Prx. Desde 1998, la estructura cristalina de seis peroxiredoxinas de mamíferos ha sido publicada, incluyendo cuatro 2-Cys típicas, una 2-Cys atípica y una 1-Cys.²¹ En éstos se han descrito hasta la fecha 6 tipos de Prxs (I, II, III, IV, V y VI). Las Prx I y Prx II constan de 199 y 198 aminoácidos, respectivamente, y se encuentran en el citosol. Prx III contiene una estructura primaria mucho mayor (256 aminoácidos) donde se ha demostrado que posee una secuencia señal mitocondrial de 63-64 aminoácidos en el extremo amino. Al igual que Prx III, la Prx IV contiene una secuencia señal hidrofóbica de 36-37 aminoácidos en el extremo amino que es típica de las proteínas secretadas. De hecho, se ha encontrado que esta enzima es modificada postranscripcionalmente en el retículo endoplásmico antes de ser secretada.⁵⁴ Se ha demostrado que Prx V se encuentra en la mitocondria, aunque parece no tener péptido señal mitocondrial. Por otro lado, parece que tiene secuencias blanco para peroxisomas en el extremo carboxilo. Prx VI (1-Cys) contiene sólo un residuo de cisteína en su sitio activo y se ha determinado que el glutatión (GSH), y no la tioredoxina, funciona como donador de electrones en su acción catalítica, en contraste con las 2-Cys que utilizan la tioredoxina como donador de electrones. La *tabla I* indica las principales características de las peroxiredoxinas I-VI.

Tabla I Características principales de las peroxiredoxinas*

	Prx I	Prx II	Prx III	Prx IV	Prx V	Prx VI
Grupo	2-Cys	2-Cys	2-Cys	2-Cys	2-Cys atípica	1-Cys
Longitud del péptido (aa)	199	198	256 (P.S., 63-64)	271 (P.S., 36-37)	214 (P. S., 52-53)	224
Localización celular	Citosol, núcleo	Citosol, membrana	Mitocondria	Citosol, Golgi, secretada	Mitocondria, peroxisoma, citosol	Citosol
Estructura cuaternaria	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Monómero	Monómero
Donador de electrones	Tioredoxina GSH	Tioredoxina	Tioredoxina	Tioredoxina GSH	Tioredoxina	GSH ciclofilina A

*Adaptado de ⁴³ y ⁴⁵.

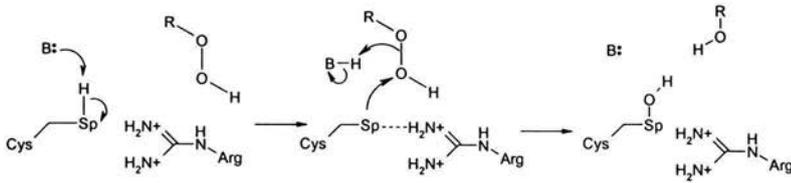
P.S. : Péptido señal.

1.8.2 Mecanismo de reacción

El mecanismo catalítico de las Prx (Figura 8) se compone de dos pasos centrados alrededor de una cisteína reductora activa o cisteína peroxidativa, que se encuentra en el extremo amino de la proteína. Todas las peroxiredoxinas tienen el primer paso en común, en donde la cisteína peroxidativa es atacada por el peróxido y oxidada a ácido sulfénico (Cys-S_pOH).⁵⁵ Al parecer, la descomposición del peróxido requiere a una base que desprotone la cisteína peroxidativa, así como un ácido que protone al pobre grupo saliente RO⁻. Todas las Prx conservan una Arginina en el sitio activo que podría reducir el pK_a de la cisteína peroxidativa estabilizando su forma tiolato.⁵⁶ El segundo paso de la reacción, la resolución del ácido sulfénico de la cisteína peroxidativa, distingue a las tres clases de peroxiredoxinas; en esta reacción el ácido sulfénico de la cisteína peroxidativa de una subunidad es atacado por la cisteína resolutora (Cys-S_RH) localizada en el extremo carboxilo de la otra subunidad, lo que resulta en la formación de un puente disulfuro intermolecular en las peroxiredoxinas 2-Cys típicas. En el caso de las 2-Cys atípicas la cisteína resolutora se encuentra en el extremo carboxilo de la misma subunidad, lo que da como resultado un puente disulfuro

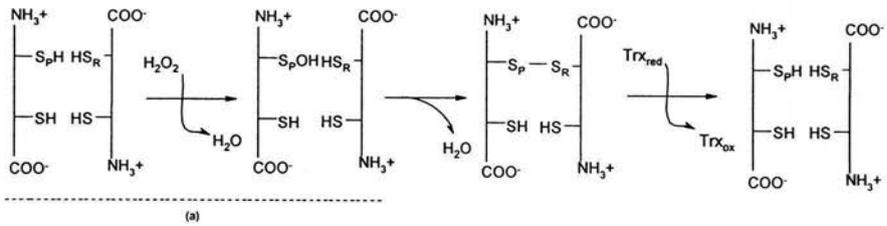
intramolecular en el monómero.⁵⁷ Por otra parte, debido a que las peroxiredoxinas 1-Cys sólo conservan la cisteína peroxidática y no la resolutora, se ha propuesto que su ácido sulfénico sea reducido por algún donador que contenga un grupo tiol como lo son el glutatión o la ciclofilina A. Por analogía el donador podría formar un puente disulfuro que sería reducido por otro donador, reciclándose la enzima.²¹

(a)

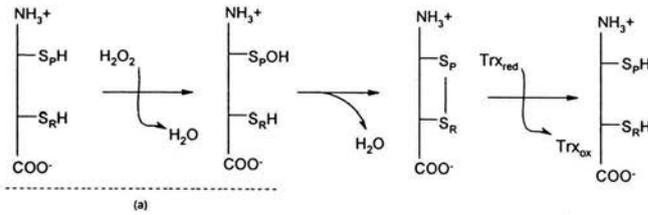


(b)

Prx 2-Cys Típica



Prx 2-Cys Atípica



Prx 1-Cys

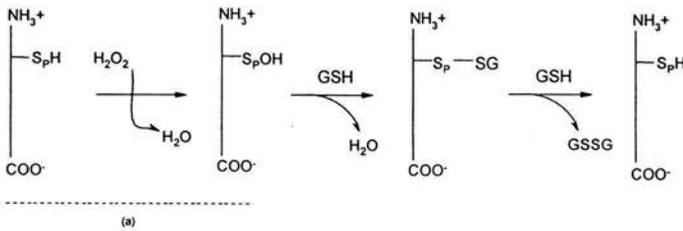


Figura 8. Mecanismo de reacción de las Prx. Adaptado de ³³ y ⁴⁵.

1.8.3 Principales funciones de las peroxiredoxinas

Se ha señalado que las peroxiredoxinas son las principales enzimas detoxificantes del peróxido de hidrógeno en varios parásitos.⁵⁸ Incluso hay reportes que las mencionan como la principal proteína soluble en el citosol de la mayoría de los tejidos en mamíferos.⁵⁹ En eritrocitos, por ejemplo, las Prx son la proteína más abundante después de la hemoglobina.⁶⁰ Algunos estudios han revelado los genes de la familia Prx son muy numerosos en diferentes organismos, con por ejemplo más de 20 secuencias relacionadas a Prx en ratón.⁶¹

Se ha demostrado que la familia de las Prx también desempeña un papel importante en la regulación redox, además de servir como antioxidantes. En consecuencia, las Prx tienen una labor trascendental en la transducción de señales y la expresión genética debido a las alteraciones en las concentraciones de las ERO.⁵⁷ Adicionalmente, hay evidencias de que pueden interactuar directamente con moléculas de señalización celular y controlar su actividad, así como regular la expresión de algunos factores de transcripción. Igualmente, están involucradas en la regulación de las distintas fases del ciclo celular, en la inhibición de la apoptosis inducida por p53⁶² y el peróxido de hidrógeno en un nivel distinto a Bcl-2,⁶³ la proliferación y la diferenciación. Además, tienen influencia en la respuesta inmune regulando expresión de citocinas.

Se ha observado que algunas Prx 1-Cys tienen actividad de fosfolipasa A₂ independiente de calcio,⁶⁴ lo que les confiere la propiedad de reparar membranas con lípidos peroxidados así como ser una enzima general en la respuesta a insultos oxidativos.⁶⁵

1.9 Modelo murino de *Taenia crassiceps*

La *Taenia crassiceps* es un ténido que en su forma adulta infecta al zorro y en su forma larvaria ratones y algunos otros mamíferos pequeños.⁶⁶ Este céstodo ha sido aislado y cultivado en ratones BALB/cAnN, donde ha probado ser capaz de crecer y reproducirse, debido a que esta cepa de ratón es extremadamente susceptible a la infección.⁶⁷ Adicionalmente, se ha demostrado que las hembras de esta cepa albergan una mayor cantidad de parásitos que los machos. En estos ratones, la *T. crassiceps* se reproduce asexualmente en la cavidad peritoneal después de su inoculación. Consecuentemente, estas inoculaciones permiten tener una gran cantidad de parásitos en fase larvaria y mantener la cepa por pases en nuevos hospederos murinos.⁶⁸ Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa WFU miden 2-3 mm. Morfológicamente son muy parecidos a los de *T. solium*, tienen un escólex invaginado con una doble cadena de ganchos (32 aproximadamente)⁶⁶ y cuatro ventosas en una vesícula llena de fluido. También cuentan con cuello de tejido indiferenciado. Hace algunos años se estableció este modelo de infección para el estudio de este céstodo.⁶⁹ Debido a los altos costos en la experimentación con cerdos y a su cercanía filogenética con *Taenia solium*, *T. crassiceps* ha sido de gran utilidad en la investigación del parásito humano, ya que existe gran homología en muchas de sus proteínas de secreción, antígenos de superficie, enzimas metabólicas y detoxificantes, fisiología celular, respuesta a fármacos, etc.^{70,71}

Debido al impacto de la teniosis y de la cisticercosis en los países subdesarrollados, es importante el estudio de *T. crassiceps* como modelo de estas parasitosis. El estrés oxidativo es una de las defensas más importantes del hospedero contra estos céstodos. Con el

propósito de averiguar si estos parásitos incrementan la expresión de la Prx 2-Cys ante el insulto oxidativo, planteamos la siguiente hipótesis.

2 HIPÓTESIS

Dado que *T. crassiceps* está expuesta a ERO generadas por él mismo y por el sistema inmune del hospedero, las cuales podrían causarle estrés oxidativo, comprometiendo su viabilidad; ante moléculas oxidantes, como el hidroperóxido de cumeno, este céstodo debe responder al insulto oxidativo incrementando la expresión del ARNm de la Prx 2-Cys.

3 OBJETIVO GENERAL

Analizar la correlación de la expresión del ARNm de la Prx 2-Cys y la viabilidad en cisticercos de *T. crassiceps* sometidos a estrés oxidativo.

Objetivos particulares

1. Establecer el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* en ratones BALB/cAnN.
2. Determinar la viabilidad de cisticercos de *T. crassiceps* ante diferentes concentraciones de y tiempos de exposición a hidroperóxido de cumeno.
3. Correlacionar la expresión del ARNm de Prx 2-Cys en *T. crassiceps* con diferentes concentraciones y tiempos de exposición a hidroperóxido de cumeno.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Se utilizaron ratones BALB/cAnN facilitados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas. Esta cepa fue comprada originalmente al Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) en 1982 y ha sido mantenida por más de veinte generaciones. Asimismo, se empleó la cepa WFU de *Taenia crassiceps*. Esta cepa se aisló de un ratón de campo salvaje (*Peromyscus sp.*) capturado en el estado norteamericano de Michigan en agosto de 1999 y mantenida por pases de inoculaciones intraperitoneales en ratones BALB/cAnN hembras de 6 a 8 semanas⁷². Estos pases comprenden la inoculación de 10 larvas suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS: fosfato monobásico de sodio 0.01M, fosfato dibásico de sodio 0.01M, cloruro de sodio 0.15M, pH 7.2) estéril empleando una aguja del número 16 de 3mm de diámetro. Los Ratones sometidos a esta infección por 5-6 meses fueron sacrificados empleando una cámara de éter. La obtención de los parásitos se realizó por medio de una incisión en la pared abdominal y varios lavados con PBS estéril. Los parásitos recuperados fueron seleccionados para los cultivos, descartándose los calcificados, las vesículas llenas de fluido colorido, los cisticercos grandes y empleándose los de 2-3 mm de diámetro, esféricos u ovalados, sin gemas ni rastros de daño membranal. Estos cisticercos fueron empleados en los cultivos o usados para inocular ratones BALB/cAnN hembras de 6-8 semanas por vía intraperitoneal. La inoculación de cada ratón se realizó en 0.3mL de PBS estéril con 20 cisticercos.

4.2 Oxidación ferrosa con anaranjado de xilenol versión 1

Para determinar si el hidroperóxido de cumeno es capaz de permanecer sin degradarse en el medio de cultivo de los cisticercos durante los tiempos de incubación empleados, se utilizó la técnica *Oxidación ferrosa con anaranjado de xilenol versión 1* (FOX-1, por sus siglas en inglés). Esta técnica colorimétrica de detección de hidroperóxidos emplea la oxidación selectiva del ión ferroso a férrico en una solución de sulfato amónico ferroso ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2$) 2.5 mM, naranja de xilenol 1 mM, sorbitol 1 M y ácido sulfúrico 250 mM. Los iones férricos resultantes producen un color azul al formar un complejo con el naranja de xilenol que tiene un máximo de absorción a 560 nm. El sorbitol se emplea como amplificador de la formación del complejo transformando los radicales hidroxilo que se producen en peróxido de hidrógeno y radicales hidroperóxido, lo que propaga la oxidación del ión ferroso. El ácido sulfúrico sirve para acidificar el medio de reacción estabilizando la formación del complejo. Esta técnica ha probado tener linealidad en el rango de concentraciones 0-5 μM .⁷³ Debido a que en los cultivos se emplearon concentraciones milimolares, se emplearon series de diluciones para llegar a concentraciones micromolares (ver Anexo I).

4.3 Cultivos

Pasados 5-7 meses de infección los ratones con cisticercos se sacrificaron para obtener los cisticercos de la manera ya mencionada. Se seleccionaron parásitos de 2-3 mm. Los cisticercos fueron lavados varias veces con PBS estéril y se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con piruvato de sodio (1mM), aminoácidos no esenciales (0.1mM), Penicilina (100U/mL) y Estreptomicina

(110µg/mL) en placas de cultivo de 24 pozos colocando 20 parásitos por pozo (*precultivo*). Cumplido este tiempo, los parásitos fueron cultivados en dicho medio con diferentes concentraciones de hidróperóxido de cumeno (Sigma) y a diferentes tiempos.

4.4 Determinación de viabilidad

La viabilidad se determinó con 3 parámetros: la evaginación, la movilidad y la morfología que presentan los cisticercos. La evaginación de los cisticercos obtenidos de los ratones y después de los tratamientos con H₂Cu, se midió incubando (37°C con 5% de CO₂) cinco cisticercos en el medio antes citado con bilis de cerdo en una proporción de 1 bilis: 3 medio de cultivo y observando la evaginación después de 1-2 horas. La movilidad y la morfología se determinaron por observación del parásito en un microscopio invertido.

4.5 Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La purificación del ARN se realizó empleando el procedimiento establecido por Chomczynski y Sacchi⁷⁴ en 1987. Se homogenizaron 5 metacéstodos de cada condición con un sonicador en 0.5mL de TRIZOL (Life Technologies). Se ejecutaron pulsos de 20 segundos hasta homogenizar los tejidos, enfriando en hielo entre cada pulso. Se adicionaron 0.1 mL de cloroformo y se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C. Se adicionaron 0.25mL de isopropanol a la fase acuosa y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la solución a 12000g por 10 minutos a 4°C. Se lavaron los precipitados con 0.5mL de etanol al 75% y se dejó secando al ARN por 10 minutos a temperatura ambiente. El ARN purificado fue resuspendido en 30 µL de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). La pureza de se monitoreó espectrofotométricamente con el

cociente de las absorbancias a 260 y 280nm (A_{260nm}/A_{280nm}). Un valor entre 1.8-2 indica la no contaminación por proteínas y carbohidratos. Todos los ARNs purificados se incubaron con DNAsaI (Gibco-BRL) (1 U/1 mg ARN) por 15 minutos a temperatura ambiente.

La transcripción reversa y amplificación se realizaron en un termociclador (GENEAMP) y empleando el estuche (kit) One Step RT-PCR (Invitrogen) en 25 μ l y con 1 μ g de ARN total. Los pares oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de la Prx 2-Cys (A: 5'-GAC-TTC-ACC-TTC-GTC-TGC-CC y B: 5'-CGC-GGT-CTC-TTT-ATC-ATT-G) y la Actina (C: 5'-GCA-CGG-CAT-CGT-GAC-GAA-CTG-G y D: 5'-CTC-CTT-CTG-CAT-ACG-GTC-TGC) de *T. solium*, se diseñaron a partir de secuencias depositadas en el GenBank (M28996 y AY728092) y amplifican un fragmento de 216 pb (Prx 2-Cys) y 732 pb (Act). La secuencia del replicón de la Prx 2-Cys para *T. crassiceps* se muestra en el Anexo II y es idéntica a la de *T. solium*. El programa de RT-PCR consistió en un ciclo de 50°C por 25 minutos (síntesis del ADNc) y un ciclo de 94°C por 2 minutos (predesnaturalización), seguido de 35 ciclos de 94°C por 15s (Desnaturalización), 50°C por 30s (alineamiento) y 72°C por 1 minuto (extensión). Por último, un ciclo de 72°C por 7 minutos (extensión final). Los productos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (5mg/mL) en amortiguador de TAE a 100V por 45 minutos.

5 RESULTADOS

5.1 Implementación del modelo cisticercosis en ratón

Los cisticercos de *T. crassiceps* (WFU) obtenidos de la propagación en ratones de la cepa antes mencionada fueron esféricos y ovalados, con un escólex invaginado de color

blanco, una vesícula transparente llena de fluido claro, sin daño en las membranas con un tamaño aproximado de 2-3 mm, además presentaron movilidad apreciable por contracción rítmica de su membrana vesicular. Se observaron 1-2 cisticercos calcificados en una carga parasitaria total de aproximadamente 600-800. Estas características se manifestaron en ratones con tiempos de infección de 5 meses. En ratones con parasitosis de 6 meses se presentó heterogeneidad en los tamaños de los cisticercos entre 2-4 mm aproximadamente, aumento en el número de cisticercos calcificados, así como en el número de parásitos con gemas múltiples, residuos libres de gemas y las cargas abarcaron 1000-1200 parásitos. En ratones con tiempos de infección de 7 meses, la mayoría de cisticercos presentaron muchas gemas, diferentes tamaños y sus formas variaron notablemente. El número de cisticercos calcificados también creció respecto a los otros tiempos de infección. Adicionalmente, se observaron 1-3 cisticercos con su vesícula llena de líquido de hasta 1 cm de diámetro en un total de 1800 parásitos.

Los parásitos seleccionados fueron precultivados por 24 horas, tiempo en el que viraron el indicador del medio de cultivo por la acidificación del mismo.

La determinación de su viabilidad se registró por 3 parámetros: 1) la evaginación, evaluada en un medio con bilis observando la salida del gusano de la vesícula o cisticerco; 2) la movilidad, determinada a simple vista observando el movimiento del gusano evaginado y 3) la morfología de la pared vesicular de los cisticercos observada a nivel de microscopía óptica invertida.

5.2 Hidroperóxido de cumeno en medio RPMI

Para determinar las concentraciones del hidroperóxido de cumeno (H₂O₂) en los cultivos de los tiempos de las incubaciones a las que se sometieron los parásitos, se

implemento el sistema colorimétrico de detección FOX-1. La Figura 9 muestra la curva patrón con el oxidante disuelto en agua y en medio RPMI (las diluciones se esquematizan en el Anexo I). Se aprecia que el ensayo es lineal para el rango de concentraciones de 0 hasta 15 μM de HCu. Para este rango de datos se tiene un coeficiente de correlación de 0.9904 para el oxidante disuelto en agua y 0.9927 para el disuelto en RPMI. Por otro lado, en esta Figura 9 se observa que el comportamiento del hidropéroxido es muy semejante en agua y en medio RPMI. Los resultados anteriores indicaron que el método FOX-1 nos ayudaría a determinar las concentraciones de HCu en nuestros ensayos.

Para determinar si el hidropéroxido de cumeno (HCu) es capaz de permanecer sin ser destruido o inactivado en el medio de cultivo durante el tiempo de las incubaciones a la que se someten los parásitos. Se realizó un experimento que simuló las condiciones a la que se iban a enfrentar los cisticercos, utilizando medio de cultivo RPMI con HCu a 10 mM a diferentes tiempos 0, 0.25, 0.5, 1, y 24 horas (Figura 10). Transcurrido cada tiempo se tomó una alícuota y se diluyó a 10 μM (ver Anexo). Este experimento se realizó por triplicado. Las concentraciones de HCu se determinaron después de cada tiempo aplicando la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva patrón en medio RPMI (Figura 9) y con los datos de las medias de absorbancia. Se obtuvieron las concentraciones micromolares de oxidante en los diferentes tiempos (Tabla II).

Los resultados de la Figura 10 y la Tabla II indican que la muestra de HCu 10 μM disuelto en RPMI permanece hasta el final de cada tiempo, presentando variaciones pequeñas de concentración que fluctúan entre 10.44-11.14 μM , lo que comprueba su permanencia durante los tiempos empleados en los cultivos.

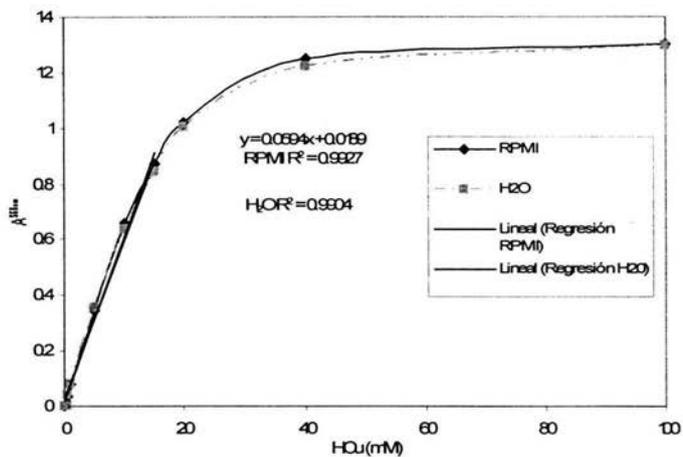


Figura 9. Curva patrón de H2O y en medio RPMI empleando el método de detección colorimétrica FOX-1.

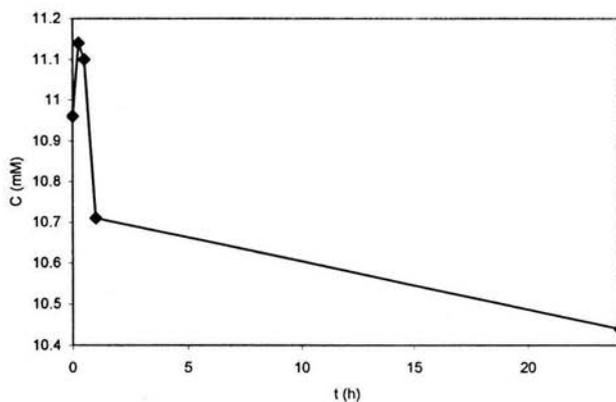


Figura 10. Determinación de H2O 10 μM disuelto en RPMI a diferentes tiempos. La concentración de H2O se mantuvo hasta 24 horas.

Tabla II. Concentraciones de hidróperóxido de cumeno determinada en RPMI en diferentes tiempos.

t (h)	A _{560nm}	Media A _{560nm}	C (μM)
0	0.706	0.67	10.96
	0.665		
	0.640		
0.25	0.656	0.681	11.14
	0.687		
	0.700		
0.5	0.654	0.678	11.10
	0.680		
	0.700		
1	0.643	0.655	10.71
	0.656		
	0.668		
24	0.615	0.639	10.44
	0.639		
	0.665		

5.3 Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad del parásito

Para conocer las concentraciones de H₂O₂ que afectan a los cisticercos se realizó el siguiente experimento (Tabla III). Grupos de cinco cisticercos, extraídos de un ratón con 5 meses de infección y procesados el mismo día, fueron sometidos a diferentes concentraciones del hidróperóxido de cumeno y tiempos de exposición.

Tabla III. Viabilidad de cisticercos expuestos a hidróperóxido de cumeno *in vitro*.

Tiempo	Control	Hidróperóxido de cumeno (mM)				
		2.5	5	7.5	10	15
15 min	(5)	(5)	(4)	(2)	(0)	(0)
	++++	++++	+++	+	-	-
30 min	(5)	(5)	(2)	(0)	(0)	(0)
	++++	++++	++	-	-	-
1 hora	(5)	(4)	(1)	(0)	(0)	(0)
	++++	+++	+	-	-	-
24 horas	(5)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
	++++	-	-	-	-	-

(#) Numero de cisticercos que evaginaron

Movilidad: +++++ alta; +++ mediana; ++ moderada; + baja; - nula.

La concentración y el tiempo de exposición al oxidante disminuyeron en proporción directa la evaginación y la movilidad de las larvas, asimismo aumentaron los daños a la membrana de los ténidos. Se observó que de los 5 cisticercos expuestos a la concentración de 2.5 mM por 1 hora, uno perdió la capacidad de evaginar y la movilidad de todos se redujo de alta a mediana. A la misma concentración pero con una exposición de los parásitos por 24 horas al oxidante, cuatro de ellos perdieron la capacidad de evaginar y todos no presentaron movilidad. En la exposición por 15 minutos a la concentración de 5 mM se observa que un cisticerco no evaginó y la movilidad se redujo de alta a mediana. En la concentración de 7.5 mM, 3 cisticercos perdieron su capacidad de evaginar y su movilidad se reduce a baja. En 10 y 15 mM todos los parásitos pierden su facultad de evaginar y su movilidad es nula en todos los tiempos de exposición. A 30 minutos de exposición al oxidante los cisticercos fueron capaces de evaginar hasta en 5 mM, donde solo 2 mantuvieron su capacidad de evaginación presentando una apreciable disminución en su movilidad de alta a moderada. En el tiempo de una hora perdieron su capacidad de evaginación uno y cuatro cisticercos en las concentraciones 2.5 y 5 mM, respectivamente. La movilidad de los parásitos, a este tiempo, disminuyó ligeramente en 2.5 mM y llegó a su mínimo en 5 mM. Rebasada la concentración de 5 mM a ese tiempo no se observaron parásitos evaginados ni movilidad. A las 24 horas únicamente evaginó un cisticerco a 2.5 mM, el cual no presentó movilidad.

Por otro lado, la morfología también se vio afectada. Se observó un deterioro gradual en las membranas de los parásitos conforme se aumentó la cantidad de HCu y el tiempo de exposición. Los daños que se observaron en los cisticercos en un microscopio invertido fueron: un aspecto más opaco del parásito, así como abultamientos y vacuolas en la pared del parásito, especialmente a partir de los 30 minutos de incubación con la concentración de 2.5 mM del oxidante, donde comienzan a afectarse la evaginación y la movilidad.

Para los siguientes experimentos, a excepción del experimento de recuperación de los parásitos por supresión del insulto oxidativo (Sección 5.5), se eligió el tiempo exposición a HCu de 30 minutos debido a que en éste disminuyen su movilidad, la evaginación y cambia la morfología apreciablemente y porque es un periodo que permite la manipulación adecuada de los parásitos sin un gasto excesivo de tiempo.

5.4 Efecto del tiempo post-infección sobre la viabilidad de cisticercos sometidos a estrés oxidativo

Para determinar el efecto del tiempo post-infección del ratón sobre el cisticercos se realizó un experimento como el anterior y se determinaron los mismos parámetros de medida de la viabilidad. Se extrajeron los cisticercos de tres grupos de ratones con tiempos de infección de 5 (control), de 6 y de 7 meses después de infección. Los cisticercos extraídos de cada ratón se sometieron a las concentraciones ya mencionadas (Tabla IV) de HCu únicamente por 30 minutos. El experimento se realizó por triplicado a excepción del tiempo post-infección de 5 meses.

Tabla IV. Susceptibilidad de cisticercos extraídos de ratones con diferentes tiempos post-infección a la exposición de hidroperóxido de cumeno durante 30 minutos

Tiempo post-infección del ratón (meses)	Control	Hidroperóxido de cumeno (mM)						
		1	2.5	5	7.5	10	15	20
7	5	5	4	4	0	0	0	0
	++++	++++	+++	++	-	-	-	-
	5	5	4	3	0	0	0	0
	++++	++++	+++	++	-	-	-	-
6	5	5	3	1	0	0	0	0
	++++	++++	+++	++	-	-	-	-
	5	5	5	4	0	0	0	0
	++++	++++	+++	++	-	-	-	-
5	5	5	5	1	0	0	0	0
	++++	++++	+++	++	-	-	-	-
	5	5	5	2	0	0	0	0
	++++	++++	+++	++	-	-	-	-

(#) Numero de cisticercos que evaginaron

Movilidad: +++++ alta; +++ mediana; ++ moderada; + baja; - nula.

La tabla IV muestra que los cisticercos control y los tratados con 1 mM de oxidante no muestran variaciones en la evaginación y la movilidad entre los diferentes tiempos de parasitosis en los ratones. Los parásitos del ratón con 7 meses de infección fueron ligeramente más sensibles, presentando una discreta disminución en la evaginación a 2.5 mM de hidroperóxido de cumeno respecto a los de 5 y 6 meses de post-infección. A esta concentración perdieron su evaginación 1 y 2 parásitos. Asimismo, estos datos contrastan con los de la tabla III, donde a 2.5 mM y 30 minutos no se observó disminución en ninguno de ambos parámetros. En 5 mM se presentó la pérdida de la evaginación y la movilidad de manera similar entre los tres grupos, para agotarse en las concentraciones subsiguientes. En todos los casos la movilidad se mantuvo alta hasta 1 mM, mediana a 2.5 mM, moderada a 5 mM y nula a 7.5 mM y concentraciones siguientes. La morfología de los cisticercos se mantuvo constante hasta antes de 5 mM, después de esta se observaron daños en la membrana que incluyeron opacidad, rupturas y formación de extensiones o abultamientos,

similares a los que se presentaron en los tiempos superiores a los 30 minutos y concentraciones a partir 5 mM en la tabla III.

5.5 Recuperación de los parásitos por supresión del insulto oxidativo

Para determinar si los cisticercos son capaces de recuperarse del estrés oxidativo causado por el hidroperóxido de cumeno, se expusieron grupos de cinco cisticercos durante 15 minutos a distintas concentraciones del oxidante. Concluidos los 15 minutos, los parásitos fueron transferidos a medio de cultivo sin hidroperóxido para su recuperación por 1 hora. En la tabla V se muestran los resultados del experimento. Este tratamiento no mejoró los parámetros de la evaginación, movilidad, ni morfológicos de los parásitos en ninguna de las concentraciones probadas, en especial la de 7.5 mM, ya que se a esta concentración se repiten los resultados obtenidos en el experimento sin recuperación: evaginan 2 cisticercos y presentaron una movilidad baja, con el mismo daño en su membrana. Sin embargo, en 5 mM evaginó un cisticerco más que en el experimento sin recuperación. No obstante, este resultado puede deberse a la variabilidad biológica de los parásitos.

Tabla V. Recuperación de la viabilidad de cisticercos expuestos a hidroperóxido de cumeno por 15 minutos y transferidos a medio de cultivo sin oxidante por 1 hora.

Control	Hidroperóxido de cumeno (mM)					
	1	2.5	5	7.5	10	15
(5)	(5)	(5)	(5)	(2)	(0)	(0)
++++	++++	++++	+++	+	-	-

(#) Numero de cisticercos que evaginaron
 Movilidad: +++++ alta; +++ mediana; ++ moderada; + baja; - nula.

5.6 Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión del ARNm de la Prx 2-Cys

Se evaluó la expresión del gene de la Prx 2-Cys mediante el ensayo de RT-PCR a partir de ARN total extraído de cisticercos sometidos a estrés con hidróperóxido de cumeno durante 30 minutos. Se utilizaron 2 oligonucleótidos complementarios al cDNA que codifica para la Prx 2-Cys de *T. solium*, los cuales amplifican un fragmento de 216 pb. Como control del ensayo se utilizaron 2 oligonucleótidos complementarios a un cDNA de Actina de *T. solium* que producen un fragmento de 732 pb. Adicionalmente se corrió un gel con 10 µg de ARN total extraído de cada muestra empleada en el RT-PCR para corroborar que la purificación se realizó correctamente (Figura 11a).

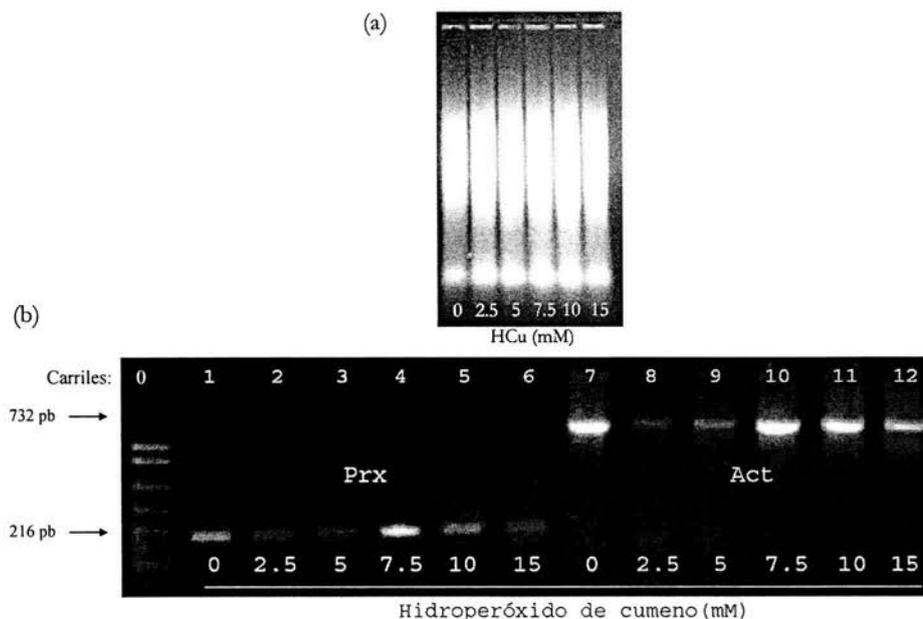


Figura 11. (a) ARN total de cisticercos de *T. crassiceps* incubados con diferentes concentraciones de H₂O₂. (b) Efecto sobre la expresión de los ARNm para la Prx 2-Cys y Actina en cisticercos incubados con diferentes concentraciones H₂O₂, determinado por RT-PCR. Carril 0: pBR322 digerido con Msp-I. Carriles 1-6: RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de Prx 2-Cys y carriles 7-12: RT-PCR para amplificar un fragmento del gen Actina.

La Figura 11a muestra el corrimiento electroforético de 10 µg ARN total de cada muestra. Se aprecia que el ARN total no muestra degradación. La Figura 11b muestra la determinación del ARNm para la Prx 2-Cys bajo diferentes concentraciones del oxidante que sufrieron los cisticercos en cultivo del tiempo 30 minutos. El carril 1 muestra la expresión de ARNm de Prx 2-Cys de un cisticerco sin estrés (control de expresión). En los carriles 2 y 3 se muestra la expresión del ARNm de la Prx 2-Cys de cisticercos expuestos a 2.5 y 5 mM de H₂Cu, se observó en ambos una disminución dramática de la expresión del ARNm de Prx 2-Cys. La exposición de cisticercos a 7.5 mM (carril 4) produjo un aumento de aproximadamente el doble del ARNm comparado con el control. La exposición a 10 mM (carril 5) mostró una caída drástica del nivel de expresión de aproximadamente la mitad del nivel basal, para prácticamente abatirse a la concentración de 15 mM (carril 6). Un efecto similar se observa en la expresión para el ARNm de Actina, donde el control (carril 7) tuvo una expresión alta, similar a la de Prx 2-Cys, para disminuir sensiblemente a las concentraciones de 2.5 mM y 5 mM. A la concentración de 7.5 mM se apreció una recuperación que se mantuvo en 10 mM, para después disminuir ligeramente a la concentración de 15 mM. Estos productos de expresión se cuantificaron por densitometría en un fotodocumentador 120 Kodak digital Science, empleando una curva de cantidades conocido hecha con el fragmento de ADNc amplificado para la Prx 2-Cys puro ($R^2 = 0.9924$, Ver curva anexo III).

Se obtuvo la gráfica de la figura 12. En esta figura se observa que la cantidad de los ARNm de Prx 2-Cys disminuyó considerablemente a 2.5 y 5 mM del oxidante, cayendo aproximadamente 80 y 90%, respectivamente; en tanto que el ARNm de Actina en 2.5 y 5 mM disminuyó 88 y 70% respectivamente. Sin embargo, a 7.5 mM el ARNm de Prx 2-Cys se incrementó 60% respecto al nivel basal y el de Actina alcanzó su nivel original. A 10 y 15

mM ambos ARNm disminuyen, aunque en mayor medida el de Prx 2-Cys, que llega a 71% de su nivel basal en 10 mM y apenas a 26% en 15 mM. En relación al ARNm de Actina, en 10 mM se disminuye el 8% del nivel basal y en 15 mM desciende a casi la mitad (58%) del valor del control.

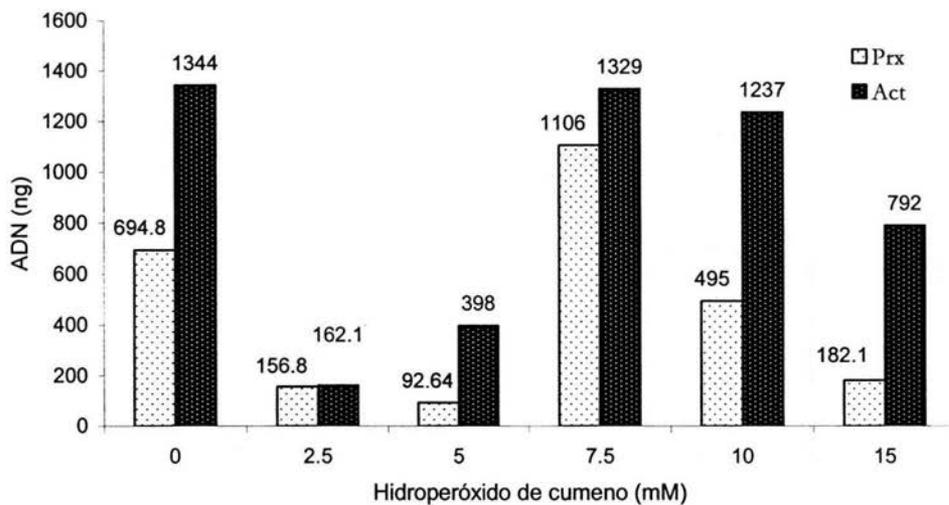


Figura 12. Medición semicuantitativa del RT-PCR de la expresión de los ARNm para la Prx 2-Cys y Actina en cisticercos incubados con diferentes concentraciones HCu.

6 DISCUSIÓN

El estudio del estrés oxidativo ha tomado mucho auge en los últimos años debido a que se ha demostrado que es uno de los factores principales en la defensa del hospedero contra los parásitos,⁷⁵ así como en otros procesos tales como el envejecimiento y la apoptosis.^{62,76} Por otro lado, las Prx 2-Cys están involucradas en procesos de protección antioxidante, principalmente inactivando hidroperóxidos lipídicos y H₂O₂, así como en los procesos en el desarrollo y diferenciación celular.⁵⁶

Este trabajo realiza una caracterización del efecto del estrés oxidativo causado por el HCu sobre la viabilidad (entendida como evaginación, movilidad y morfología del cisticerco) y la expresión del ARNm para la Prx 2-Cys en cisticercos de *T. crassiceps*. Para llevar a cabo lo antes mencionado se implementó el método FOX-1 para determinar la concentración de HCu en el medio de cultivo dentro del rango de linealidad de 0-15 µM (figura 9). La Figura 10 y la tabla II muestran como este método permitió medir en muestras del medio de cultivo el HCu disuelto en diferentes tiempos, lo que demostró que este oxidante permanece en el medio de cultivo durante los tiempos empleados para los experimentos desarrollados.

Los resultados de la exposición de los cisticercos de *Taenia crassiceps* al estrés oxidativo producido por HCu a diferentes concentraciones y tiempos, muestran que la fase larvaria de *T. crassiceps* es capaz de resistir (tabla III) 30 minutos de exposición a una concentración de 2.5 mM de HCu sin presentar cambios en su movilidad, morfología y evaginación. Sin embargo, tiempos de exposición mayores a 30 minutos de esta misma concentración empiezan a tener efectos tales como daños en la pared vesicular, disminución de la movilidad y la evaginación. Por otro lado, los parásitos tampoco resisten concentraciones de 5 mM de oxidante por 15 minutos. En consecuencia, estos resultados

son una prueba de la gran resistencia del parásito ante el estrés oxidativo. Ejemplo de ello es que estudios realizados en parásitos como *Onchocerca cervicalis* y *Dirofilaria immitis* demostraron que a concentraciones mil veces menores de peróxido de hidrógeno (1-5 μM) se observa daño *in vitro*.⁷⁷ Otro caso es el del trematodo *Schistosoma mansoni*, cuya fase adulta muere *in vitro* a 1 mM de peróxido de hidrógeno.⁷⁸ Es importante mencionar que las concentraciones de peróxido de hidrógeno que se alcanzan en la respuesta inmune están en el rango de 1-5 μM ,⁷⁹ muy lejos de ser suficientes para causar daño en los cisticercos.

Con la determinación de la susceptibilidad de cisticercos provenientes de ratones con diferentes tiempos de infección se demostró que 5 meses es el tiempo de infección óptimo, ya que casi todos los parásitos extraídos mostraron una morfología homogénea que corresponde a una larva saludable como ha sido descrita en la sección de resultados, así como en estudios anteriores.⁶⁶ En contraste, cisticercos obtenidos de ratones con 6 y 7 meses de infección presentaron una mayor carga parasitaria, con una morfología que se distingue de los obtenidos de ratones con 5 meses de post-infección. Sin embargo, cabe mencionar que de estos tiempos largos de infección se escogieron los más sanos que correspondieron a la morfología previamente descrita. Asimismo, estos resultados muestran que los cisticercos obtenidos de ratones con infecciones de 6 meses se comportan igual que los obtenidos de 5 meses, en contraste los cisticercos obtenidos de los ratones de 7 meses fueron ligeramente más susceptibles que los obtenidos de 5 meses. Lo anterior muestra que siempre existe una población de cisticercos que resiste el ataque del hospedero.⁶⁸ Asimismo, sugiere que la respuesta inmune del ratón en infecciones largas no limita la infección de los parásitos, como ya es sabido, pero sí tiene efecto en la población dañando a los mismos.⁸⁰

Por otra parte, los cisticercos son incapaces de recuperarse de un insulto oxidativo temporal de 15 minutos a una concentración de 7.5 mM cuando son cultivados en medio

libre del oxidante por 1 hora. Estos datos indican que una vez alcanzado el daño oxidativo en los parásitos, éste es irreversible. Estos hallazgos difieren de los estudios hechos en levaduras y bacterias, donde se ha encontrado que las células al ser expuestas a estrés oxidativo no letal, al ser pasadas a un medio nuevo se recuperan y continúan su crecimiento.^{81,82} Lo anterior puede sugerir que los tiempos usados de recuperación y exposición de los cisticercos fueron muy cortos. Experimentos variando los tiempos antes mencionados serán realizados para esclarecer este punto.

Los experimentos mostrados en la figura 11b muestran un efecto de disminución y aumento del ARNm para la Prx 2-Cys en cisticercos expuestos a estrés oxidativo con HCu por 30 minutos, comparados con el control. La aplicación de un estrés no letal de 2.5 mM disminuye drásticamente el ARNm para la Prx 2-Cys. Esta disminución continúa hasta a 5 mM, coincidiendo con la pérdida de viabilidad de los cisticercos. En contraste a la concentración de 7.5 mM la cantidad de ARNm para la Prx 2-Cys se incrementa 60% respecto al control, sin embargo la viabilidad es nula. Por último, en la concentración 10 mM se observa una caída drástica que continúa en la concentración de 15 mM de HCu, haciendo casi nula la expresión del ARNm de Prx 2-Cys, lo que coincide con la ausencia de la viabilidad de los parásitos. Este efecto de la disminución de mensajero para la Prx 2-Cys a las concentraciones 2.5 y 5 mM, su aumento en 7.5 y su disminución a la concentración de 10 mM también se observó para el mensajero de Actina. La Actina es un gen de mantenimiento y se empleó como control de expresión, debido a que su nivel se mantiene constante en condiciones normales en el ciclo celular.

Una posible explicación de la no coincidencia entre la viabilidad y la cantidad de los ARNm de Prx 2-Cys y Actina es que dicha disminución en su expresión sea causada por la inducción de mecanismos apoptóticos debidos al HCu. En estudios realizados en eosinófilos

y neutrófilos, se ha demostrado la inducción de la apoptosis empleando bajos niveles de ERO e inhibición de la apoptosis empleando altos niveles de ERO.⁸³ Lo que podría explicar la disminución en la expresión del ARNm de Actina a niveles no letales y su nivel constante en las concentraciones letales. Sin embargo, si las células del céstodo entraran en apoptosis, se esperaría la pérdida de los parámetros de la viabilidad a esas concentraciones; cosa que no ocurrió en los cisticercos. Por otro lado, es probable que exista un mecanismo de regulación con un umbral que cense la cantidad de ambas proteínas así, al caer su cantidad a niveles peligrosamente bajos debido al estrés que genera el oxidante, es factible que se aumente su transcripción; como se observa en 7.5 mM de HCu, en dónde los niveles de expresión del ARNm de Actina y Prx 2-Cys se aumentan, aunque contraste con la pérdida de la viabilidad del parásito. Es probable que este aumento en el ARN para la Prx 2-Cys se pueda explicar debido a que aun se conserven células vivas que continúan expresando sus ARNm. Otra explicación a estas observaciones podría ser el efecto directo del oxidante sobre las moléculas de ARNm así, el HCu podría estar causando su destrucción dentro de las células del parásito bajando los niveles de detección, sin embargo esta última opción fue descartada ya que la figura 11a demostró que no hubo daño aparente al ARN.

Es claro que el aumento del ARNm para la Prx 2-Cys es debido al estímulo producido en los cisticercos por el HCu, lo que podría sugerir que se debería producir una mayor cantidad de enzima Prx 2-Cys, cosa que no se demostró en esta tesis. Determinar la correlación de la proteína con el ARNm podría ayudar a esclarecer los resultados. Esto puede ser realizado utilizando un método que cuantifique la cantidad de proteína producida en estos experimentos, tales como midiendo la enzima o su actividad enzimática.

Finalmente, cabe mencionar que este es el primer estudio en cisticercos de *T. crassiceps* en donde se demuestra el efecto que tienen distintas concentraciones de

hidroperóxido de cumeno sobre la viabilidad y la producción de un ARNm específico para la Prx 2-Cys, enzima que inactiva este tipo de oxidantes, sugiriendo que esta enzima es importante en la defensa antioxidante que este parásito presenta en contra las ERO.

7 CONCLUSIONES

- Se montó el modelo para la reproducción de cisticercos de *T. crassiceps* en ratones BALB/cAnN.
- Los cisticercos de *T. crassiceps* cultivados en medio RPMI resisten 2.5 mM de HCu por 30 minutos.
- La mayoría de los cisticercos de ratones con infecciones mayores a 5 meses son dañados por la respuesta inmune del hospedero, sin embargo siempre existe una población resistente que puede transmitir la infección.
- El HCu incrementa la expresión del ARNm para la Prx 2-Cys en cisticercos de *T. crassiceps*.
- Es necesario realizar estudios en donde se utilicen otros genes de mantenimiento que se mantengan constantes en su expresión tales como la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o Triosa fosfato isomerasa.

8 PERSPECTIVAS

Los estudios realizados en esta tesis abren la posibilidad de continuar conociendo el papel de esta enzima en la fisiología de los céstodos. Por otro lado, permitirá realizar estudios de este gen en *T. crassiceps*, para avanzar en el conocimiento de su regulación e interacción con otros sistemas antioxidantes del parásito.

9 ANEXOS

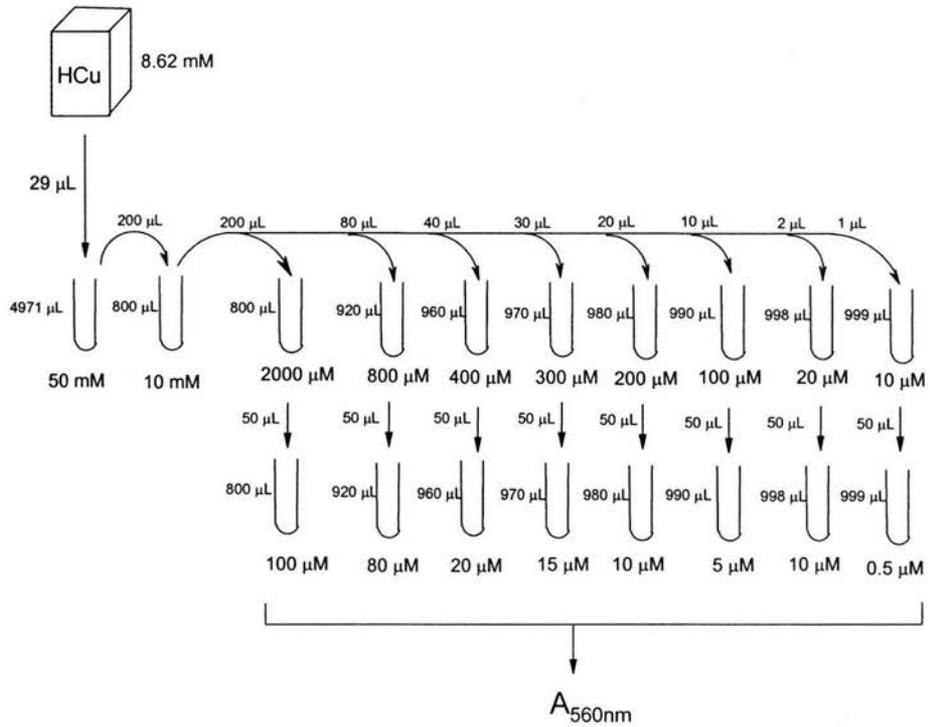
I. Esquemas de las diluciones empleadas en los ensayos de detección de peróxido

por el método FOX-1

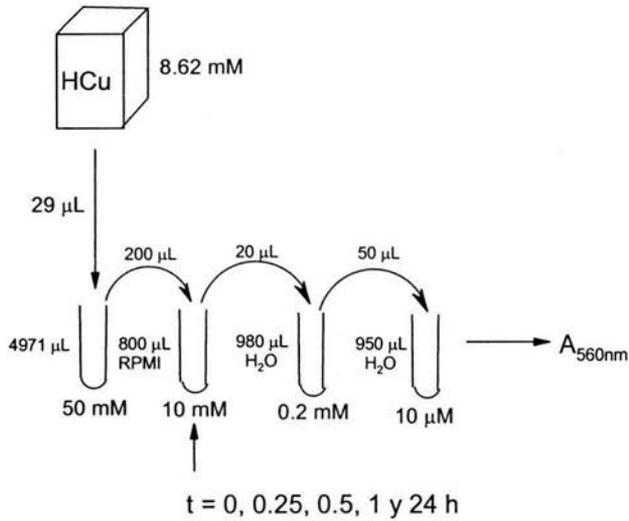
a) Curva patrón

Hidroperóxido de cumeno 80%

$$\left(\frac{1\text{ mol}}{152.2\text{ g}}\right)\left(\frac{100\text{ mL}_{\text{H}_2\text{O}}}{80\text{ mL}_{\text{HCu}}}\right)\left(\frac{1.05\text{ g}}{1\text{ mL}_{\text{H}_2\text{O}}}\right) = 8.62 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{mL}} = 8.62\text{ M}$$



b) Absorbancia de una muestra hidropéroxido de cumeno 10 mM disuelto en RPMI a diferentes tiempos



II. Secuencia del transcrito de la Prx 2-Cys

SECUENCIA DE DNA; 215 BP.

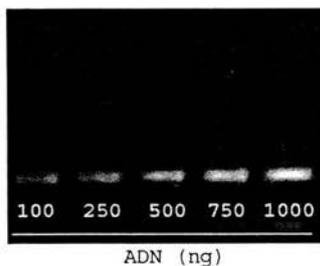
DE CLONA 1 EN pBS fg de 2-Cys Prx (Oligos Prx 2-Cys A y B) Templado
 cdNA *Taenia crassiceps*, Secuenciados con M13REV y M13F

CGCGTCTCTTTATCATTGATGATAAGGGGATCTGCGTCAAATTACCATCAACGATTTGCCCGTTGGTCGC
 R G L F I I D D K G D L R Q I T I N D L P V G R

TGCGTGGATGAGGCTCTGCGCCTTCTGGACGCCTTCCAGTTCACGGATAAGCATGGCGAGGTTGCCCGCC
 C V D E A L R L L D A F Q F T D K H G E V C P A

AATTGGCGCCTGGATCAAAGCTTTCAAACCGAATGCGGGTGATTGAAGTCGTTTCATGAGCTCAAGATAG
 N W R P G S K A F K P N A G D L K S F M S S R -

III. Curva de ADNc puro amplificado para la Prx 2-Cys ($R^2 = 0.9924$)



Datos

Curva

DNA (ng)	Intensidad neta
100	29084.04
250	37773.15
500	51522.58
750	71524.98
1000	82039.23

	Hcu (mM)	DNA (ng)
Prx	0	694.8
	2.5	156.8
	5	92.64
	7.5	1106
	10	495
	15	182.1
ACT	0	1344
	2.5	162.1
	5	398
	7.5	1329
	10	1237
	15	792

REFERENCIAS

- ¹ Organización Panamericana de la Salud 1994. Epidemiología y control de la cisticercosis en América Latina. Washington DC: OPS/OMS; 25.
- ² Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica*; 87: 43-51.
- ³ W. Raether, H. Hänel 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol Res*; 91: 412-438
- ⁴ Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, *et al* 1990. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg*; 43: 194-99.
- ⁵ Lamonthe AR. & García P 1988. Helminthiasis del hombre en México Edit. AGT editor S.A., México.
- ⁶ García H, González A, Evans C, Gilman R 2003. Cysticercosis. *The Lancet*; 361:547-54.
- ⁷ Flisser A 1994. Taeniasis and cysticercosis due to *T solium*. En: Sun T, ed. *Progress in clinical parasitology*. New York: CRC Press; 77-116.
- ⁸ Beaver PCh, Jung RC, Cupp EW 2003. *Parasitología Clínica de Craig Faust*, 3ª Ed. Editorial Masson Doyma México.
- ⁹ Lumsden RD 1975. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp Parasitol*; 37: 267-339.
- ¹⁰ Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K 1998. *Tania solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol*; 84: 681-85.
- ¹¹ Webbe G, 1994. Human cisticercosis: Parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. *Pharmac Ther*; 64: 175-200.
- ¹² Nash TE, Neva FA 1984. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N Engl J Med*; 311: 1492-96.
- ¹³ Yoshino K 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*: III on the development of *Cysticercus cellulosae* within the definitive intermediate host. *J Med Assoc Formosa*; 32: 166-69.
- ¹⁴ Tay-Zavala J, Lara-Aguilera R 1992. *Parasitología Médica*: 197-217.
- ¹⁵ Landa A, Lacllette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker C 1993. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol*; 60(2): 343-7.
- ¹⁶ White AC Jr, Robinson P, Kuhn R 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol*; 66: 209-30.
- ¹⁷ P. Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgonio B, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL 2004. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res*; 92: 197-204.
- ¹⁸ Arechavaleta F, Molinari J L, Tato P 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res*; 84: 117-22.
- ¹⁹ Molinari JL, *et al* 2000. *Taenia solium*: A Cystein Protease Secreted by Metacestodes Repletes Human CD4 Lymphocytes *in Vitro*. *Exp Parasitol*; 94: 133-42.
- ²⁰ McManus DP, Lamsam S 1990. *Taenia crassiceps* surface immunoglobulins: Parasite or host-derived? *Parasitology* 101: 127-137.
- ²¹ Hermanek J, Prokopic J 1989. Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. *Folia Parasitologica*; 36: 331-40.
- ²² Hammerberg B, Williams JF 1978. Interaction between *Taenia taeniaeformis* and the complement system. *Journal of Immunology* 120: 1033-1038.
- ²³ Ambrosio J, Landa A, Merchant MT Lacllette JP 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research* 25: 325-330.
- ²⁴ Vibanco-Perez N, Jimenez L, Mendoza-Hernández G, Landa A 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res*; 88: 398-404.
- ²⁵ Plancarte A, Rendon JL, Landa A 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol Res*; 93: 137-144.

- ²⁶ García-Castellanos A, Jiménez L, Landa A 2002. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol*; 32: 1175-82.
- ²⁷ García HH, Gonzalez AE, Evanz CA, Gilman RH 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet*; 361: 547-56.
- ²⁸ Allan JC, Avila G, García Noval J, Flisser A, Craig PS 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*; 101(3):473-7.
- ²⁹ Chapman A, Vallejo V, Mossie KG, Ortiz D, Agabian N, Flisser A 1995. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J Clin Microbiol*; 33(5):1283-8.
- ³⁰ Allan JC, Wilkins PP, Tsang VC, Craig PS 2003. Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Trop Jun*; 87(1): 87-93.
- ³¹ Robles C, Chavarria Chavarria M 1979. [Report of a clinical case of cerebral cysticercosis treated medically with a new drug: praziquantel]. *Salud Publica Mex*; 21: 603-18.
- ³² Sotelo J, Escobedo F, Rodríguez-Carbajal J, Torres B, Rubio-Donnadieu F 1984. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N Engl J Med*; 31: 1001-07.
- ³³ Escobedo F, Penagos P, Rodríguez J, Sotelo J. Albendazole therapy for neurocysticercosis 1987. *Arch Intern Med*; 147: 738-41.
- ³⁴ García HH *et al* 2002. Current Consensus Guidelines for Treatment of Neurocysticercosis *Clin Microbiol Rev*; Vol 15, No 4: 747-56.
- ³⁵ Sarti E, Rajshekhar V 2003. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Tropica* 87:137-43.
- ³⁶ Sies H 1985. Oxidative stress: introductory remarks. En *Oxidative Stress* (Sies H) pp. 1-8, Academic Press, London.
- ³⁷ Cadenas E 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79-110.
- ³⁸ Southorn PA, Powis G 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*; 63: 381-9.
- ³⁹ Cross AR, Jones OT 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*; 1057: 281-98.
- ⁴⁰ Sies H 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*; 215: 213-9.
- ⁴¹ Fridovich I. Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen? 1999. *Ann N Y Acad Sci*; 893: 13-28.
- ⁴² Davies K J A 2000. An Overview of Oxidative Stress *IUBMB*; 50:241-44.
- ⁴³ Callahan HL, Crouch RK, James ER 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today*; 4: 218-25.
- ⁴⁴ Henkle-Dührsen K, Kampkötter A 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodos. *Molecular & Biochemical Parasitology*; 114: 129-142.
- ⁴⁵ Wood Z. A. *et al* 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* Vol. 28; 1: 32-40.
- ⁴⁶ Kim K *et al* 1988. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*; 263: 4704-11.
- ⁴⁷ Kim IH, Kim K, Rhee SG 1989. Induction of an antioxidant protein of *Sacharomices cerevisiae* by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 6018-22.
- ⁴⁸ Hofmann B *et al* 2002. Peroxiredoxins. *Biol Chem*; 383: 347-64.
- ⁴⁹ Link AJ *et al* 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 18, 1259-1313.
- ⁵⁰ Moore RB *et al* 1991. Reconstitution of Ca²⁺-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 266, 18964-18968.
- ⁵¹ Chae, H.Z. *et al.* (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract*; 45 (2-3): 101-112.
- ⁵² Chae H Z, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxidoreductase and thiol-specific antioxidant de. ne a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7017-7021.
- ⁵³ Kang SW, Baines IC, Rhee S G 1998. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273, 6303-6311.
- ⁵⁴ Matsumoto A, Okado A, Fujii A, Fujii T, Egashira M, Nukawa M, Taniguchi N 1999. Cloning the peroxiredoxine gene family in rats and characterization of the fourth member. *FEBS Lett*; 443: 246-50.

- ⁵⁵ Ellis HR, Poole LB 1997. Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 36, 15013–15018.
- ⁵⁶ Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE 1998. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 400–406.
- ⁵⁷ Fujii J, Ikeda Y 2002. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep*; Vol 7 No 3: 123–30.
- ⁵⁸ McGonigle S, Dalton JP, James ER 1998. Peroxidoxins: A New Antioxidant Family. *Parasitol Today*; vol 14 no 4: 139–45.
- ⁵⁹ Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER 1999. A family of novel peroxidases, peroxiredoxines. *Biofactors*; 10: 207–9.
- ⁶⁰ Lim YS, Cha MK, Yun CH, Kim HK, Kim K, Kim IH 1994. Purification and characterization of tiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: a new type of antioxidant protein. *Biochem Biophys Res Commun*; 199: 199–206.
- ⁶¹ Lyu MS, Rhee SG, Chae HZ, Lee TH, Adamson MC, Kang SW, Jin DY, Jeang KT, Kozak CA 1999. Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences. *Mamm Genome*; 10: 1017–9.
- ⁶² Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, Fung PC, Kung H, Jin DY 2000. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:921–927.
- ⁶³ Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM 1997. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 272: 30615–30618.
- ⁶⁴ Kim T S, Sundaresh CS, Feinstein SI, Dodia C, Skach WR, Jain MK, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Nomura N, Fisher AB 1997. Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca²⁺ independent phospholipase A₂ and properties of the expressed protein. *J. Biol. Chem.* 272, 2542–2550.
- ⁶⁵ Chen JW, Dosa C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB 2000. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *J Biol Chem*; 275: 28421–7.
- ⁶⁶ Freeman RS 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) *Rudolphi*, 1810 (Cestoda), *Can. J. Zool*; 40: 969–990.
- ⁶⁷ Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T, Sciuotto E 1996. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology*; 112: 119–124.
- ⁶⁸ Culbreth KL, Esch GW, Kuhn RE 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of ¹⁴C-leucine. *Exp Parasitol* 32:272–281.
- ⁶⁹ Sciuotto E *et al* 1990. Cisticercosis vaccine: cross-protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cisticercosis. *Parasite Immunol*; 12: 687–696.
- ⁷⁰ Toledo A, Cruz C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Kubli-Garfias C, Vazquez L, Terrazas I, Sciuotto E 1999. Towards a *Taenia solium* cisticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cisticercosis. *Infect Immun*; 67: 2522–2530.
- ⁷¹ Sciuotto E *et al* 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cisticercosis along with a prominent T1 response. *Infection and Immunity*; 69 (3): 1766–73.
- ⁷² Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA 2004. Intrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/c mice. *J Parasitol*; 90(1): 79–84.
- ⁷³ Wolf S 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xilenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*; 233: 182–9.
- ⁷⁴ Chomczynski P, Sacchi N 1987. *Anal Biochem* ; 162 : 156.
- ⁷⁵ Callahan HL, Crouch RK, James ER 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today*; 4: 218–25.
- ⁷⁶ Bogdan C, Martin Rölinghoff M, Diefenbach A 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*; 12:64–76.
- ⁷⁷ Callahan HL, Crouch RK, James ER 1990. Hydrogen peroxide is the most toxic species for *Onchocerca cervicalis* microfilariae. *Parasitology*; 100:407–15.
- ⁷⁸ Freudenstein-Dan A, Gold D, Fishelson Z 2003. Killing of Schistosomes by enastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated Schistosome killing. *J Parasitol*; 89 (6): 1129–35.

-
- ⁷⁹ Test ST, Weiss SJ 1984. Cuantitative ant temporal characterization of extracelular H₂O₂ generated by human neutrophils. *J Biol Chem*; 259: 399-405.
- ⁸⁰ Sciotto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 77: 243-246.
- ⁸¹ Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebbersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., and Lunardi, J 2002. *J. Biol. Chem.* 277, 19396-19401.
- ⁸² Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee SG 2003. *Science* 300, 653-656.
- ⁸³ Wedi B, Straede J, Wieland B, Kapp A 1999. Eosinophil apoptosis is mediated by stimulators of cellular oxidative metabolisms and inhibited by antioxidants: Involvement of a tlo-sensitive redox regulation in eosinophil cell death. *Blood*; 94: 2365-73.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA