

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

"CLONACION, CARACTERIZACION Y EXPRESION
DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA DE *Taenia solium*
Y SU EVALUACION PROTECTORA EN CONTRA
DE LA CISTICERCOSIS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
D O C T O R E N C I E N C I A S
P R E S E N T A :
BIOL. ALEJANDRO CASTELLANOS GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA



MEXICO, D. F.

2005

m. 341238



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.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra. Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 35333-M, "Desarrollo de inhibidores específicos contra *Taenia solium*", por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y por el programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN210603-03, "Enzimas del metabolismo destoxicante blancos para el desarrollo de nuevos inhibidores contra *Taenia solium*". Así mismo, el autor de este trabajo recibió una beca para la realización de sus estudios de doctorado del programa de becas de Doctorado del CONACyT.

Con mucho cariño a la memoria de mi Padre.

Gracias por guiarme y enseñarme a jugar el juego más importante....el juego de mi vida.

A mi mama... por su amor incondicional que siempre me ha respaldado.

A mis hermanos y familia.

AGRADECIMIENTOS.

Por sus valiosos comentarios Y sugerencias que ayudaron a la realización de este trabajo agradezco enormemente a los Doctores: Armando Gómez Poyou, Edda Scitutto Conde, Maria Eugenia Gonssebatt Bonaparte, Marco Antonio Cerbon Cervantes, Eduardo García Zepeda, Teresa Imelda Fortul Van Der Goes.

Al Dr. Landa por permitirme expresar mis ideas y por ser mi tutor durante todo este tiempo. A la Dra. Patricia Tato Zaldivar y al Dr. José Pedraza Chaverri por su gran apoyo como parte de mi comité tutorial. A la Dra. Lucia Jiménez por su colaboración y a todos los miembros del laboratorio por los momentos gratos compartidos. Al Dr. Juan Molina y Juanita por su valiosas enseñanzas.

A todos los que de alguna u otra forma formaron parte de mi vida durante la realización de mi Doctorado: Laura, Emilio, Luis, Carlos, Xavier, Ara, Josué, Francisco, Octavio, Lennin, Ángela y Evelin.

A los de España gracias por enseñarme a ver otra perspectiva de la vida: Miriam, Carlos, Álvaro (Madrid), David (Valencia), Cristian, Manu, Gema, Arantxa, Dani (Cataluña), Maria, Eva, Asun, Jose. Los de novela: Fabián, Eva, Maria Ángeles, Laura, Alberto y a Chuck Norris.

A los del resto del mundo por que juntos vivimos, crecimos, nos divertimos y conocimos el apasionante mundo de los parásitos: Hilda (Perú), Eri (Colombia), Claribel (Bolivia), Eli (Bolivia), Álvaro (Colombia), Vivi y Nora (Argentina), Maria Ángeles y Ana Laura (México) y Olguita Chang (Guatemala).

Por su amistad, al buen Richi (Bristol, U.K), al Donald (Irish) y a todos los del Saint Nicholas de Buenos Aires.

A Chuck y a Patrick por su confianza y por permitirme realizar una estancia en su laboratorio en Massachussets. A Tara y David por adoptarme como parte de su familia durante mi estancia en E.U. A Laura por hacer un gran esfuerzo para compartir conmigo un poco de esta aventura.

Al Dr. Gen...por seguir soñando.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	2
1.1.- CARACTERÍSTICAS DE <i>T. solium</i>	2
1.2.- CICLO DE VIDA DE <i>T. solium</i>	4
1.3.- CISTICERCOSIS HUMANA	4
1.3.1 DIAGNÓSTICO	6
1.3.2 TRATAMIENTO	7
1.4.- CISTICERCOSIS PORCINA	8
1.5.- TAENIOSIS	8
1.5.1 DIAGNÓSTICO	8
1.5.2 TRATAMIENTO	9
1.6.- EPIDEMIOLOGÍA	9
1.7.- CONTROL DE LA CISTICERCOSIS	9
1.7.1 TRATAMIENTO MASIVO EN HUMANOS	9
1.7.2 DESARROLLO ECONÓMICO	10
1.7.3 CAMPAÑAS EDUCATIVAS	11
1.7.4 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN CERDOS	11
1.7.5 VACUNACIÓN EN CERDOS	12
2.- ANTECEDENTES	14
2.1.- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO	14
2.2.- ESTALLIDO RESPIRATORIO	14
2.3.- MECANISMOS ANTIOXIDANTES EN HELMINTOS	15
2.4.- SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN LOS HELMINTOS	15
3.- HIPÓTESIS	19
4.- OBJETIVO GENERAL	20
5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6.- METODOLOGÍA	22
6.1.- OBTENCIÓN DE PARÁSITOS Y DE EXTRACTOS CRUDOS	22
6.2.- DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	22
6.3.- OBTENCIÓN DE RNA TOTAL	22
6.4.- REACCIONES DE PCR	23
6.5.- PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PERLAS DE VIDRIO	23
6.6.- OBTENCIÓN DE UNA Sonda DE DNA	23
6.7.- AISLAMIENTO DE CLONAS	24
6.8.- PURIFICACION DEL DNA A PARTIR DE LOS FAGOS	24
6.9.- DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	25
6.10.- REACCIÓN DE RELLENADO (KLENOW REACTION)	25
6.11.- LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	26
6.12.- PREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	26

6.13.- REACCIONES DE SECUENCIA	26
6.14.- PREPARACIÓN DE cDNA	27
6.15.- PREPARACIÓN DE DNA GENÓMICO	27
6.16.- SOUTHERN BLOT	28
6.17.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA	28
6.18.- DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR	29
6.19.- PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS	29
6.20.- ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO (PAGE-SDS) E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET).	30
6.21.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y EFECTO DEL SDS Y H ₂ O ₂ SOBRE LA SOD MEDIANTE EL SISTEMA DEL NBT	30
6.22.- ENSAYO DE ACTIVIDAD (xantina/xantina oxidasa)	31
6.23.- INHIBICIÓN CON ANTICUERPOS Y FÁRMACOS ANTIHELMINTICOS	31
6.24.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SOD	31
6.25.- ESTUDIOS DE ESTRÉS OXIDATIVO <i>in vitro</i>	31
6.26.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN EN EL MODELO <i>Taenia taeniaeformis/rata</i>	32
6.27.- ENSAYOS DE ELISA	32
7.- RESULTADOS	32
7.1.- OBTENCIÓN DE UNA SONDA Y AISLAMIENTO DE CLONAS	32
7.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS	33
7.3.- OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA	34
7.4.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA	34
7.5.- CARACTERIZACIÓN DE LA SOD-Cu/Zn DE <i>T. solium</i>	38
7.6.- INHIBICIÓN CON FÁRMACOS ANTIHELMINTICOS	43
7.7.- INMUNOLOCALIZACIÓN E INMUNOELECTROTRANSFERENCIAS (IET) DE LA SOD-Cu/Zn de <i>T. solium</i> .	43
7.8.- ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO	48
7.9.- ENSAYO DE VACUNACIÓN Y DETERMINACIÓN DE IgGs	48
8.- DISCUSIÓN	53
9.- CONCLUSIONES	62
10.- BIBLIOGRAFÍA	63
11.- ARTICULO	69

RESUMEN.

La cisticercosis es una enfermedad causada por el establecimiento de las larvas del parásito *Taenia solium* en distintos órganos de sus hospederos intermediarios, el cerdo y el humano. La neurocisticercosis humana es el padecimiento más grave ocasionado por este parásito y constituye un importante problema de salud pública en países en vías de desarrollo. Todos los organismos aerobios incluido *T. solium* son susceptibles a la oxidación producida por las especies reactivas de oxígeno (EROs) como el radical superóxido (O_2^{\bullet}). Estas moléculas pueden ser producidas por células del sistema inmune como un mecanismo efector en contra de los parásitos. Diversos investigadores han sugerido que los parásitos son capaces de evadir el daño producido por las EROs gracias a la acción de enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas (SODs). El estudio de estas enzimas es muy importante, ya que su inactivación mediante mecanismos inmunológicos o farmacológicos podría ayudar al hospedero a la destrucción de *T. solium*. En el presente trabajo se aisló y caracterizó un cDNA que codifica para la enzima superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD Cu/Zn) del cisticerco de *T. solium*. La secuencia de nucleótidos mostró un marco abierto de lectura de 559 pares de bases que codifican para una proteína de 552 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 15,588 kDa. Se identificaron todos los sitios esenciales para la actividad catalítica de una enzima SOD de tipo Cu/Zn y mediante un alineamiento múltiple se encontró un elevado porcentaje de identidad respecto a otras SODs. La secuencia obtenida fue clonada para su producción en el vector de expresión pRSET, obteniéndose un producto de 16 kDa. La SOD fue purificada mediante dos cromatografías de intercambio iónico (DEAE). Se determinaron las características bioquímicas de la proteína y se demostró que esta enzima presenta una actividad de 2,941 u/mg. El tiabendazol y el albendazol inhiben totalmente la actividad de la enzima de *T. solium* a concentraciones de 0.5 mM y 0.3 mM respectivamente, mientras que a las mismas concentraciones no se observa ningún efecto en una SOD del mamífero *Bos taurus*. Experimentos *in vitro* mostraron que los cisticercos son capaces de sobrevivir en altas concentraciones de superóxido (O_2^{\bullet}) generados en un sistema de xantina-oxidasa/acetaldéhid. Estudios de inmunohistoquímica indican que la SOD se localiza principalmente en el tegumento y células subtegumentales del parásito. También se demostró que anticuerpos anti-SOD de *T. solium* no cruzan con otras SODs. Finalmente, experimentos de vacunación realizados en un modelo de laboratorio *T. taeniaeformis/rata* muestran que la SOD confiere protección parcial (60%) en contra de la cisticercosis en ratas inmunizadas con 20 µg de la SOD-Cu/Zn de *T. solium*. Estos resultados sugieren que la inactivación de esta enzima podría causar daño al parásito, por lo que podría ser usada como blanco en el desarrollo de fármacos y vacunas para este parásito.

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- CARACTERÍSTICAS DE *Taenia solium*.

La *Taenia solium* (Lineaeus, 1758) es un organismo parásito que pertenece al Phylum de los Platelminos, particularmente a la clase de los cestodos (Flisser y Malagón, 1989). El adulto de *T. solium* es un gusano largo y aplanado que se aloja en el intestino delgado del humano. En su extremo anterior el gusano presenta una estructura piriforme llamada escólex, dicha estructura se caracteriza por poseer 4 ventosas laterales y un rostelo central formado por una doble corona de ganchos (14 a 16) de aproximadamente 100-160 μ . Cabe señalar que tanto el rostelo como las ventosas funcionan como órganos de fijación que permiten el anclaje del parásito en el intestino del humano. Debajo del escólex se encuentra el cuello, el cual está compuesto por una región de tejido proliferativo que da origen una serie de segmentos encadenados o proglótidos que a su vez forman la mayor parte del cuerpo a la que se denomina estróbilo. Los proglótidos cercanos al cuello son inmaduros e indiferenciados, mientras que los más distantes son progresivamente maduros hasta llegar final del cuerpo donde se encuentran los proglótidos grávidos que contienen miles de huevos infectivos. El tamaño del estróbilo usualmente es de entre 2 y 3 m con aproximadamente 800-1000 proglótidos, aunque se han llegado a encontrar parásitos hasta de 7 metros de longitud (Sciutto y cols. 2000)

La mayoría de los tejidos en los cestodos son de naturaleza sincicial, mostrando numerosas conexiones entre diferentes estructuras especializadas. El tegumento está formado por una capa citoplasmática que contiene microvesículas y mitocondrias, esta capa está delimitada por una membrana externa con pequeñas terminaciones alargadas denominadas microtricas. La superficie de las microtricas está cubierta por un glicócalix. La membrana interna se encuentra sobre un basamento compuesto por una membrana fibrosa, por debajo de este tejido fibroso se encuentran células musculares y unas estructuras citoplasmáticas denominadas citones que se conectan al tegumento mediante extensiones citoplasmáticas. Los citones sintetizan proteínas y otros componentes de la superficie que son exportados al tegumento en forma de vesículas a través de las extensiones citoplasmáticas (Flisser y cols. 1997).

El parásito no presenta aparato respiratorio ni aparato digestivo y el sistema nervioso es poco desarrollado observándose agrupamientos de células nerviosas en el escólex y una serie de terminaciones sensoriales a lo largo del cuerpo (Flisser y cols. 1997). Por carecer de aparato digestivo, la captación y digestión del alimento se lleva a cabo en el sincicio celular del tegumento, el cual absorbe por difusión o transporte activo moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Flisser y Malagón, 1989). El sistema excretor es protonefridial y consiste en un complejo de canales tubulares conectados en red, algunos de los cuales terminan en células flamíferas. Además *T. solium* posee pequeñas

estructuras minerales denominadas corpúsculos calcáreos que están asociadas a los ductos excretores. La función del sistema protonefridial en los cestodos aun no esta bien definida pero en general se cree que su función principal consiste en la remoción y excreción de productos de desecho producidos durante el metabolismo del parásito (Sciutto y cols. 2000).

Estos organismos son hermafroditas. El aparato masculino consiste en un conducto eyaculatorio con numerosos testículos que se conectan con un espermiducto. Uno de los extremos del espermiducto forma una estructura copuladora denominada cirro, el otro extremo junto con la vagina se conectan a un poro genital. El extremo de la vagina termina en un receptáculo seminal el cual a su vez se conecta con un oviducto. Los ovocitos maduros salen hacia el ovario a través del oviducto y es ahí donde se lleva a cabo la fertilización. Posteriormente las células de la glándula vitelina migran a través de un ducto vitelino para asociarse con el cigoto. Ahí, unas glándulas unicelulares, llamadas glándulas de Mehlis rodean el ovotipo, recubriendo el cigoto con secreciones serosas y mucosas que presumiblemente sirven como substrato para la formación del embrióforo. En el útero, el huevo se desarrolla hasta completar la embrionización. Finalmente los huevos infectivos son almacenados hasta que los proglótidos grávidos son liberados al medio ambiente. Es importante hacer notar que las ramificaciones del útero en los proglótidos maduros sirven para diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata*. Generalmente los proglótidos grávidos miden aproximadamente 12 x 6 mm y poseen un útero con 7-10 pares de ramificaciones laterales conteniendo tanto los testículos como el ovario (Flisser y cols. 1997).

Los huevos miden entre 30-45 μm y contienen una oncosfera, también conocida como embrión exacanto debido a que contiene en su interior 6 ganchos. El embrión está rodeado por varias envolturas protectoras, la más externa se denomina embrióforo y esta compuesta por bloques unidos por una sustancia cementante. La digestión de la sustancia cementante por la acción de las enzimas proteolíticas disgrega los bloques del embrióforo, entonces una señal que aparentemente consiste en un incremento de la permeabilidad de la membrana oncosférica promueve la activación de la oncosfera que una vez activada rompe su membrana y penetra la pared del intestino (Laclette y cols. 1982).

Los metacestodos de *T. solium* o cisticercos están formados por una vesícula translúcida rellena de fluido que en su interior contiene invaginado un pequeño escólex. El escólex posee las cuatro ventosas y el rostelo como en el gusano adulto. El cisticerco es de forma redonda y color blanquecino, mide alrededor de 0.5 a 2 cm, la vesícula está compuesta por un tegumento externo debajo del cual se encuentran células subtegumentales, células musculares de tipo liso y células flamíferas. Además suele presentar una gran cantidad de corpúsculos calcáreos (Flisser y cols. 1997).

1.2.- CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*.

Durante el ciclo de vida de este parásito (Fig. 1) los proglótidos grávidos o los huevos de *T. solium* son expulsados al medio ambiente junto con la materia fecal de humanos infectados con el gusano adulto. Cada proglótido grávido contiene de 30,000 a 50,000 huevos y alrededor del 50% de estos huevos contienen oncosferas potencialmente infectivas. El ciclo continúa cuando los cerdos o los humanos ingieren agua o alimentos contaminados con huevos de *T. solium*. Las oncosferas contenidas en los huevos son liberadas en el sistema digestivo del humano o del cerdo por acción de los fluidos gastrointestinales. Una vez activadas las oncosferas atraviesan la membrana intestinal para pasar al torrente sanguíneo, de ahí son transportadas al tejido muscular o hacia otros órganos del hospedador. Una vez que se han establecido las oncosferas, en aproximadamente 2 o 3 meses se desarrollará el estadio de cisticerco, durante este tiempo los cisticercos alcanzarán su tamaño definitivo de alrededor de 1 cm. El ciclo es completado cuando la carne de cerdo infectada con cisticercos viables es ingerida por el humano. El escólex evagina en el aparato digestivo en respuesta a sales biliares y a la tripsina. Posteriormente, el gusano se ancla a la superficie del intestino delgado y empieza su desarrollo llegando al estadio adulto en un tiempo de 5 a 12 semanas. Ya que el gusano adulto está totalmente desarrollado, espontáneamente expulsará entre 4 y 5 proglótidos por día, liberando así los huevos al medio ambiente para comenzar nuevamente con ciclo (García y cols. 2003). Por último, hay que hacer notar que en el caso de la cisticercosis humana, el hospedador solo actúa como hospedador paraténico, ya que en este caso el ciclo de vida no se completa debido a que los humanos comúnmente no practican el canibalismo.

1.3.- CISTICERCOSIS HUMANA

El padecimiento más frecuente y más grave causado por *T. solium* en Latinoamérica es la forma neurológica de la cisticercosis. Esta enfermedad es causada por el establecimiento de las formas larvales (cisticercos) en el sistema nervioso central del humano y es conocida como Neurocisticercosis (NC). Hay que señalar que el cisticerco también puede establecerse en otros sitios como el músculo esquelético en donde raramente causa síntomas y frecuentemente es desestimada para fines médicos y epidemiológicos (Sotelo 1997).

Los síntomas causados por la NC son heterogéneos y no específicos. Aproximadamente 30-40% de los casos son asintomáticos. Los casos sintomáticos pueden presentar cuadros con: dolores de cabeza, disnea, epilepsia, hipertensión intracraneal y en algunos casos demencia. El pleomorfismo clínico de la NC se debe a varios factores del parásito (localización, número y tamaño) y del hospedero (grado de la respuesta inmune y/o de la respuesta inflamatoria). (Sotelo y cols. 1998).

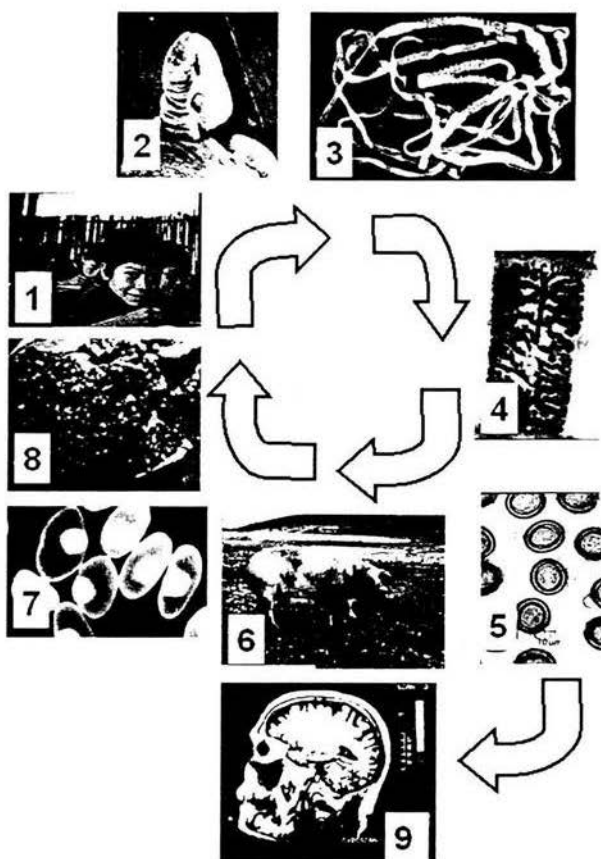


Figura 1.- Ciclo de vida de *T. solium*. 1. Los humanos (hospedador definitivo) ingieren carne de cerdo con cisticercos viables. 2. El parásito evagina en el aparato digestivo y se desplaza hacia el intestino delgado. 3. En alrededor de 14 semanas se desarrolla el gusano adulto. 4. Los proglótidos gravídeos son expulsados al medio ambiente junto con las heces. 5. Los proglótidos liberan los huevos contaminando el ambiente. 6. Los huevos son ingeridos por los cerdos (hospedador intermediario), ahí las oncosferas son activadas desplazándose al torrente sanguíneo. 7. Se desarrolla el estadio larvario conocido como cisticerco. 8. El ciclo se cierra cuando la carne infectada es consumida por el humano. 9. El humano se infecta con cisticercosis cuando ingiere huevos de *T. solium* participando solamente como hospedador paraténico (en ese caso el ciclo de vida no continua)

1.3.1. - DIAGNÓSTICO.

La obtención de neuroimágenes por Tomografía computarizada (TC) y Resonancia magnética (RM) constituyen las pruebas de elección para el diagnóstico de la neurocisticercosis. Ambas técnicas se pueden complementar entre sí, por lo que de ser posible es recomendable uso de ambas. La TC es muy utilizada para el estudio de las lesiones parenquimatosas ya que permite la distinción entre formas calcificadas y no calcificadas de NC, además indica la localización y la orientación de los cisticercos. Por otro lado la RM permite una mejor visualización de los cisticercos que se encuentran en la base del cerebro, de los ventrículos, del cordón espinal y de la fosa posterior. Además la RM permite una precisa evaluación de la reacción inflamatoria alrededor del parásito. El mejor contraste de la RM permite la detección de cisticercos que no se detectan mediante la TC, sin embargo la RM suele bajar su eficiencia para la detección de pequeñas calcificaciones y granulomas que son fácilmente detectados por la TC (Martínez H, 1989). Aunque estas técnicas son altamente efectivas se pueden llegar a presentar confusiones con patologías como tuberculomas, accesos bacterianos o fúngicos, quistes cancerosos, o quistes aracnoides congénitos (Sotelo y cols. 1997).

Diferentes técnicas han sido empleadas para la detección de anticuerpos en cerdos y humanos infectados con cisticercosis, entre estas técnicas podemos mencionar: la prueba de la fijación del complemento, la hemoaglutinación, la radioinmunodetección, el ensayo enzimático de inmunoabsorción (ELISA), el dipstick-ELISA, la prueba de aglutinación en látex y las técnicas de inmunoelectrotransferencia tipo western blot (Ferreira y cols. 1997; García y Sotelo 1991; Ito y cols. 1998; Miller y cols. 1984; Rocha y cols. 2002; Tsang y cols. 1989). En un principio, los antígenos usados en estos ensayos provenían tanto de fluido vesicular como de homogenados de cisticercos de *T. solium* o bien de extractos crudos provenientes de *T. crassiceps*. Estas mezclas de antígeno mostraban una sensibilidad moderada y una baja especificidad. (Schantz y Sarti, 1989; Fleury y cols. 2001). En este sentido se han realizado investigaciones enfocadas a determinar las propiedades antigénicas tanto del fluido vesicular como de las glicoproteínas asociadas a la superficie del cisticerco. Así pues, el avance en las técnicas de purificación ha permitido la optimización de algunas de estas técnicas (Gottstein y cols. 1986; Parkhouse y Harrison, 1987; Tsang y cols. 1989; Ito y cols. 1998). Sin embargo hay que señalar que hasta la fecha el método de detección más eficaz es el ensayo enzimático de inmunoelectrotransferencia desarrollado por Tsang y cols. (1989), donde 7 glicoproteínas purificadas a partir del cisticerco mediante una cromatografía de lentil-lectina producen una especificidad del 100% y una sensibilidad que va del 70 al 90%. Sin embargo se ha reportado una sensibilidad del 28% en casos donde se encuentra un solo cisticerco en el cerebro (Wilson y cols. 1991).

La detección de anticuerpos tiene dos importantes inconvenientes clínicos, primeramente la presencia de anticuerpos es solamente indicadora de

exposición a los antígenos, por lo tanto, no necesariamente los pacientes seropositivos se encuentran infectados con el parásito. Por otro lado también hay que señalar que los anticuerpos pueden persistir por largos periodos en el organismo una vez que la infección ha sido eliminada por el sistema inmune o por tratamiento farmacológico (Harrison y cols. 1989; García y cols. 1997). La detección de antígenos puede ser una alternativa para solucionar este problema. Diferentes ensayos han sido desarrollados en este sentido aunque solamente los que se basan en el uso de anticuerpos monoclonales han tenido relativo éxito en cuanto a la reproducibilidad y especificidad se refiere (Correa y cols. 1989; Brandt y cols. 1992; Choromanski y cols. 1990; Wang y cols. 1992; Erhart y cols. 2002). La detección de antígenos puede ser realizada tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo (LCR). La detección de antígenos en LCR resulta más apropiada que el uso de suero. Sin embargo las muestras de LCR resultan más complicadas de obtener respecto a las muestras de sangre. La sensibilidad para la detección de anticuerpos mediante el ELISA es alta, García y cols. (2000) reportaron una sensibilidad de 85%, la cual es una de las más altas reportadas hasta la fecha, sin embargo ese dato fue obtenido a partir de pacientes que eran positivos por inmunoelectrotransferencia. Además la sensibilidad en pacientes con un solo cisticerco vivo en el cerebro fue del 65% (García y cols. 2000). En cuanto a la especificidad hay que señalar que este tipo de ensayos presentan un bajo porcentaje de reacciones cruzadas respecto a otros parásitos, sin embargo estas pruebas no permiten diferenciar entre especímenes del género *Taenia* (Dorny y cols. 2003)

1.3.2. TRATAMIENTO.

El tratamiento quirúrgico de la NC ha ido decreciendo gradualmente desde la aparición del tratamiento farmacológico con drogas antihelmínticas. En México el albendazol es la droga de elección para el tratamiento primario de la NC, el 85% de los cisticercos localizados en el parénquima son destruidos totalmente con una sola dosis, mientras que el prazicuantel tiene una efectividad del 75%. Siguiendo el tratamiento se obtiene una efectividad del 95% con una segunda dosis de alguna de las dos drogas antes mencionadas (Del-Brutto y cols. 1993). También se ha demostrado que la mayoría de cisticercos subaracnoideos y ventriculares logran ser destruidos solamente con el uso del albendazol. El principal problema para el tratamiento de la NC es la aparición de reacción inflamatoria alrededor de los cisticercos que se encuentran en proceso de destrucción. Esta inflamación se ha asociado con la aparición de síntomas clínicos y puede ser causa de fibrosis en las meninges con una subsecuente hidrocefalia obstructiva. El control de la reacción inflamatoria es primordial, por lo tanto es recomendado dar a la par del tratamiento farmacológico un tratamiento anti-inflamatorio usando drogas como corticoesteroides. El protocolo de tratamiento (droga de elección, dosis, calendarios de suministro y tiempo de duración del tratamiento) con el antihelmíntico como con los corticoesteroides dependerán de la localización y número de los parásitos y de la respuesta inflamatoria que presente cada individuo (Sotelo y cols., 2000).

1.4.- CISTICERCOSIS PORCINA.

Los cerdos adquieren la cisticercosis por ingerir heces fecales contaminadas con huevos de *T. solium*. Aunque algunos cerdos pueden presentar infecciones masivas, la mayoría de los casos de cisticercosis porcina suelen ser asintomáticos, solamente en algunos casos se puede percibir una disminución de la actividad y movimientos involuntarios. Esto puede deberse a que frecuentemente los cerdos son sacrificados antes de los 12-15 meses de edad, lo cual representa poco tiempo para que los cisticercos en estado degenerado desencadenen síntomas como en el caso de los humanos (García y cols. 2003). La forma mas común para el diagnostico de la cisticercosis en cerdos vivos es la palpación de la lengua. Hasta la fecha no existen datos exactos de su prevalencia debido a la falta de un control sanitario efectivo en las zonas rurales. La crianza de cerdos de traspatio y el fecalismo al aire libre son factores que favorecen la infección de los cerdos (Flisser y cols. 1997).

1.5.- TAENIOSIS

Se denomina taeniosis a la enfermedad causada por el establecimiento de las formas adultas de *T. solium* en el intestino de los humanos (Flisser y Malagón 1989) La Taeniosis se caracteriza por ser una enfermedad generalmente de curso asintomático y solo en algunos casos se presentan síntomas ligeros como dolor abdominal, distensión, diarrea o nauseas. A pesar de no causar grandes daños al hospedador la Taeniosis constituye un importante problema para el control de la cisticercosis ya que los individuos portadores de gusanos adultos son los principales causantes de la diseminación de la cisticercosis humana y porcina.

1.5.1.- DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico morfológico de la teniosis se dificulta debido a la similitudes morfológicas entre los huevos de *T. solium* y *T. saginata*. En algunos raros casos el escólex es recuperado y la presencia de la doble corona de ganchos constituye una evidencia clara para la identificación de especies. También el número de ramificaciones en el útero son evidencia útil para la distinción entre *T. solium* (menos de 14 ramificaciones) y *T. saginata* (mas de 14 ramificaciones). Al igual que el escólex no siempre es posible encontrar proglótidos maduros en buen estado que permitan este tipo de análisis. Otra técnica que es empleada para la detección de huevos de Taenia el uso de la cinta de Graham, esta prueba es altamente sensible para la detección de *T. saginata* pero no así para *T. solium*. Actualmente la mejor prueba de detección de individuos teniosicos es mediante la detección de coproantígenos por ELISA, este método permite la detección de moléculas Taenia-especificas en las muestras fecales. El uso de coproantígenos ha mostrado una sensibilidad de alrededor del 95% y una especificidad del 99% además ha mostrado buenos resultados en estudios epidemiológicos (Allan y cols. 1996). Recientemente se han desarrollado métodos moleculares de DNA que permiten discriminar entre infecciones de *T. saginata* y *T. solium*. Por ultimo cabe agregar que también se

encuentran en desarrollo ensayos serológicos para la detección de la taeniosis (Wilkins y cols., 1999).

1.5.2.- TRATAMIENTO.

Existen dos drogas de para el tratamiento de la Taeniosis, el prazicuantel y la niclosamida. Comúnmente la niclosamida es el medicamento de elección ya que esta droga no es absorbida por el lumen intestinal, por lo tanto su efecto cestocida se lleva a cabo exclusivamente en el intestino. Contrariamente el prazicuantel si es absorbido y existe el riesgo latente de que cisticercos viables (asintomáticos) sean afectados por esta droga causando una exacerbación de la respuesta inmune ocasionando daño al SNC. El tratamiento usado comúnmente es una sola dosis oral de 2 g de niclosamida, y una dosis oral de 5 a 10 mg/Kg de prazicuantel. En algunos países la disponibilidad de estas drogas es limitado, lo cual dificulta el tratamiento (García y cols. 2003).

1.6.- EPIDEMIOLOGÍA.

La Taeniosis/Cisticercosis es una enfermedad que constituye un problema de salud pública en países subdesarrollados de Asia, África y Latinoamérica (WHO, 2002). Recientemente se ha observado un incremento en el número de casos en países desarrollados como Estados Unidos y España debido principalmente al desplazamiento de trabajadores emigrantes (portadores) de zonas endémicas hacia estos países (Roca y cols. 2003, White y cols. 2000). El incremento de casos también en parte, se debe a la eficiencia de los sistemas de salud pública que existe en dichos países, ya que el diagnóstico de la enfermedad es más eficaz respecto a otros países menos desarrollados (Schantz y cols. 1998). Datos recientes indican que en Estados Unidos se presentan alrededor de 1000 casos nuevos cada año (White y cols. 2000). En la mayoría de las poblaciones endémicas se observa que mas del 10% de la población es seropositiva para la cisticercosis (García-Noval y cols. 2001). Los porcentajes de taeniosis en México varían en un rango de 0.2 y 2.4% con un promedio de 1%, mientras que la presencia de anticuerpos anti-cisticercos varía en el rango del 3.7 al 12% dependiendo del autor (Flisser y cols. 2003), mientras que en un estudio realizado a nivel nacional se encontró una seroprevalencia de rededor del 1% (Larralde y cols. 1992). Los rangos de la cisticercosis porcina también varían, sin embargo algunos estudios realizados en poblaciones endémicas indican porcentajes que van del 30-60% (García y cols. 1999).

1.7.- CONTROL DE LA CISTICERCOSIS/TAENIOSIS.

1.7.1.- TRATAMIENTO MASIVO EN HUMANOS.

Con la introducción de drogas efectivas para el tratamiento de la taeniosis como el prazicuantel y la niclosamida, se sugirió que el tratamiento masivo en poblaciones endémicas podría constituir una estrategia viable para el control de esta zoonosis. Sin embargo, los estudios preliminares usando el tratamiento farmacológico en humanos no ha mostrado resultados consistentes y totalmente efectivos para la erradicación de esta enfermedad, probablemente

debido a las características particulares de las poblaciones que han sido tratadas, o por el tipo de cestocida suministrado o bien por el criterio de evaluación usado (Sarti y Rajsherkhar, 2003). En uno de estos estudios se incluyeron evaluaciones a 6 y 42 meses después de el tratamiento farmacológico. El estudio reveló que la quimioterapia usando 5mg/Kg de prazicuantel es capaz de reducir los niveles de taeniosis por lo menos en periodos de tiempo cortos. Sin embargo se determinó que el prazicuantel no es la droga ideal para el tratamiento de la taeniosis ya que dosis menores a 10mg/Kg. reducen su efectividad al 67% (Sarti y cols. 2000). Hay que señalar que el prazicuantel en dosis mayores a 10 mg/Kg muestra una eficacia del 100% como cestocida, pero a estas dosis existe el riesgo de producir reacciones adversas en casos de pacientes con cisticercosis asintomáticas, esto se debe a que el prazicuantel es una droga que atraviesa la barrera hematoencefálica y es capaz de actuar sobre los cisticercos localizados en sistema nervioso central pudiendo llegar a causar la muerte de los individuos. Es importante señalar que algunos de estos casos se han llegado a presentar en campañas de desparasitación masivas (con prazicuantel) que se han realizado en México (Flisser y cols 1994, Sarti y cols. 2000). La publicidad adversa por casos como el mencionado anteriormente hace difícil la implementación de este tipo de campañas ya que los casos aislados no pueden ser descartados totalmente. Sin embargo se ha sugerido que la niclosamida podría ser el medicamento de elección en futuras campañas de este tipo ya que esta droga es exclusivamente cestocida reduciendo los riesgos de reacciones secundarias. Otra ventaja de la niclosamida es su estabilidad en cuanto a su vida media y su estabilidad a temperatura ambiente ya que no se requiere de refrigeración como lo es en el caso de algunas vacunas. Se ha calculado que se requerirían 5 años o mas antes de que esta enfermedad pudiese ser controlada mediante el tratamiento farmacológico. Además hay que hacer notar que esta medida de intervención necesariamente tiene que ir acompañada de campañas informativas para enseñar a la población la adecuada disposición y eliminación de sus heces después de haber recibido el tratamiento ya que si las heces son accesibles a los cerdos se produciría un incremento en los niveles de cisticercosis (Sarti y Rajsherkhar, 2003).

1.7.2.- DESARROLLO ECONÓMICO DE LA POBLACIÓN.

La erradicación de *T. solium* en la mayoría de las ciudades europeas ha sido atribuida al desarrollo económico que se ha alcanzado en esa región durante los últimos años. Por lo tanto se han propuesto estrategias enfocadas a la mejora de instalaciones sanitarias, tecnificación de la porcicultura, implementación de un estricto y eficaz mecanismo de inspección para detectar y eliminar la carne de cerdo infectada, creación de infraestructura hospitalaria en zonas rurales, mejora de sistemas educativos, etc. Desafortunadamente esas medidas no son posibles en países subdesarrollados. Indudablemente el desarrollo económico de los países endémicos contribuiría enormemente al control de esta zoonosis (Sarti y Rajsherkhar, 2003).

1.7.3.- CAMPAÑAS EDUCATIVAS.

Las campañas educativas han mostrado ser un mecanismo eficaz en la prevención y control de diferentes enfermedades infecciosas. Diversos investigadores han sugerido que la participación de la comunidad y de los centros educativos es muy importante para el mantenimiento de las condiciones sanitarias e higiénicas. En México se han implementado este tipo de estudios en ciertas comunidades y se ha evaluado el efecto de estas medidas de intervención a corto y a largo plazo (6 y 42 meses) como mecanismo de control de esta zoonosis (Sarti y cols. 1997). En este estudio se demostró que la educación es una medida eficaz ya que después de 4 años de que la estrategia fue implementada no se detectaron cerdos infectados con cisticercosis en las comunidades estudiadas, hay que señalar que el porcentaje de cisticercosis porcina antes de iniciar el estudio era del 2.6%. También se observó un incremento en el conocimiento de la enfermedad en la población así como una reducción en el porcentaje de taeniosis y de humanos expuestos a la cisticercosis (determinados mediante estudios serológicos). Aunque la educación puede ser una medida permanente eficaz para controlar la cisticercosis, esta requiere de la activa participación de diversos sectores así como de la población, esto implica un elevado costo económico debido a la gran cantidad de personal requerido. Además hay que adicionar el costo de la infraestructura necesaria para aplicar este tipo de medidas, como por ejemplo la disposición de agua potable en zonas rurales, el suministro de materiales para la construcción de chiqueros o la construcción de letrinas, etc. (Sarti y cols. 1997).

1.7.4.- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN CERDOS.

El tratamiento masivo de cerdos podría ser otra alternativa viable para el control de la cisticercosis. Varios estudios realizados en Latino América han demostrado que algunas drogas cestocidas como el prazicuantel son útiles para el tratamiento de cerdos infectados con cisticercosis. El prazicuantel ha demostrado buenos resultados en estudios realizados en México en donde este fármaco ha sido utilizado a concentraciones de 50 mg/Kg durante 15 días y a 100, 50 o 25 mg/Kg en 3 dosis durante 1 día, después de 2 meses se ha observado que todos los cisticercos musculares son destruidos (Flisser y cols. 1990). Otro tratamiento farmacológico altamente eficaz es el que se ha aplicado en Perú donde el Oxfendazol ha mostrado una elevada efectividad utilizado concentraciones de 10, 20 o 30 mg/Kg en una sola aplicación. Transcurridos 2 meses después del tratamiento de 30 mg/Kg no se detectaron cisticercos viables (evaluados por evaginación) y transcurridos 3 meses los cisticercos musculares fueron destruidos totalmente, mostrando una eficacia del 100% (González y cols. 1998). En adición se ha reportado que cerdos infectados cisticercosis que han sido tratados con el fármaco presentan resistencia a la cisticercosis aún cuando los animales continúan expuestos a la infección, además hay que señalar que este fármaco es barato y no requiere de refrigeración. Este tipo de tratamientos requieren de supervisión sanitaria ya

que los cerdos no pueden ser sacrificados hasta después de los 3 meses de haber sido aplicado el tratamiento (Sarti y cols. 2003).

1.7.5.- VACUNACIÓN EN CERDOS.

Dado que el cerdo es el único hospedero intermediario dentro del ciclo de vida de *T. solium*, diversos investigadores han propuesto que la vacunación en cerdos podría ser una herramienta eficaz para el control de esta enfermedad. Los primeros estudios en este sentido fueron realizados inmunizando cerdos con extractos crudos y preparaciones antigénicas provenientes de cisticercos y oncosferas de *T. solium*, también. Estos estudios preliminares demostraron que era posible conferir inmunidad a los cerdos en contra de la cisticercosis (Molinari y cols. 1993, 1997, Nascimento y cols. 1995, Ito y cols. 1993).

A principios de los 90s en Australia se logró el desarrollo una vacuna basada en un antígeno recombinante (45W) en contra de la cisticercosis ovina causada por *T. ovis*, esta vacuna mostró niveles de protección de alrededor del 94% (Johnson y cols. 1989). Este fue el primer reporte donde se utilizó con éxito un antígeno definido como vacuna en una infección parasitaria. Algunos años después este mismo grupo logró la identificación de otros dos antígenos oncosferales denominados To18K y To16K, estos antígenos conferían una protección del 99% y 92% respectivamente en contra de la cisticercosis ovina (Harrison y cols. 1996). Los logros obtenidos con estos 3 antígenos motivaron investigaciones subsecuentes encaminadas a desarrollar nuevas vacunas, basándose principalmente en la posibilidad de encontrar antígenos homólogos para el 45w, To18K y T16K que pudiesen estar presentes en otras especies de *Tenias* causantes de cisticercosis. Así pues mediante técnicas de hibridación de DNA se identificaron secuencias homólogas para dichos antígenos en el genoma de *T. saginata* y *T. solium* (Benitez y cols. 1996, Gauci y cols., 1998, Gauci y Lightowlers, 2001). Estos homólogos fueron clonados y expresados para la producción de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina. Actualmente estos antígenos están siendo evaluados con éxito y resultados preliminares indican que el antígeno Ts18K es capaz de conferir una protección del 100% en cerdos infectados experimentalmente con cisticercos de *T. solium* (Flisser y cols. 2004).

También en los 90s, proteínas provenientes de *T. crassiceps* fueron identificadas y evaluadas como antígenos protectores en contra de la cisticercosis murina (Manoutcharian y cols. 1996). Basándose en la similitud antigénica de *T. solium* y *T. crassiceps* se sugirió que estos antígenos pudiesen ser usados para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina. Manoutcharian y cols. (1996) lograron la caracterización de las proteínas recombinantes provenientes de *T. crassiceps*. Posteriormente varios péptidos protectores fueron identificados a partir de las proteínas antes mencionadas, dichos péptidos han sido caracterizados y producidos sintéticamente (Toledo y cols. 1999, 2001). Recientemente una nueva vacuna sintética SPvac ha sido producida. La SPvac está basada en la combinación

de 3 péptidos sintéticos de 12, 18 y 6 aminoácidos compartidos por *T. solium* y *T. crassiceps*. Recientes experimentos realizados en comunidades rurales de México han demostrado que la SPvac reduce en un 52.6% la prevalencia de la cisticercosis adquirida en condiciones naturales y es capaz de reducir hasta en un 98.7% la intensidad de la infección tomando en cuenta la viabilidad de los cisticercos (Huerta y cols. 2001).

2.- ANTECEDENTES.

2.1.- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Los radicales libres (RL) se definen como aquellas moléculas que dentro de su estructura contienen al menos un electrón sin aparear, esta característica convierte a los RL en moléculas capaces de transferir electrones hacia otras moléculas o bien en moléculas que aceptan electrones provenientes de otras moléculas. Estas modificaciones pueden tener efectos negativos sobre las moléculas afectadas (DNA, proteínas o lípidos) ya que al oxidarse o reducirse, dichas moléculas pierden su función biológica causando daño al organismo. Además, cuando el daño oxidativo no es frenado se produce una reacción en cadena (de amplificación) en donde a partir de un radical libre se pueden generar otros RL inclusive más tóxicos que los RL originales. Sin embargo, es importante señalar que la participación de los RL es de suma importancia para que se lleven a cabo procesos biológicos como la transcripción, la apoptosis, la fosforilación oxidativa, etc. (Rice-Evans y Burdon 1994)

En la naturaleza el oxígeno puede tener diferentes conformaciones, por ejemplo se le puede encontrar en la forma de dióxigeno (O_2), de ozono (O_3) o de superóxido (O_2^{\bullet}). Esta conformación depende básicamente del estado de apareamiento en el que se encuentren sus electrones (Hanssberg, 2002). En el caso del O_2^{\bullet} la molécula de oxígeno contiene un electrón sin aparear, por lo tanto se le denominará como radical libre de oxígeno. Es importante señalar que existen moléculas que contienen oxígeno en su estructura y que si bien no son radicales libres, son moléculas que funcionan como intermediarios generadores de radicales libres como ejemplo de este tipo de moléculas podemos mencionar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Al conjunto de radicales e intermediarios de oxígeno se les denomina de manera general especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs pueden ser generadas en los organismos por procesos endógenos como parte del metabolismo natural o bien pueden ser generadas por factores exógenos mediante procesos físicos como las radiaciones o por la acción de xenobioticos como fármacos o pesticidas. Dada la importancia de las EROs, los organismos han desarrollado mecanismos antioxidantes que les permiten controlar el daño oxidativo producido por estas moléculas (Rice-Evans y Burdon 1994).

Cuando se produce un desbalance entre moléculas prooxidantes y moléculas antioxidantes se da origen a un estrés oxidativo. Los RL producidos durante el estrés oxidativo se han asociado a más de un centenar de patologías y enfermedades degenerativas como: el cáncer, la arteroesclerosis múltiple, el envejecimiento, la isquemia, el Parkinson, etc (Halliwell, 1999)

2.2.- ESTALLIDO RESPIRATORIO.

Como ya se mencionó los las EROs están involucradas en un gran número de procesos biológicos *in vivo*. Los radicales superóxido y las EROs se originan en el metabolismo de los organismos como productos de la acción de oxidasas como la xantina oxidasa o la NADPH oxidasa. Además, las EROs pueden ser

generadas por células específicas como los leucocitos (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos) que llevan a cabo funciones particulares en el organismo (Rice-Evans y Burdon 1994). Uno de los mecanismos efectores utilizado por células del sistema inmune en contra de los organismos patógenos es la producción de moléculas EROs durante el fenómeno conocido como "Estallido Respiratorio" (Fig. 2). La producción de EROs comienza cuando los macrófagos, neutrófilos o eosinófilos son activados por las moléculas de organismos patógenos. Los leucocitos se desplazan hacia dichos organismos para comenzar el proceso de la fagocitosis. La activación de estas células provoca una translocación hacia su membrana de una serie de proteínas del citosol que formarán un complejo proteico conocido como NADPH-Oxidasa. Dicho complejo enzimático lleva a cabo la reducción de O_2 produciendo $O_2^{\bullet-}$. Durante el proceso de la fagocitosis, una vez que se ha formado el fagosoma un gran número de moléculas de $O_2^{\bullet-}$ son liberadas hacia su interior o bien son liberadas hacia el espacio extracelular (Fig. 2). Estas moléculas pueden reaccionar con metales de transición como el Hierro y el Cobre o bien con enzimas como la Superóxido dismutasa para generar H_2O_2 . Se ha sugerido que la elevada concentración de $O_2^{\bullet-}$ así como los productos de sus reacciones (como el H_2O_2) son los responsables de la destrucción parcial de los patógenos. También como parte de este mismo proceso, la vacuola fagocítica se puede fusionar con gránulos citoplasmáticos presentes en células como los eosinófilos. Una vez fusionados los gránulos liberan mieloperoxidasa, la cual utiliza como co-sustrato el H_2O_2 para producir Ácido Hipocloroso. Esta molécula es capaz de oxidar una gran cantidad de moléculas biológicas, especialmente grupos tiol y residuos de metionina. Por último hay que señalar que en ciertos microambientes acidificados como el fagosoma o en algunos microambientes de la membrana citoplasmática el $O_2^{\bullet-}$ puede ser protonado para convertirse en radical perihidroxil (HO_2^{\bullet}) que es una molécula citotóxica más reactiva que el $O_2^{\bullet-}$. (Rice-Evans y Burdon 1994).

2.3.- MECANISMOS ANTIOXIDANTES EN LOS HELMINTOS.

Al igual que otros organismos los parásitos cuentan con mecanismos antioxidantes que les permiten inactivar a las EROs transformándolas en moléculas menos reactivas o inocuas para el organismo. Los sistemas antioxidantes de helmintos se pueden clasificar en los no enzimáticos y los enzimáticos, dentro de los primeros se incluye la participación de moléculas como el Glutathione, el Alfa-Tocoferol (Vitamina E), el ascorbato, además también se ha reportado la presencia de proteínas captadoras de Cu y Fe como la albúmina, la caeruloplasmina, la lactoferrina, la transferrina y la ferritina las cuales evitan la participación de estos metales en la peroxidación de lípidos (Selkirk y cols. 1998). Dentro de las enzimas antioxidantes que se han descrito en helmintos se encuentran las Superóxido Dismutasas (SODs), las Glutathione Peroxidases (GPXs), las Peroxiredoxinas (PRXs) y las Glutathione s-Transferasas (GSTs) (Henkle-Duhrsen y Kampkötter 2001).



Figura 2.- Estallido respiratorio. En la figura se observan algunas de las Especies reactivas de Oxígeno generadas durante el estallido respiratorio (izquierda) y algunas de las Enzimas detoxificantes de EROs (Derecha). También se observan algunas de las estructuras que pueden ser dañadas por las EROs,

2.4.- SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN LOS HELMINTOS.

Las superóxido dismutasas (SODs) son un grupo de metaloenzimas esenciales para la defensa de los organismos en contra de la oxidación producida por los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Fig. 3B). Los $O_2^{\bullet-}$ son producidos en los organismos por procesos metabólicos enzimáticos y no enzimáticos (Fridovich, 1998). El $O_2^{\bullet-}$ puede causar daño directamente oxidando a lípidos, proteínas y ADN o indirectamente cuando este reacciona con otras moléculas como el $O_2^{\bullet-}$, Fe^{3+} , H_2O_2 y *NO produciendo otras especies con un potencial oxidante mucho mayor como el OH^{\bullet} , o el peroxinitrito (Wink y Mitchell, 1998). Se conocen tres tipos de (SODs) en los helmintos, la SOD-Mn mitocondrial, la SOD-Cu/Zn citosólica (Fig. 3A) y la SOD-Cu/Zn extracelular. La enzima SOD-Mn es una proteína tetramérica formada por cuatro subunidades de 22 kDa, la SOD-Cu/Zn es una proteína dimérica con un tamaño molecular de 16kDa en cada subunidad, mientras que la forma extracelular es una glicoproteína tetramérica formada por cuatro subunidades de 30kDa con una alta afinidad a la heparina (Loverde, 1998; Henkle-Dürshen y Kampkötter, 2001). Organismos deficientes en esas enzimas exhiben una disminución en su crecimiento, incremento en la mutagénesis, hipersensibilidad a oxidantes y una menor supervivencia (Fridovich, 1998). Hasta la fecha varias SODs-Cu/Zn han sido clonadas y caracterizadas como en *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* y *Onchocerca volvulus* (Hong y cols. 1992, Henkle-Dürshen y cols. 1991, Kim y cols. 2000). Como todos los organismos aerobios, *T. solium* debe de enfrentarse al $O_2^{\bullet-}$ endógeno producido por sus propios procesos metabólicos y enfrentarse con el $O_2^{\bullet-}$ exógeno, ya que el adulto y el metacestodo viven en los tejidos del huésped y se encuentran en contacto directo con procesos inflamatorios.

Varios autores han sugerido que las enzimas antioxidantes están implicadas en la defensa de los parásitos (Loverde y cols. 1998, James 1994). Sin embargo, hasta el momento existe poca información del papel que estas enzimas detoxificantes están jugando en la relación huésped parásito. La caracterización y el aislamiento de estas enzimas por procedimientos de biología molecular permitirá utilizarlas en ensayos dirigidos a describir su participación en los mecanismos de evasión inmune, así como en el diseño de estrategias específicas que permitan inactivarlas.

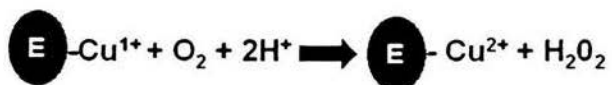


Figura 3.- A) Imagen computacional de una SOD de tipo Cu/Zn donde se observa la estructura dimérica de la enzima así como los plegamientos de tipo Alfa (barriles) y Beta (Flechas), también se observan los iones de Cu y Zn (esferas). B) Reacción química catalizada por la SOD. E = Enzima SOD.

3.- HIPÓTESIS.

El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es una molécula capaz de generar daño oxidativo directa o indirectamente en los organismos, por lo tanto *Taenia solium* debe de poseer una superóxido dismutasa (SOD-Cu/Zn) capaz de inactivar a este radical. Por otro lado, se sabe que la SOD Cu/Zn es una molécula conservada que esta presente en la mayoría de los organismos, sin embargo la SOD-Cu/Zn de *T. solium* podría presentar diferencias específicas que pudiesen ser usadas como blancos en el desarrollo de fármacos y vacunas en contra de la cisticercosis.

4.- OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar y expresar el cDNA que codifica para la SOD-Cu/Zn de *T. solium*
Determinar parcialmente las características bioquímicas e inmunológicas de la enzima y evaluar el efecto de fármacos antihelmínticos sobre su actividad catalítica. Así mismo, determinar la localización de la SOD-Cu/Zn en el parásito y evaluar su efectividad como antígeno en ensayos de vacunación en un modelo de cisticercosis.

5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar, secuenciar y caracterizar el cDNA que codifica para la SOD-Cu/Zn de *T. solium* y determinar el número de copias (del gen) en el genoma de *T. solium*.
- Producir y purificar una SOD-Cu/Zn de *T. solium* recombinante (tipo silvestre) en un sistema bacteriano (pRSET).
- Realizar la caracterización bioquímica de la enzima (actividad, peso molecular, punto isoeléctrico, caracterización del cofactor, termoestabilidad).
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fármacos antihelmínticos (albendazol y tiabendazol) sobre la actividad de la SOD-Cu/Zn de *T. solium*.
- Producir anticuerpos anti-SOD-Cu/Zn de *T. solium* en conejos y realizar estudios de inmunofluorescencia para determinar la localización de la enzima en el parásito.
- Llevar a cabo estudios de inmunoelectrotransferencia para determinar la expresión de la SOD-Cu/Zn en diferentes estadios del parásito y para evaluar las reacciones cruzadas de los anticuerpos con SODs de otras especies.
- Realizar estudios *in vitro* para evaluar el efecto del estrés oxidativo en los cisticercos de *T. solium*.
- Evaluar el efecto de la SOD-Cu/Zn de *T. solium* como antígeno en ensayos de protección en contra de la cisticercosis utilizando un modelo de *T. taeniaeformis*/rata.
- Caracterizar parcialmente la respuesta inmune de las ratas inmunizadas con la SOD-Cu/Zn de *T. solium* determinando los niveles de IgG1 e IgG2a.

6.- METODOLOGÍA.

6.1.- OBTENCIÓN DE PARÁSITOS Y DE EXTRACTOS CRUDOS (EC).

Las larvas de *T. solium* fueron extraídas del músculo esquelético de cerdos infectados con cisticercosis (en condiciones naturales). Los cisticercos fueron lavados 3 veces con PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM) y almacenados a -70° C hasta su uso. Los gusanos adultos fueron obtenidos a partir de hámsters previamente infectados con 10 cisticercos. Transcurrido un mes de la infección, los hamsters fueron sacrificados y los gusanos fueron extraídos del intestino delgado, finalmente los gusanos fueron lavados y almacenados como antes. Los huevos de *T. solium* se aislaron de proglótidos grávidos donados a nuestro laboratorio que fueron obtenidos de gusanos adultos de humanos infectados naturalmente con *T. solium*. Las oncosferas fueron obtenidas a partir de huevos tratados con hipoclorito de sodio al 10% usando un gradiente de percol como se describe en el método de Ito y cols. (1993). Finalmente las oncosferas fueron almacenadas a -70° C. Algunos especímenes y/o extractos crudos de otras especies (*Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Trichiuris trichiura*, *Gnathostoma sp.*) fueron obtenidos previamente en el laboratorio o donados por otros grupos de investigación. Los extractos crudos de *T. solium*, *T. crassiceps*, *T. saginata* y *T. taeniaeformis*, fueron preparados por homogenización de 1 gr. de tejido en 5 ml de amortiguador de fosfatos 0.015 M, NaCl 0.45 M y centrifugado a 35, 000 rpm por 15 min. en una ultracentrifuga (Beckman Inst.). El sobrenadante fue dializado durante toda la noche a 4°C en PBS 1X pH 7.4, centrifugado como antes, y guardado a -20 hasta su uso. La cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry (1951).

6.2.- DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Utilizando el programa informático Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se realizó un alineamiento múltiple de aminoácidos de varias secuencias de SODs Cu/Zn previamente reportadas en el banco de datos Gene-Bank y cuyos números de acceso fueron los siguientes: *Sus scrofa* (PO4178), *Bos taurus* (P00442), *Homo sapiens* (AAB056662), *S. mansoni* (A4924), *Onchocerca volvulus* (P24706), *Brugia malayi* (P919662), *F. hepatica* (AAD30361), se eligieron dos zonas altamente conservadas que contenían motivos característicos para las enzimas SODs de tipo Cu/Zn, a partir de estos, se diseñaron dos oligonucleótidos el SOD-1 (AAG/CAC/GGC/TTT/CAC/GTC/GTC) y el SOD-2 (CGA/ACG/TCT/TGA/ACT/CCT). Una vez obtenida y confirmada la secuencia completa de la clona que codificaba para la SOD-CuZn de *T. solium*, se diseñaron los oligonucleótidos externos el SOD-X1 (ATG/AAG GCT/GGT/TGT/GTT) y el SOD-X2 (GGT/ATT/ATT/GGA/ATT/GCT/AAG/AGC GAG) los cuales flanquean el principio y el final de la secuencia de la SOD-CuZn de *T. solium*.

6.3.- OBTENCIÓN DE RNA TOTAL.

El aislamiento y purificación de RNA (total) se llevó a cabo utilizando la técnica de TRIzol sugerida por el fabricante (Invitrogen). Las células fueron lisadas y

homogenizadas en 1 ml de trizol y posteriormente se incubaron por 5 min. a temperatura ambiente. Después se adiciono 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol y se incubo durante 2 min. a temperatura ambiente y posteriormente la muestra se centrifugo a 1 g por 15 min. a 4° C. Una vez concluida la centrifugación se tomo la fase acuosa. El RNA contenido en la fase acuosa fue precipitado mezclándolo con 0.5ml de isopropanol. Una vez mezclados los componentes antes mencionados se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron a 15,000 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415) por 10 min. a 4° C. La pastilla de RNA precipitada en el fondo del tubo fue resuspendida y lavada con 1 ml de etanol al 75%, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415) a 4° C. El sobrenadante se desecho y la pastilla de RNA fue secada y resuspendida en agua libre de RNAasa. La pureza del RNA se determinó leyendo las muestras en un espectrofotómetro de UV a 260/280 nm, y finalmente fueron cuantificadas a 260 nm (Sambrook y cols. 1989).

6.4.- REACCIONES DE PCR.

Las reacciones de la PCR se realizaron en un volumen total de 100 µl en tubos eppendorf de 0.5 ml y para cada reacción se utilizaron las siguientes cantidades: 1 µg de DNA, 10 µl de amortiguador de reacción 10X, 10 µl de dNTP's 2 mM, 5µl de MgCl₂ 30 mM, 0.5 µl (100 pico moles/µl), del oligonucleótido correspondiente, 1 µl (1 U) de Taq polimerasa y 72 µl de H₂O dd. Las muestras fueron incubadas en un termociclador PTC-100 Mk Research Inc. usando las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95° C 3 min; 50° C 2 min; 72° C 3 min; 29 ciclos a 95° C, 1 min; 50° C 2 min; 72° C 3 min. y un ciclo a 72° C, 10 min., 4° C durante 12 hrs.

6.5.- PURIFICACIÓN DEL DNA MEDIANTE PERLAS DE VIDRIO.

Utilizando 1 µg de cDNA de cisticerco y los oligonucleótidos internos SOD-1 y SOD-2, se amplificó por medio de la PCR un fragmento de DNA. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño del fragmento y posteriormente el fragmento fue cortado directamente del gel y fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml. El fragmento del gel de agarosa fue disuelto en 500 µl de Ioduro de sodio a 55° C por 20 min. Se adicionaron 1 µl perlas de vidrio (glass powder) y se incubo en hielo durante 2 hrs durante las cuales se agito la muestra frecuentemente en un agitador (vortex). Posteriormente la muestra se centrifugó a 14,000 rpm. y el sobrenadante fue desechado, por ultimo las perlas fueron secadas a 37° C por 10 min. y finalmente resuspendidas en 25 µl de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM) en tubos de 1.5 ml. El grado de purificación y la concentración final del DNA fue determinado a 260 nm y mediante una electroforesis.

6.6.- OBTENCIÓN DE UNA SONDA DE DNA.

El fragmento DNA previamente purificado fue secuenciado usando el kit comercial de sequenasa (el protocolo se describe mas adelante). La secuencia confirmó que se trataba de un fragmento que codificaba par una región interna

de la enzima superóxido dismutasa. Dicho fragmento fue marcado radiactivamente utilizando el estuche comercial rediprime™II (Amersham pharmacia). El protocolo usado fue el siguiente: 25 ng del DNA se diluyeron en 45 μ l de buffer TE. La muestra se desnaturalizó a 100° C durante 5 min., después se enfrió en hielo por 5 min. y se adicionaron 5 μ l al tubo de reacción (del estuche comercial) que contenía previamente dGTP, dTTP, dATP, enzima Klenow y oligonucleótidos al azar. Posteriormente se adicionó al tubo de reacción 5 μ l de marca radiactiva P³² dCTP, se mezcló y se incubó a 37° C por 10 min., la reacción se detuvo con 5 μ l de EDTA 0.2 M. Finalmente la mezcla fue calentada a 100° C e incubada en hielo por 5 min. antes de su uso.

6.7.- AISLAMIENTO DE CLONAS.

Una colonia de la bacteria huésped (*C*₆₀₀ hfl) fue inoculada en 50 ml de medio SOBM e incubada a 37° C durante toda la noche. Las bacterias fueron centrifugadas 10 min. a 3,000 rpm (centrifuga IEC Centra C12) y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM a una densidad óptica de DO₆₀₀= 0.5. Se utilizaron 40,000 fagos de una biblioteca de cDNA construida en el vector λ gt10. Aproximadamente, 10,000 fagos se utilizaron para infectar 500 μ l de bacterias a 37° C durante 15 min. Posteriormente las bacterias infectadas se resuspendieron en 6 ml de medio SOBM top-agar fundido a 48° C. Posteriormente las bacterias fueron sembradas en cajas petri de 180 mm. Las cajas se incubaron a 37° C durante toda la noche. Las placas líticas que crecieron en las cajas petri fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 min. y se marcaron asimétricamente usando tinta china como referencia para orientación de las membranas. Este mismo procedimiento fue repetido para obtener un duplicado de las membranas antes mencionadas. Las membranas fueron prehibridadas con esperma de salmón durante 2 hrs y posteriormente se hibridaron contra la sonda de DNA (fragmento de SOD-Cu/Zn) por 8 hrs. La temperatura de hibridación fue de 60°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con una solución de SSC 2 X (173 g de NaH₂PO₄, 88.2 g de citrato disueltos en 1L de H₂O₂) a la temperatura antes mencionada. Las membranas fueron secadas y expuestas en placas de autoradiografía durante 72 hrs. Las placas se revelaron y las clonas positivas se aislaron para ser sometidas a un segundo y tercer tamizaje utilizando las condiciones antes mencionadas. Por último las clonas positivas fueron almacenadas a 4° C en 1 ml de SM (Tris-HCl 1M pH 7.5, MgSO₄, NaCl y Gelatina al 2%) hasta su uso.

6.8.- PURIFICACIÓN DEL DNA A PARTIR DE LOS FAGOS.

Para la obtención del DNA de los fagos positivos se usaron 200 μ l de bacterias de la cepa TG1 [*supE hsdΔ5 thi Δ (lac-proAB)*] las cuales fueron infectadas con 5 x 10⁵ de los fagos previamente seleccionados y aislados de la biblioteca λ gt10. Las muestras se incubaron por separado a 37° C durante 15 min. Posteriormente se sembraron con 3 ml de agar sólido (fundido a 55° C) sobre cajas de SOBM-agarosa. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la solidificación del medio (15 min.). Se incubaron a 37° C durante toda la

noche. A las cajas se les adiciono 5 ml de medio SM y se agitaron lentamente durante 1 hr. a temperatura ambiente. El sobrenadante (5ml) fue recuperado con pipeta y transferido a tubos "Falcon" de 15 ml. Se agregaron 200 μ l de cloroformo agitando vigorosamente y se centrifugaron las muestras a 3,500 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415c) por 10 min. El sobrenadante se recupero y se transfirió nuevamente a tubos de 15ml. Se adicionaron 30 μ l de cloroformo y se almacenaron a 4° C hasta su uso. De los fagos almacenados a 4° C se transfirieron 700 μ l a tubos de 1.5 ml. Se le adicionaron 700 μ l de solución PEG (Glicol polietileno 20%, NaCl 2M) y se incubaron durante 1 hr. en hielo. Posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415c) durante 15 min. a temperatura ambiente. El sobrenadante se desecho y el precipitado fue resuspendido en 200 μ l de medio SM. Las muestras fueron tratadas con 2 μ l de RNAsa A (1 mg/ml) y 2 μ l de DNAsa (100 μ g/ml). Después de incubar las muestras a 37° C por 30 min. Se adicionaron 2 μ l de SDS 10% y 2 μ l de EDTA 0.5 M pH 8.0. y se incubo a 68° C durante 15 min. Las muestras fueron purificadas con extracciones de cloroformo y fenol. Como siguiente paso se precipitaron las muestras con 200 μ l de isopropanol a - 70° C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415c) por 15 min. a 4° C el sobrenadante fue desechado. La pastilla se lavó con 200 μ l de etanol al 70%, se recentrifugó y nuevamente el sobrenadante fue desechado. Por ultimo el precipitado fue secado y resuspendido en 30 μ l de TE.

6.9.- DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

Para las digestiones enzimáticas se usaron aproximadamente 10 ng de DNA del fragmento amplificado por la PCR con los oligonucleótidos λ gt10-5' y el λ gt10-3'. El DNA fue digerido (en reacciones por separado) con las siguientes enzimas de restricción: *Bam I*, *Bgl II*, *EcoR I*, *Hind III*, *Nde I*, *Sma I* y *Pst I*. Todas las reacciones se realizaron en tubos eppendorf de 1.5ml en un volumen total de 100 μ l. La mezcla de reacción contenía 5 μ l de DNA (10 ng aproximadamente), 10 μ l de amortiguador de reacción 10X, 84 μ l de H₂O dd y 1U de la enzima correspondiente. Las muestras se incubaron durante 4 hrs. a 37° C. Para determinar el tamaño de los fragmentos digeridos se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% a 100 volts usando un marcador de peso molecular λ *Hind III*. Por ultimo el gel fue observado en un transiluminador de luz UV.

6.10.- REACCIÓN DE RELLENADO (KLENOW-REACTION).

Como parte de la estrategia de clonación, se decidió realizar una reacción de rellenado (Klenow reaction) para obtener extremos romos a partir del DNA purificado y digerido con las enzimas *Bgl II* y *Nde I*. Para las reacciones se utilizaron 2.5 μ l del amortiguador de reacción, 1 μ l de DNTP's 2 mM (A,G,C,T), 1 μ l de fragmento de rellenado (Klenow fragment) y 20.5 μ l de H₂O dd. La mezcla se incubo durante 30 min. a temperatura ambiente, después se le adiciono 1 μ l de EDTA 0.5 M (pH 8). Posteriormente depuró la muestra con

extracciones de fenol (1X) y cloroformo (2X) y por ultimo se precipitó con etanol absoluto 20 min. a -70°C .

6.11.- LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN.

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando 10 ng del DNA del vector puc19 digerido con la enzima *Sma I* y 100 ng del DNA del fragmento amplificado por la PCR y rellenado en sus extremos con la enzima Klenow. A ambos DNAs les fueron adicionados 2.5 μl de amortiguador de reacción 10X, H_2O dd para completar un volumen de 25 μl y 1U de la enzima Ligasa (New England Biolabs®). Finalmente la reacción fue incubada durante 18 hrs a 16°C . La mezcla de ligación (7 μl) fue adicionada a 200 μl de bacteria JM105. Las bacterias se incubaron a 4°C por 1hr para posteriormente ser sometidas a un choque térmico de 42°C durante 1 min. inmediatamente la muestra fue incubada nuevamente a 4°C . Terminado este proceso las bacterias fueron sembradas en medio LB conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina e incubadas durante toda la noche a 37°C .

6.12.- PREPARACIÓN DE DNA PLÁSMIDICO.

La preparación de los templados (plásmidicos) se llevó a cabo creciendo 50 ml de bacterias (transformadas) durante toda la noche. El cultivo fue centrifugado a 3,000 rpm (centrifuga IEC Centra Cl2) durante 10 min. a 4°C . El sobrenadante fue descartado y a la pastilla, se le fueron adicionados 5 ml de solución 1 (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8.0), se resuspendió y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido el tiempo se le adicionaron 10 ml de solución 2 (200 μl de NaOH 10 N, 1 ml de SDS 10% y 8.8 ml de H_2O dd), la muestra fue agitada suavemente y se incubó por 10 min. a 4°C . Se adicionaron 7.5 ml de solución 3 (7.5 mM acetato de amonio), se agitó la muestra y se mantuvo en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm (centrifuga IEC Centra Cl2) durante 10 min. y el sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo, al cual le fueron adicionados 15 ml de isopropanol y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó nuevamente a 3,000rpm (centrifuga IEC Centra Cl2) a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y la pastilla fue resuspendida en 200 μl de TE y transferido a un tubo de 1.5 ml. Se adicionaron 2 μl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó durante 30 min. Posteriormente la muestra fue sometida a extracciones con Fenol-Cloroformo-fenol y la fase recuperada fue aplicada a una columna de sefrosa CL4B que previamente había sido equilibrada con TE. Las fracciones colectadas (5 μl) fueron visualizadas un gel de agarosa al 1% y las fracciones positivas fueron precipitadas a -70°C con acetato de Na 3 M y etanol absoluto. Finalmente las muestras fueron centrifugadas por 10 min. a 14,000 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415c) y la pasilla fue secada y resuspendida en 25 μl de TE.

6.13.- REACCIONES DE SECUENCIA

Para las reacciones de secuencia, se empleó como templado el DNA plásmidico purificado previamente. La secuencia se llevo a cabo por el método

de Sanger modificado para doble cadena (Ku-chuan H., 1991). Para este método se realizan dos pasos previos a la secuencia, que consisten en la desnaturalización y la neutralización del DNA a secuenciar. Una cantidad de 0.5 µg del DNA plásmidico se incubó con 3 µm del oligonucleótido iniciador y 0.5 µl de NaOH 1N durante 10 min. a 37° C después se adiciono el amortiguador de reacción diluido en agua y 0.5 µl de HCl 1N, la mezcla se incubo durante 5 min. Posteriormente se le adicionaron 2 µl de la mezcla de marcaje diluida en agua, 0.5 µl del α -dATP-³⁵S y 2 µl de la enzima Sequenase (Biolabs) diluida 1:8 en su amortiguador de dilución. Todos los componentes de la reacción fueron mezclados e incubado a temperatura ambiente durante 5 min. Después de esto 3.5 µl de la mezcla fueron adicionados a 4 tubos de 0.5 ml conteniendo 2.5 µl de un dideoxinucleótido específico (ddA, ddC, ddG, ddT) e incubados por 5 min. Finalmente la reacción fue terminada adicionando 4 µl del amortiguador de terminación, el cual lleva azul de bromofenol y cianol de xileno como marcadores de corrida. Las reacciones fueron corridas en geles de acrilamida al 6%. Para lo cual previamente 3 µl de las muestras fueron desnaturalizadas a 70° C y posteriormente se cargaron en el gel. Las condiciones de la corrida fueron 55 watts a 2500 volts. Después de la corrida los geles fueron fijados en ácido acético al 10% durante 20 min. Posteriormente fueron secados a 70° C durante 1 hr. y expuestos sobre placas de rayos X durante 12 hrs a -70° C. Para la traducción de la secuencia y los alineamientos se uso el programa informático PC/Gene y Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

6.14.- PREPARACION DE cDNA.

Para la producción del cDNA se emplearon aproximadamente 5µg del RNA, 1µl de dNTP's 10 mM, 1µl del oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0.5 µg/µl) y la cantidad suficiente de H₂O libre de RNAsa para completar un volumen de 10 µl y 0.4 U de Reverso transcriptasa (invitrogen). La muestra se incubo a 65° C por 5 min. y después fue enfriada en hielo por 1 min. A esta mezcla se le adicionaron 9 µl de la mezcla de reacción "reaction MIX" (2 µl de amortiguador RT, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de RNaseOUT™ un inhibidor de RNAsa) y se adiciono 1µl (50 unidades) de la enzima SuperScript™II RT y se incubo nuevamente a 42° C por 50 min. La reacción fue detenida a 70° C por 15 min. y en hielo. La mezcla fue centrifugada a 14 000 rpm. por 10 seg y se adiciono 1µl de RNasa H (1U) a cada tubo y se incubo por 20 min. a 37° C. Finalmente las muestras se almacenaron a -20° C hasta su uso.

6.15.- PREPARACIÓN DE DNA GENÓMICO.

Para la preparación de DNA genómico aproximadamente 5 gr. de cisticercos de *T. solium* fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados con un mortero, posteriormente las muestras se resuspendieron con 10 volúmenes de amortiguador de lisis (50 mM de Tris pH 8.0, 0.1 M EDTA, 0.5% sarcosil), 20 µg/ml de RNAsa tipo II y la suspensión se incubó 1 hr. a 37° C. Posteriormente se le adicionó proteinasa K a una concentración de 100 µl/ml y se incubó por 3 hrs. a 55° C y 1 hr. mas a 65° C. Se agregó NaCl a una concentración final de 2

M y se incubó 2 min. con agitación suave. Esta solución se centrifugó a 3000 x g durante 10 min. El DNA de la fase acuosa fue limpiado mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitado con un volumen igual de isopropanol. El DNA fue resuspendido en TE, cuantificado a DO_{260} nm. y 1 μ g fue usado como templado para amplificar una región del gen que codifica para cada enzima por medio de la PCR empleando oligonucleótidos del inicio y el término de la región codificadora de cada enzima.

6.16.- SOUTHERN BLOT.

Mediante la técnica de digestión con endonucleasas de restricción antes descrita, se digirieron 10 μ g de DNA genómico de *T. solium* con las siguientes enzimas de restricción, *Eco R I*, *Hind III*, *Nde I*, *Bam I*, *Nhe I* utilizando las condiciones antes mencionadas. Las reacciones fueron concentradas mediante una precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M, las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% a 100 volts durante 1 hra. después fue teñido con bromuro de etidio 1 μ g/ μ l y el DNA fue visualizado en un transiluminador de onda corta, el DNA fue transferido a una membrana de nylon por difusión por 24 hrs en amortiguador SSC 5X. La membrana fue lavada con una solución SCC 5X durante 5 min. a temperatura ambiente y el DNA fijado a membrana con luz UV en un entrecruzador (UV Stratagene 2400), siguiendo. Esta membrana se híbrido con la sonda del fragmento de DNA que codifica para la SOD-CuZn de *T. solium*. La hibridación se llevo a cabo a 60° C, finalmente las membranas fueron secadas y expuestas en placas de autoradiografía durante 24 hrs.

6.17.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.

Utilizando los oligonucleótidos SOD-X1 y SOD-X2 diseñados a partir de los primeros y últimos 6 aminoácidos de la SOD Cu/Zn de *T. solium* se amplifico mediante la PCR un fragmento de DNA obtenido a partir del cDNA del cisticerco. Los oligonucleótidos antes mencionados fueron diseñados con sitios de corte para las enzimas *Nde I* y *Bgl II* los cuales se encuentran dispuestos en las regiones 5' y 3' respectivamente. El fragmento de PCR se digirió con las enzimas antes mencionadas y fue ligado dentro del vector de expresión pRSET previamente digerido con las enzimas ya mencionadas, la transformación se llevo a cabo utilizando células competentes de *E. coli* de la cepa BL21(DE), las cuales fueron seleccionadas en cajas *petri* con LB y ampicilina incubadas a 37° C durante 8 hrs. Cabe señalar que las condiciones para las reacciones de digestión, ligación y transformación fueron las mismas que se mencionan anteriormente. Las colonias positivas fueron incubadas en 1 L de LB a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Posteriormente se adicióno IPTG a una concentración de 1 mM y la muestra se incubo durante otras 4 hrs. Las bacterias se centrifugaron a 10,687 x rpm (centrifuga Avanti-30 Bekman) por 10 min. La pastilla resultante fue lavada con PBS 1X (frío) y nuevamente se centrifugó como antes. Para romper las bacterias, estas fueron resuspendidas en una solución de Tris-Acetato 10 mM, PMSF 0.1 mM, Sucrosa 0.75 M. La muestra fue incubada durante 30 minutos a 4° C para finalmente ser sonicada durante 10 seg. en tres ocasiones para posteriormente ser

centrifugada a 10,687 rpm (centrifuga Avanti-30 Bekman). El sobrenadante producto de la centrifugación fue filtrado por una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ y fue adicionado (5 ml) a una columna de celulosa DEAE 16/10 Fast-Flow (Amersham Pharmacia Biotech) la cual fue previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 7.5. La columna se lavo tres veces con el amortiguador antes mencionado a un flujo de 5 ml/min. a una presión de 0.15 mPa., todas las fracciones fueron colectadas en un volumen de 3 ml. Posteriormente la columna fue eluida utilizando un gradiente lineal de 0-1 M de HCl disuelto en el amortiguador antes mencionado mientras que las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 3 ml utilizando las mismas condiciones del flujo y presión antes mencionadas. La concentración de proteínas en las fracciones fueron determinadas a 280 nm, también se determino la actividad de la SOD por el método de la xantina-xantina oxidasa utilizando inhibidores específicos para las enzimas SOD-Cu/Zn y SOD-Mn (descrito mas adelante). Las fracciones con actividad fueron mezcladas y dializadas en Tris-HCl 50 mM pH 8.9 y transferidas a la columna de DEAE celulosa previamente lavada y equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 8.9, las fracciones fueron colectadas como antes y el mismo gradiente de elusión fue utilizado. Las fracciones con actividad fueron concentradas utilizando membranas amicon® y la concentración final de la proteína fue determinada por el método de Lowry (1951). Alícuotas de todo el proceso de purificación fueron analizadas mediante una electroforesis en geles de acrilamida al 12%. Para incrementar la actividad de la proteína recombinante purificada se adiciono CuSO_4 0.2 mM y ZnSO_4 0.17 mM al medio de cultivo inmediatamente después de la adición del IPTG.

6.18.- DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR.

Para determinar el peso molecular y la estructura terciaria de la SOD recombinante, la proteína purificada fue filtrada a través de una columna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con un amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.5, utilizando un flujo de 1 ml/min y colectando en fracciones de 1 ml a temperatura ambiente. La columna fue calibrada usando marcadores moleculares para proteína en el rango de 14 kDa a 116 kDa. (lisozima 14,400 Da, anhidrasa carbonica 30,000 Da, albúmina de bovino 66,000 Da y b-galactosidasa 116,000 Da).

6.19.- PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS.

Los anticuerpos policlonales anti-SOD de *T. solium* y anti-SOD de *B. taurus* fueron obtenidos mediante 4 inmunizaciones subcutáneas en conejos (Nueva Zelanda) usando como antígeno 50 μ g de las proteínas antes mencionadas. Como adjuvante se uso $\text{Al}(\text{OH})_3$ v/v y las inmunizaciones se realizaron cada dos semanas por un periodo de dos meses. Catorce días después de la última inmunización los conejos fueron sangrados a blanco y el suero fue obtenido incubando la sangre 30 min. a 37° C y centrifugando a 5,000 rpm (microcentrifuga eppendorf 5415c) durante 10 min. Finalmente el suero fue alícuotado y almacenado a -20°C hasta su uso. Las IgGs fueron purificadas por cromatografía de afinidad usando una columna de proteína G-agarosa (sigma). Posteriormente las IgGs purificadas fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE

al 10% y cuantificadas por el método de Lowry (1951). Finalmente se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.20.- ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE-SDS) E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET).

Para el análisis de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles SDS-PAGE de acrilamida al 12% descrita por Laemmli (1970). Brevemente: aproximadamente $2.5\ \mu\text{g}$ de proteínas puras y $10\ \mu\text{g}$ de extractos crudos fueron incubados durante 5 min. con una solución de azul de: bromofenol 0.2%, glicerol 20% y 200 mM de mercaptoetanol. Las muestras fueron adicionadas al gel de acrilamida al 12% previamente preparado. Después las muestras fueron corridas con amortiguador de electroforesis (Tris-Base 25 mM, Glicina 250 mM, 0.1% SDS)1X a 100 Volts durante 1 hr. Finalmente los geles fueron retirados, para ser teñidos con azul de Coomassie durante 30 min. y desteñidos con una solución de ácido acético al 10%, mientras que otros geles fueron utilizados para transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa durante 1 hr. a 100 V usando una cámara de transferencia (Biorad). Para el "Western blot" se utilizó la técnica descrita por Towbin y cols. 1979. Brevemente: las membranas fueron cortadas en tiras de aproximadamente 2 mm. las cuales fueron bloqueadas con una solución de PBS-Twen 0.5% y leche en polvo al 0.5% durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos (Seros pre-inmunes y anti-SOD) en una dilución de 1:1000. Las membranas fueron lavadas 5 veces con PBS-Twen 0.5% y el complejo Ab:Ac fue detectado mediante la adición de un segundo anticuerpo presente en suero con anticuerpos anti-IgG de conejo unidos a la peroxidasa a una dilución de 1:2000. Finalmente las muestras fueron lavadas nuevamente y reveladas usando 0.5 mg de 3-3'-diaminobenzidina y $20\ \mu\text{l}$ de una solución de H_2O_2 al 1% durante 15 min. a temperatura ambiente.

6.21.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y EFECTO DEL SDS Y H_2O_2 SOBRE LA SOD MEDIANTE EL SISTEMA DEL NBT.

La actividad de la SOD fue detectada cualitativamente mediante el método de la oxidación del nitro blue tetrazolium (NBT) descrito por Beauchamp y Fridovich (1971), donde la actividad de la SOD es detectada como bandas claras producto de la inhibición de la fotoreducción del NBT la cual produce una coloración púrpura. Brevemente: Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida al 12% bajo condiciones no desnaturizantes durante 2.5 hr. a 100 V. Inmediatamente después los geles fueron incubados en la oscuridad con 10 mg de riboflavina y 25 mg de NBT disueltos en 100 ml de H_2O . Posteriormente los geles fueron revelados en presencia de luz con una solución de H_2O con TEMED al 1%, finalmente las fracciones fueron detenidas por la adición de H_2O dd. Para evaluar el efecto del H_2O_2 y el SDS la SOD de *T. solium* fue incubada durante 30 min. a 37°C con concentraciones de 0, 1, 3, 6 y 12 mM de H_2O_2 y 0, 1, 2 y 4% de SDS. Como control se usó la enzima comercial de bovino antes mencionada.

6.22.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD (xantina-xantina oxidasa).

La actividad enzimática de la SOD fue determinada cuantitativamente mediante el método de la xantina-xantina oxidasa descrito por McCord y Fridovich (1969). El $O_2^{\cdot-}$ es generado mediante el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa. En un ensayo control (sin enzima), el $O_2^{\cdot-}$ reduce completamente al citocromo C causando un cambio de color que se detecta a 550 nm. Cuando la misma muestra es incubada con la SOD el $O_2^{\cdot-}$ es dismutado a H_2O_2 , lo cual ocasiona que el citocromo C no se reduzca completamente por lo que se produce un cambio colorimétrico que puede ser detectado a 550 nm. Una unidad de SOD se define como la cantidad necesaria de enzima para inhibir el 50% del citocromo C durante 2 minutos a 550 nm. Las condiciones usadas para los ensayos fueron las siguientes: las reacciones se llevaron a cabo en un amortiguador de fosfatos (K_2HPO_4 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.8), usando 0.3 U de xantina-oxidasa (sigma), Xantina 0.1 mM (sigma), citocromo C (Sigma-aldrich) 0.019 mM. Para los ensayos control no se uso enzima SOD, mientras que para los controles positivos se uso una SOD Cu/Zn comercial de bovino (Sigma-aldrich) y una SOD Mg comercial de *E. coli* (Sigma-aldrich). Para los estudios de actividad de la SOD-Cu/Zn de *T. solium* se usaron concentraciones crecientes de 0.5 a 20 μ g de la enzima con el objeto de determinar el 50% de la inhibición del citocromo C.

6.23.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON ANTICUERPOS Y FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS.

Para medir la actividad de la enzima se utilizaron los métodos de la xantina-xantina oxidasa Para los estudios se utilizaron 100 U de enzima recombinante, la cual fue incubada a 37° C durante 30 min. con diferentes concentraciones de: Tiabendazol (0, 10, 100, 200 and 500 μ M, Sigma), Albendazol (0, 10, 100, 200 and 300 μ M, Sigma-aldrich), IgGs normales de conejo y anticuerpos IgG anti-SOD Cu/Zn de *T. solium* (0, 1, 5, 10, 15 and 25 μ g/ml), así como KCN y NaN_3 (0.01, 0.1, 1 and 10 mM, Sigma).

6.24.- INMUNOCALIZACIÓN DE LA SOD.

La localización en el tejido de la enzima se llevo a cabo mediante inmunohistoquímica. Los parásitos fueron lavados con PBS e incluidos en tissue-tek. Se realizaron cortes de 6 μ m en congelación que fueron colocados en laminillas previamente tratadas con polilisina. Los cortes se hidrataron y se bloquearon con una solución de PBS y BSA al 1%. Los cortes se incubaron con el anticuerpo específico anti-SOD toda la noche. Las laminillas fueron lavadas con PBS y un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína a diferentes diluciones (1:500 y 1:2000) por 1 hr. a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron con PBS y fueron montadas en una solución de glicerol-PBS para finalmente ser fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia a 560 nm (Nikon Eclipse E600).

6.25.- ESTUDIOS DE ESTRÉS OXIDATIVO *in vitro*.

Los cisticercos de *T. solium* (20) fueron cultivados en cajas de cultivo con 6 pozos (Costar®) usando 2 ml de medio RPMI (Sigma-aldrich) con 100 u/mg de

penicilina y 100mg/ml de estreptomycin durante 24 hrs. posteriormente el medio fue removido y se adicionó nuevamente medio de cultivo y antibióticos. Posteriormente los parásitos fueron sometidos a un estrés oxidativo durante 48 hrs. Como sistema generador de radicales superóxido se utilizaron 40 U de xantina oxidasa y concentraciones crecientes de acetaldehído (0, 0.5, 2 y 5 mM). La viabilidad se determinó por microscopía estereoscópica evaluando la movilidad mostrada por los parásitos, también se utilizó azul tripano para evaluar este parámetro. Durante el tiempo que duró el experimento los cisticercos se mantuvieron en incubación a 37° C con 95% de O₂ y 5% de CO₂.

6.26.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN EN EL MODELO *T. taeniaeformis*ratata

Para los ensayos de protección se utilizó el modelo de *T. taeniaeformis* para lo cual se utilizaron ratas de la cepa wistar que son susceptibles a la infección por oncosferas de *T. taeniaeformis* de la cepa MRN. Las ratas fueron inmunizadas dos veces (con un intervalo de 15 días) con diferentes dosis de proteína recombinante (0, 5, 10 y 20µg), se usó como adyuvante saponina 1 µg/µl, también se evaluó a un grupo sin inmunizar. Después de 1 mes grupos de 7 ratas fueron infectados con aproximadamente 5,000 huevos de *T. taeniaeformis* obtenidos de proglótidos grávidos (mediante la técnica de Ito y cols, 1991) que a su vez provenían de gatos infectados con gusanos adultos de *T. taeniaeformis*. Transcurridos 3 meses las ratas fueron sacrificadas y el hígado fue disectado. El número de cisticercos implantados en el hígado fue determinado. Cabe señalar que con intervalos de 15 días y durante 4 meses, las ratas fueron sangradas para la obtención de suero. El grado de protección se calculó estadísticamente usando el programa Sigma Plot V. 8.0.

6.27.- ENSAYOS DE ELISA.

Para los estudios tipo ELISA los antígenos fueron diluidos en un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 ser pegados a la placa, para. Se adicionaron 100 µl (1µg/µl) por pozo (se utilizaron placas Costar de 96 pozos). La placa se incubó toda la noche a 4° C. Posteriormente los pozos fueron bloqueados con 150 µl de una solución de BSA al 1% en amortiguador de carbonatos durante 2 hrs. Después las muestras se lavaron con PBS-Tween 20 al 1% 4 veces en un lavador automático. Se adicionaron 100µl del suero o anticuerpo diluido en PBS y se incubó durante 2 hrs. A 37 °C. La muestra fue lavada 3 veces como se mencionó anteriormente y se adicionaron 100 µl del segundo anticuerpo marcado (biotina) a una dilución de 1:2000 incubando 1 hr. a 37° C. Nuevamente la muestra fue lavada como antes y posteriormente se adicionó el sustrato y se incubó durante 20 min. La reacción fue detenida adicionando 25 µl de una solución de H₂SO₄ 0.1M. Finalmente las placas fueron leídas a 490 nm en un lector de ELISA (Microplate reader 550, BIORAD)

7.- RESULTADOS

7.1.- OBTENCIÓN DE UNA Sonda DE DNA Y AISLAMIENTO DE CLONAS.

Utilizando el programa computacional BLAST se obtuvo un alineamiento múltiple de SODs-Cu/Zn de distintos organismos. El alineamiento de aminoácidos nos permitió la identificación de 5 regiones altamente conservadas para la SOD en las posiciones: 40-51, 56-63, 76-83, 121-126 y 134-140. Tomando en cuenta las regiones 40-51 y 134-140 se sintetizaron 2 oligonucleótidos, el SOD1-5' y el SOD2-3' (Fig. 6). Estos oligonucleótidos se encuentran hacia la parte interna de la secuencia y fueron utilizados para la amplificación de un fragmento de PCR de 350 pb utilizando como templado cDNA del parásito. El DNA amplificado fue purificado y posteriormente secuenciado mediante la técnica de Sanger, esto permitió la obtención de una secuencia nucleotídica de 332 pb. Posteriormente esta secuencia de nucleótidos fue traducida a aminoácidos y nuevamente fue comparada con otras SODs observándose un elevado porcentaje de identidad (Fig. 6). Dentro de la secuencia obtenida también se logró la identificación de la mayoría de los aminoácidos esenciales para la actividad catalítica de la enzima en las posiciones: H-40, H-43, H-60, H-68, D-72 y H-117 (interacción con los cofactores), R-140 (sitio de interacción con el sustrato), así como los sitios C-54 y C-143 (implicados en la formación de puentes disulfuro). Una vez demostrado que el fragmento amplificado con los oligonucleótidos SOD1 y SOD2 codificaba para una región de una SOD de tipo Cu/Zn, el DNA fue marcado con P^{32} para la obtención de una sonda radioactiva. La sonda obtenida se utilizó en la identificación de clonas que pudiesen contener la secuencia completa que codificase para la SOD Cu/Zn de *T. solium*. Se realizaron 3 rondas de tamizajes radioactivos sobre la biblioteca de cDNA de *T. solium* clonada en λ gt10, cabe señalar que se utilizaron aproximadamente 40,000 fagos durante los tamizajes. Como resultado de la hibridación se obtuvieron 8 clonas positivas las cuales fueron aisladas para posteriormente efectuar la purificación del el DNA de los fagos de la biblioteca.

7.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS.

Usando como templado el DNA de los fagos y los oligonucleótidos (λ gt10-Forward y λ gt10-Reverse) del fago λ gt10 que flanquean la región del sitio de clonación de este vector se amplificaron por la PCR los insertos contenidos dentro de las 8 clonas aisladas. Posteriormente mediante una electroforesis se determinaron los tamaños de los insertos amplificados de las 8 clonas positivas, cada una de las clonas le fue asignado un número, los tamaños y números de las clonas fueron los siguientes: clona 111 ~700 pb., clona 121 ~700 pb., clona 212 ~700 pb., clona 322 ~700 pb., clona 421 ~1000 pb., clona 432 ~1000 pb., clona 521 ~700 pb., clona 533 ~700 pb. Dado que se obtuvieron 8 clonas a partir de aproximadamente 40,000 fagos se sugiere que el gen está representado en un 0.02% en la biblioteca de cDNA de *T. solium*. Los fragmentos de DNA de las 8 clonas, fueron digeridos con las enzimas de restricción: *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hind* III, *Nde* I, *Nhe* I y *Pst* I. Las reacciones fueron visualizadas en una electroforesis para determinar el patrón de restricción de cada clona. Dado que las muestras presentaron un mismo peso molecular (respecto al control) se determinó que las enzimas *Nde* I, *Nhe* I, *Pst* I y *Bgl* II no cortan el inserto. Mientras que se observó que las enzimas *Eco* RI,

Bam I y *Hind III* cortan el inserto una vez. Posteriormente con la secuencia nucleotídica se identificaron los sitios de corte en las posiciones: *Eco RI* (GAATTC) 162 pb, *Bam HI*-(CGATC) 380 pb y *Hind III*-(AAGCTT) 416 pb. Cabe señalar que todas las clonas presentaron el mismo patrón de restricción, por lo que se decidió caracterizar únicamente las clonas que presentaron un mayor tamaño (700 pb).

7.3.- OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA.

La clona seleccionada fue secuenciada por el método de secuenciación y se obtuvo una secuencia de nucleótidos de 492 pb que presentó un marco abierto de lectura de 452 pb que codifican para un polipéptido de 152 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 15, 588 Da y un punto isoelectrónico de 6.02. En la región previa al codón de inicio (metionina) se encontraron 26 pb, mientras que después del codón de término se encontraron 76 pb, por otro lado las secuencias utilizadas para diseñar los oligonucleótidos SOD-1 y SOD-2 se encontraron en las posiciones 118-133 y 400-421 respectivamente. También se identificaron la secuencia de poliadenilación característica de los ARN mensajeros (CAATAAA-33) y la región de poli-A (A-21) al final de la secuencia (Fig. 4). Cabe señalar que los oligonucleótidos SODX-1 y SODX-2 fueron diseñados a partir del inicio 1(ATG/AAG/GCT/GGT/TG/TGT) y el final 430 (GGT/ATT/ATT/GGA/ATT/GCT/AAG/AGC/GAG) de la secuencia. Posteriormente con estos oligonucleótidos se realizó una PCR a partir de cDNA y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 500 pb. que correspondía al tamaño esperado dada la posición de los oligonucleótidos. Analizando la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos de *T. solium* con el programa PC-GENE y realizando un alineamiento múltiple con el programa BLAST (Fig. 6) se encontró un elevado porcentaje de identidad respecto a las SODs Cu/Zn de otros organismos, los porcentajes fueron los siguientes: *S. mansoni* (A4924) 71%, *F. hepatica* (AAD30361) 54.6%, *B. malayi* (P919662) 53.9%, *O. volvulus* (P24706), 53.3%, *S. scrofa* (PO4178), 57.2%, *H. sapiens* (AAB056662) 57.9% y *B. taurus* (P00442). Así mismo se identificó un probable sitio de glicosilación en la posición N-83. También se efectuó un estudio de tipo Southern Blot para determinar el número de copias de los genes que codifican para la enzima SOD en el genoma de *T. solium*. El patrón obtenido (Fig. 5) permitió establecer que el gen que codifica para la SOD es de copia única.

7.4.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE.

Mediante una reacción de ligación se logró insertar el fragmento de DNA que codifica para la SOD-CuZn de *T. solium* en el vector de expresión pRSET. Después de realizar la transformación en células de *E. coli* se realizó las bacterias fueron inducidas con IPTG, esto permitió la expresión de la proteína recombinante de *T. solium* (wild type). El producto de la expresión fue determinado mediante una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% observándose una banda con un peso molecular de aproximadamente 16 kDa

-26 gctgctcgtttttctttggagtcgct

1 atg aag gct gtt tgt gtt atg cga ggg gag gag
M K A V C V M R G E E

34 ggc gtt aaa ggg gtt gtt cac ttc acc caa gct
G V K G V V H F T Q A

67 ggc gac gct gtg aaa gtg cat gct gaa ttt gag
G D A V K V H A E F E

100 ggg ctg aag cct gga aag cac ggc ttt cac gtc
G L K P G K H G F H V

133 cac gaa ttc ggt gac aca aca caa ggc tgc act
H E F G D T T Q G C T

166 tcg gct ggc gcc cac ttt aat ccc cac ggc aaa
S A G A H F N P H G K

199 aac cac ggt gct cct gat gct gct gag cga cat
N H G A P D A A E R H

232 gtt ggg gac ctc ggt aac gtt acg gct ggt gcc
V G D L G N* V T A G A

265 gat ggt aag gcg acg ctt gac ctt acg gac aag
D G K A T L D L T D K

298 atg att tcc ctc act ggc gaa cac tca gtt att
M I S L T G E H S V I

331 ggg aga tcc ctc gtg att cac gtg gat ccg gat
G R S L V I H V D P D

364 gac ttg ggt ttg ggc gga cac gag tta agc ttg
D L G L G G H E L S L

397 atc act ggc aac gct ggg ggt cgt gtt gcc tgc
I T G N A G G R V A C

430 ggt att att gga att gct aag agc gag tga
G I I G I A K S E -

cctgactactattttaattgcactgctcccactaatcacgaaatt
ttaccaatgcgggtttgtaatcgacttcaataaatcttccgaat
ttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 4.- Secuencia de la SOD-CuZn de *T. solium*. En la figura se observa la secuencia de la región codificante de DNA traducida a aminoácidos de una clona que codifica para la SOD-CuZn de *T. solium*. Los codones subrayados, señalan el codón de inicio (ATG) y el de termino de la secuencia (TGA). Los aminoácidos enmarcados por los rectángulos señalan la región donde se diseñaron los oligonucleótidos internos SOD1 y SOD2. El asterisco señala el posible sitio (N) de sitio de glicosilación.

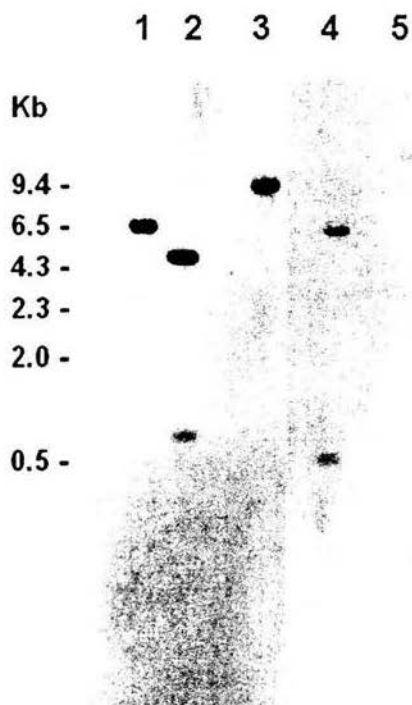


Figura 5.- Southern Blot. Hibridación de la sonda radioactiva con el DNA genómico de *T. solium* digerido con las siguientes enzimas: 1.- Bam HI, 2.- Hind III, 3.- Nhe I, 4.- Eco RI, 5.- DNA genómico sin digerir. En el extremo izquierdo de la figura se señalan los pesos moleculares (Gel de agarosa al 1%).


```

Hs      1  MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVGSIKGLTEGLHGFHVEFGDNTAGCTS
Bt      1  MATKAVCVLKGDPVQGTIHFEAKG--DTVVVTGSIITGLTEGDHGFHVEFGDNTAGCTS
Ss      1  -ATKAVCVLKGDPVQGTIYFELKGE-KTVLVGTIKGLAEGDHGFHVEFGDNTAGCTS
Bp      1  MSANRIAVLRGDN-VSGIIRFKQKEGSPPTISGEIKGLTPGLHGFHVEFGDNTAGCTS
Ov      1  MSTNAIAVLRGDT-VSGIIRFKQDKEGLPTTVTEVKGLTPGLHGFHVEFGDNTAGCTS
Fh      1  -----MSGSSGVQGTIVKVEQESVSPVQIKVDINGLKPGLHGFHVEFGDNTAGCTS
Sm      1  --MKAVCVMTGTAGVKGVVKTQETDNGPVVHAEFSGLKAGKHGFHVEFGDNTAGCTS
Ts      1  --MKAVCVMRGEEGVKGVVHFTQAGD--AVKVHAEFGLKPKKHGFHVEFGDNTAGCTS
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Hs      61  AGPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGVAIVSIEDSVISLSGDHCIIGRTLIV
Bt      59  AGPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKNGVAIVDIVDFLISLSGEYSIIIGRTMIV
Ss      59  AGPHFNPESSKHGGPKDQERHVGDLGNVTAGKDGVAIVYIEDSVIALSGDHSIIIGRTMIV
Bp      60  AGPHFNPNKTHGGPTDEERHVGDLGNIVAGADGTAHIDISDKHVQLLGNPSIIIGRSLIV
Ov      60  AGPHFNPNKTHGDRTEIRHVGDLGNIEAGADGTAHISISDQHIQLLGNPSIIIGRSLIV
Fh      53  AGPHFNPTGVDHGGPDSVREHVGDLGNVEANQNGLAHVFTDSVLSLGVNSVIGRAMV
Sm      59  AGPHFNPTQEHGAPEDSIRHVGDLGNVAGADGNAVYNATDKLISLNGSHSIIIGRTMIV
Ts      57  AGPHFNPHGKNNGAPDAERHVGDLGNVTAGADGKATLDLTDKMSLITGEHVSIIIGRSLIV
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Hs      121  MEKADDLGRGG---NEESTKIGNAGSRLACGVIGIAQ--
Bt      119  MEKADDLGRGG---NEESTKIGNAGSRLACGVIGIAK--
Ss      119  MEKADDLGRGG---NEESTKIGNAGSRLACGVIGITQ--
Bp      120  HADQDDLGRGGVGDKKDESLEKIGNAGARVACGIVVISAAS
Ov      120  HADQDDLGRGGVGVAKKDESLEKIGNAGARVACGIVVISAAS
Fh      113  MENEDDLGRGG---HEQSKITIGNAGSRLACGVIGLITE--
Sm      119  MENEDDLGRGG---HELSKVTIGNAGSRLACGVIGLAAE-
Ts      117  HVDDDLGRGG---HELSLITIGNAGSRLACGVIGIAKSE
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

Figura 6.- Alineamiento múltiple de la SOD-CuZn. En la figura se observa la secuencia de aminoácidos de la CuZn SOD de varios organismos: Hs. *Homo sapiens*, Bt. *Bos taurus*, Ss. *Sus scrofa*, Bp *Brugia pangi*, Ov. *Onchocerca volvulus*. Fh. *Fasciola hepática*, Sm. *Schistosoma mansoni* y Ts. *Taenia solium*. Los asteriscos señalan los nucleótidos idénticos en las especies antes mencionadas, los aminoácidos subrayados indican el sitio que se usó para diseñar los oligonucleótidos SOD1 y SOD2. Los motivos conservados característicos de las SODs-Cu/zn se encuentran dentro de los rectángulos.

(Fig. 7). La fracción soluble proveniente de la expresión bacteriana fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico a pH 7.5. La SOD-CuZn fue detectada (mediante actividad) en las primeras fracciones (0-5 ml) que no se pegaron a la columna. La proteína mostró un elevado grado de purificación (85%). Posteriormente la proteína fue dializada y transferida a otra columna de intercambio iónico equilibrada a pH 8.9. Nuevamente la SOD-CuZn fue detectada en las primeras fracciones (0-5 ml) de la cromatografía (Fig. 8) observándose una purificación del 99% (Carril 4, Fig. 7). Finalmente la proteína fue cuantificada por el método de Lowry (1969) y se pudo determinar una concentración de 0.3 mg/ml, cabe señalar que se obtuvieron alrededor de 5mg totales de SOD como producto de la expresión.

7.5.- CARACTERIZACIÓN DE LA SOD-CuZn DE *T. solium*.

Con el objeto de determinar el peso molecular nativo de la enzima, se realizó una cromatografía de filtración la cual fue calibrada con diferentes enzimas comerciales. Dichas enzimas presentaron los siguientes volúmenes de retención: β -galactosidasa (β -Gal) 9.62, albúmina (BSA) 11.65, anhidrasa carbonica (ANC) 12.98 y lisozima 15.92. La filtración mostró que la SOD-CuZn de *T. solium* presentaba un volumen de retención de 13.34. Una vez realizada la regresión lineal tomando en cuenta los estándares antes mencionados se determinó que la SOD-CuZn de *T. solium* presentaba un peso molecular de alrededor de 30, 000 Da (Fig. 9A) por lo que tomando en cuenta los resultados previamente mencionados se estableció que la enzima es un homodímero de aproximadamente 30 kDa que presenta dos subunidades de aproximadamente 16 kDa. Para determinar si las fracciones resultantes de la cromatografía de presentaban actividad específica de SODs, se procedió a evaluar su actividad mediante el método de la xantina oxidasa. La fracción número 9 presentó la mayor actividad (observada como un decremento de la absorbancia a 550nm), así mismo esta fracción presentó una mayor concentración proteica a 280 nm. (Fig. 9B).

Una vez que se determinó que la proteína presentaba actividad de SOD, su actividad específica fue cuantificada mediante el ensayo de xantina-xantina oxidasa. En dicho ensayo una unidad de actividad para la SOD se define como la cantidad necesaria de enzima para inhibir el 50% de la reducción del citocromo C evaluadas después de 2 minutos a 550 nm (Fridovich y cols. 1969). Así pues se utilizaron diferentes concentraciones de la muestra purificada y se encontró que 0.4 μ g de proteína correspondían a una unidad (U) de actividad, por lo que se determinó que la proteína presentaba una actividad específica de 35.7 U/mg. Sin embargo cuando la expresión de la proteína fue complementada con CuSO_4 0.2 mM y ZnSO_4 0.17mM, se observó un considerable aumento en la actividad de 2941 U/mg (Fig. 10). Es importante hacer notar que una muestra control con 10 μ g de Extracto crudo de *E. coli* (sin inducir) no presentó actividad de SOD con el método antes mencionado.

Para caracterizar el tipo de SOD se utilizó el KCN que es inhibidor específico de las SODs-CuZn, el NaN_3 que es inhibidor específico para las SODs-Mn y el

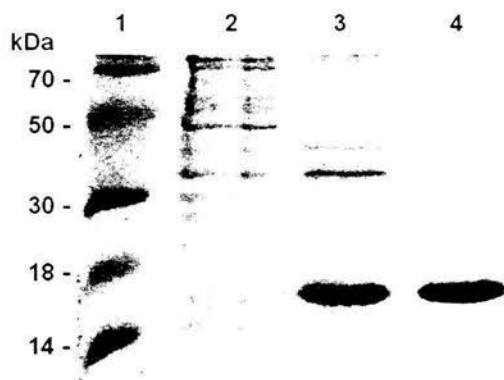


Figura 7.- Electroforesis en Gel (SDS-PAGE) de acrilamida al 12%. Carril: 1.- Marcador de pesos moleculares. 2.- 10 μ g de extracto crudo de *E. coli* sin inducir. 3.- 10 μ g de extracto crudo de *E. coli* inducida con IPTG. 4.- 5 μ g de SOD-Cu/Zn recombinante de *T. solium* purificada.

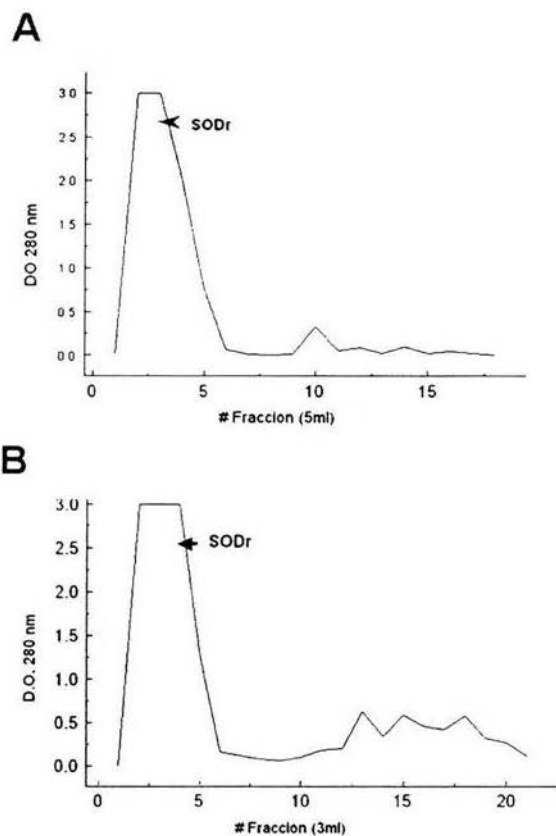
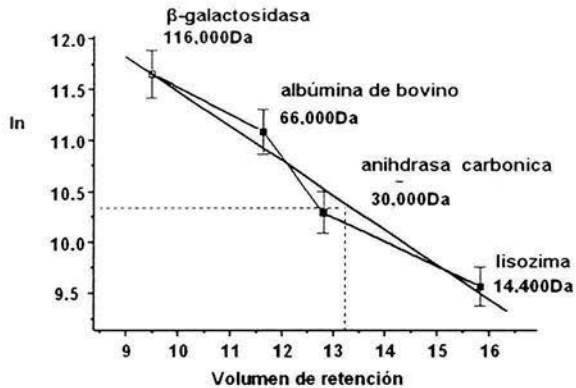


Figura 8.- Purificación de la proteína por cromatografía de intercambio iónico. La grafica indica la concentración de proteína a 280 nm de los extractos de *E. coli* con la SOD recombinante pasados a través de: A) Una columna de DEAE celulosa equilibrada con Tris-Hcl pH 7.5. B) Cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE celulosa equilibrada con Tris-HCl pH 8.9. En la parte inferior de las graficas se indica el número y volumen de las fracciones colectadas. Las muestras fueron eluidas en 10 ml con NaCl 1M.

A

REGRESIÓN LINEAL

Fracc.	Vol. Ret.	PM
# 9	13.34	~30kDa



B

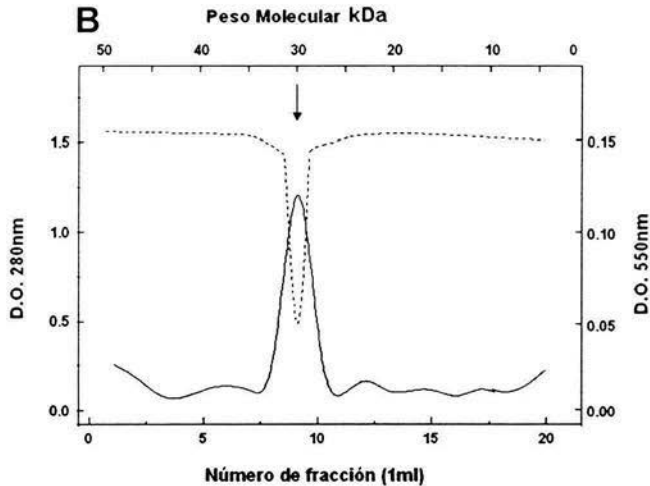


Figura 9.- Determinación del peso molecular de la SOD por cromatografía de filtración. A) Gráfica de la regresión lineal de la curva de calibración de la columna donde se indica el volumen de retención y el peso molecular de la β -galactosidasa, albúmina de bovino, anhidrasa carbónica y lisozima. Además se indica el volumen de retención y el peso molecular de la SOD-Cu/Zn de *T. solium*. B) Gráfica de la actividad de la SOD y concentración de proteína a 280 nm de las fracciones colectadas (1ml). La flecha indica la fracción con mayor absorbancia y actividad enzimática. La actividad se señala con la línea punteada (la mayor cantidad de actividad se aprecia como un decremento en la absorbancia a 550 nm).

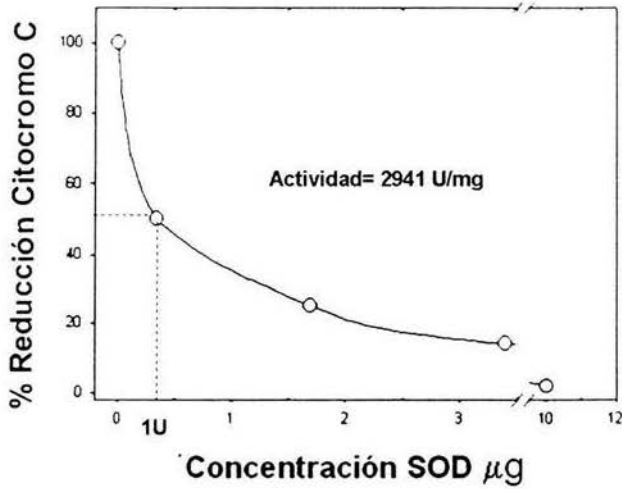


Figura 10.- Determinación de las unidades de actividad de la SOD-Cu/Zn de *T. solium*. En la grafica se observa el efecto del incremento de la concentración de SOD sobre la reducción del Citocromo C. Una unidad de actividad se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reducción del citocromo C. La línea punteada indica que 0.34 µg equivalen a 1U de SOD (por lo que la actividad específica de la SOD de *T. solium* es de 2941 U/mg).

SDS y el H₂O₂ que es inhibidor de las SODs-Fe. Los resultados presentados en la figura (11A), indican que el KCN inhibe en 100% la actividad de la enzima a concentraciones de 10 mM, mientras que a las mismas concentraciones el NaN₃ no afecta la actividad de la enzima. Además incubando la SOD de *T. solium* con SDS y H₂O₂ a concentraciones de 4% y 12 mM respectivamente no se observa efecto en la actividad evaluada por el método de NBT (Fig. 11B). En cuanto a los resultados de la termoestabilidad se estableció que la enzima pierde su actividad cuando es incubada a 100° C durante 5 min. (Fig. 12), además se demostró que la enzima es termoestable (100% de actividad) a temperatura ambiente durante una semana, a -70° C durante 3 meses, a -20° C durante 1 mes y -4° C durante una semana. También se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-SOD sobre la actividad de la enzima y se observó que estos no presentaron efecto a concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000.

7.6.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON FÁRMACOS ANTIHELMINTICOS.

En la figura 13 se muestra el efecto de el tiabendazol y el albendazol sobre la actividad de la enzima recombinante de *T. solium* y la SOD comercial de *B. taurus* evaluadas por el método de la xantina-xantina oxidasa. En el caso del tiabendazol, se observa que a concentraciones de 10, 100 y 200 µM se afecta la actividad de la enzima en 14, 37 y 52% respectivamente. Así mismo se observa que a 500 µM la actividad se abate completamente. Interesantemente a estas mismas concentraciones no se observó ningún efecto sobre la actividad de la SOD comercial. Para el albendazol se encontró que concentraciones de 10, 100 y 200 µM inhibían en un 14, 23 y 32% respectivamente. Mientras que a concentraciones de 300µM se inhibió en 100% la actividad de la enzima. Finalmente se observó que a esta misma concentración el albendazol inhibe en 25% la actividad de la SOD comercial.

7.7.- INMUNOLOCALIZACIÓN E INMUNOELECTROTRANSFERENCIAS (IET) DE LA SOD-CU/ZN DE *T. solium*.

Para determinar la localización de la SOD se utilizaron cortes de cisticercos bloqueados con BSA al 1% e incubados con IgGs anti-SOD de *T. solium*. En la figura 14 se observa la inmunofluorescencia de los anticuerpos principalmente en las células subtegumentales, observándose una menor intensidad a lo largo del tegumento y de células musculares. El control fue incubado bajo las mismas condiciones con IgGs de suero preinmune y no se observa fluorescencia en ninguna de las estructuras antes mencionadas. Mediante la inmunización de conejos utilizando como antígeno a la SOD-CuZn de *T. solium* se obtuvieron sueros con anticuerpos específicos anti-SOD. Las IgGs fueron purificadas por una cromatografía de afinidad y la especificidad de los anticuerpos fue evaluada por inmunolectrotransferencia utilizando diferentes extractos crudos, proteínas puras y fracciones semipurificadas. Cabe señalar que como controles negativos se usaron IgGs purificadas a partir de suero preinmune de conejo. En la figura 15 se demuestra que los anticuerpos no reconocen el lisado de *E. coli* sin inducir (carril 1), mientras que si reconocen una sola banda en el mismo lisado de *E. coli* inducido con IPTG (carril 2), igualmente los anticuerpos anti-SOD reconocen una sola banda de 16kDa en el

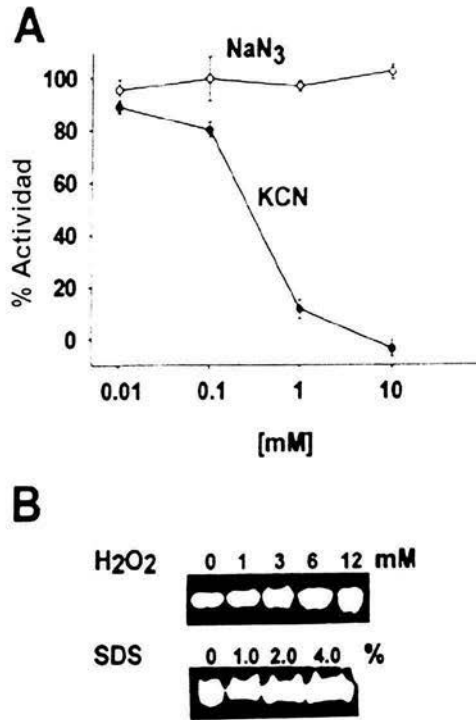


Figura 11.- Caracterización de la SOD de *T. solium*. A) Efecto de diferentes concentraciones de KCN y del NaN₃ sobre la actividad de la SOD evaluada por el método de la xantina-xantina oxidasa. B) Gel de acrilamida (nativo) al 12% para evaluar el efecto del H₂O₂ y del SDS sobre la actividad de la SOD evaluada por el método del NBT, las bandas blancas indican la actividad de la enzima.

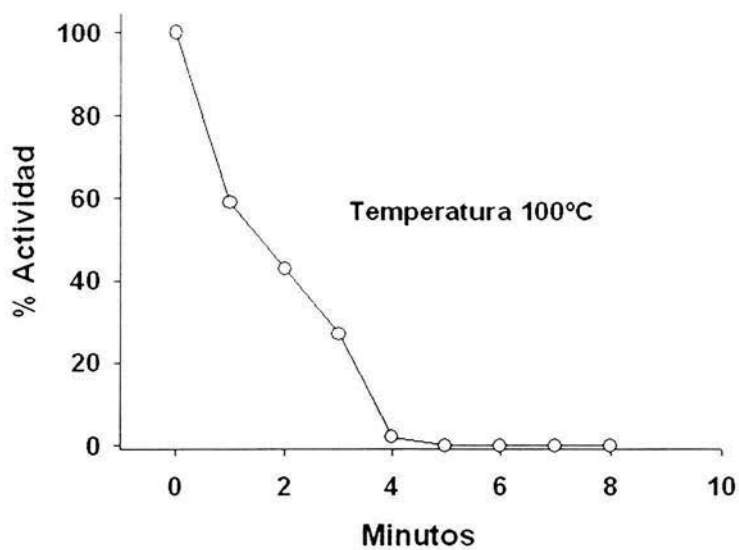


Figura 12.- Termoestabilidad de la SOD-CuZn.- Evaluación de la actividad de la enzima a 100 °C. En la figura se observa que a 5 minutos se abate completamente la actividad de la SOD-Cu/Zn de *T. solium*.

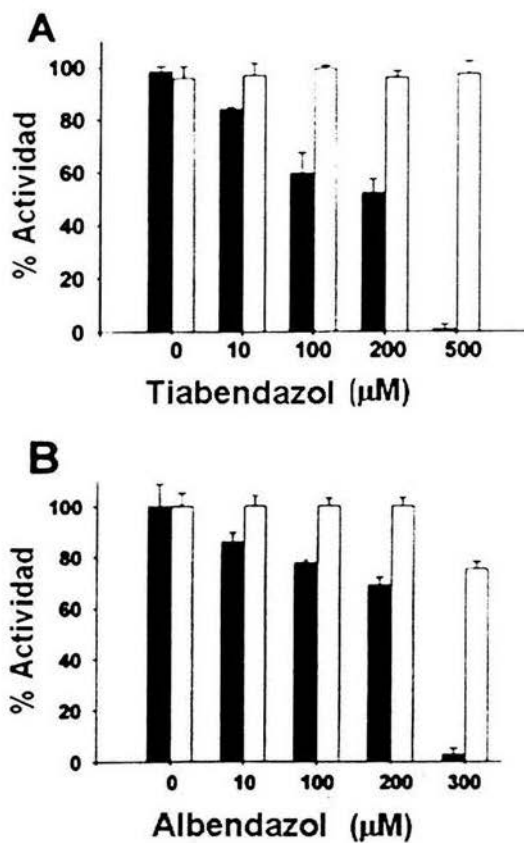


Figura 13.- Inhibición de la actividad de la SOD-Cu/Zn con fármacos antihelmínticos. A) Efecto de concentraciones crecientes de tiabendazol sobre la actividad específica de la SOD-Cu/Zn de *T. solium* (barras negras) y la SOD-Cu/Zn de *B. taurus* (barras blancas). B) Efecto de concentraciones crecientes de albendazol sobre la actividad específica de la SOD-Cu/Zn de *T. solium* (barras negras) y *B. taurus* (barras blancas).

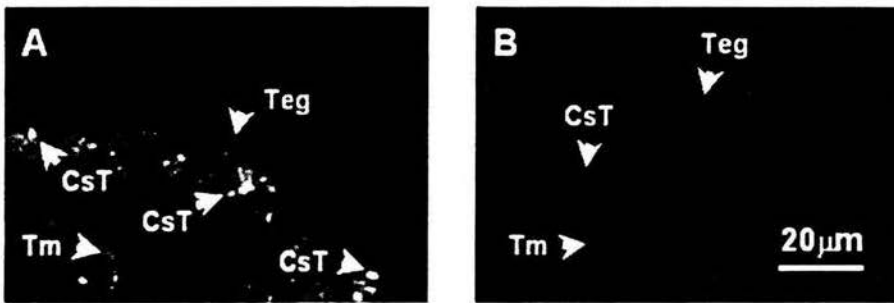


Figura 14.- Inmunolocalización de la SOD. A) Microscopia de fluorescencia de un corte de cisticerco (40X) incubado con anticuerpos anti-SOD-CuZn de *T. solium* acoplados a fluoresceína. B) Corte de cisticerco (40X) incubado con anticuerpos de Suero preinmune de conejo.

carril que corresponde a la proteína purificada (carril 3). Así mismo en la figura 15 se demuestra que la SOD se encuentra en todos los estadios de *T. solium* y que reconoce los extractos proteicos de la oncosfera, de la larva y del adulto (carriles 5-7), en cuanto a las reacciones cruzadas con otros organismos se encontró que los anticuerpos también reconocen Extractos de *T. saginata*, *T. taeniaeformis* y *T. crassiceps* (Carriles 7-9). Contrariamente los anticuerpos no reconocieron a los trematodos: *F. hepatica* y *S. mansoni*. Tampoco reconocieron a los nématodos *T. trichiura* y *Gnathostoma sp.* y finalmente no reconocieron SODs comerciales de *B. Taurus*, *H. sapiens*, ni tampoco a una fracción semipurificada de *S. scrofa* (Carriles 10-17). Los controles negativos con IgGs (de conejos preinmunes) se presentan en los carriles 17 y 18 donde no se observa reacción en contra de extractos crudos de cisticercos de *T. solium* ni con un lisado de *E. coli* (con la proteína inducida). En el carril 19 se demuestra la antigenicidad de la SOD comercial de *B. taurus* en contra de anticuerpos producidos en conejo anti-SOD de *B. taurus*.

7.8.- ENSAYOS SUPERVIVENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO *In Vitro*.

Los resultados del ensayo de supervivencia (*In Vitro*) indican que los cisticercos de *T. solium* presentan 100% de viabilidad cuando los parásitos son sometidos a un estrés oxidativo producido por el sistema xantina-oxidasa/acetaldéhidido usando concentraciones de 0.5, 2 y 5 mM de Acetaldehído y 40 U de xantina-oxidasa. En la tabla 1 se muestran los resultados antes mencionados y se comparan con los resultados de viabilidad obtenidos con larvas de *S. mansoni* y *F. hepatica*.

7.9.- ENSAYO DE VACUNACIÓN Y DETERMINACIÓN DE IgGs.

Para evaluar el efecto protector de la SOD en contra de la cisticercosis se usó el modelo *T. taeniaeformis*-rata/gato. Para lo cual se utilizaron 3 dosis de 1, 10 y 20 μg de SOD-Cu/Zn de *T. solium* utilizando saponina como adyuvante. Así mismo un grupo control fue inmunizado solamente con el adyuvante y otro grupo se inmunizó únicamente con PBS. En los grupos controles (PBS y Saponina) se observaron los siguientes resultados (en cuanto al número de cisticercos implantados en el hígado de las ratas): PBS = 24 ± 7 , Sap = 15 ± 7 . En el caso de los grupos experimentales se presentaron los siguientes resultados: 1 μg = 19 ± 5 , 10 μg = 30 ± 15 y 20 μg = 5 ± 1 . El número de ratas en cada grupo fue de 7 (Fig. 17)

Finalmente, como un estudio preliminar para evaluar parcialmente la respuesta inmune de las ratas inmunizadas con la SOD-Cu/Zn de *T. solium* se evaluaron los títulos de anticuerpos para IgG1 e IgG2a mediante ELISAs. En la figura 18

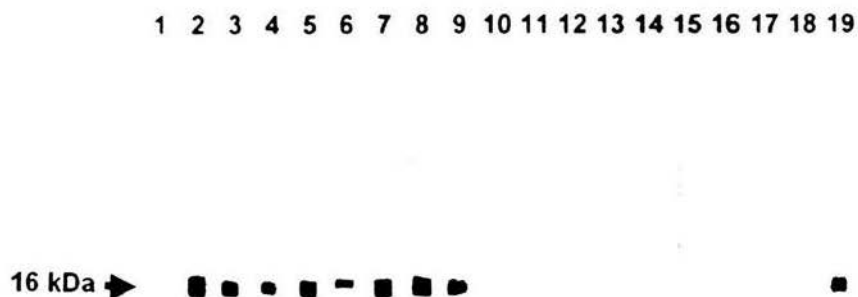


Figura 15.- A) Inmunoelctrotransferencia con: Anticuerpos anti-SOD-CuZn *T. solium* vs 1.-Extracto Crudo (EC) de *E. coli*, 2.- E. C. de *E. coli* inducida con IPTG, 3.- SOD recombinante (purificada), 4.- E.C. de oncosfera, 5.- E.C. de cisticerco, 6.- E.C. de adulto, 7.- E.C. de *T. saginata*, 8.- E.C. de *T. taeniaeformis*, 9.- E.C. de *T. crassiceps*, 10.- E.C. de *S. mansoni*, 11.-E.C. de *F. hepatica*, 12.- E.C. de *T. trichiura*, 13.- E.C. de *Gnatosoma sp.* 14.- SOD de *S. scrofa*, 15.- SOD de *B. taurus*, 16.- SOD de *H. sapiens*. Anticuerpos anti-IgG normal de conejo vs 17.- E.C. cisticerco, 18.- E.C. *E. coli* inducida con IPTG, 19 Anti-SOD-Cu/Zn *B. taurus* vs SOD-Cu/Zn de *B. taurus*.

	Xantina-Oxidasa + Acetaldehído 0.5 mM	Xantina-Oxidasa + Acetaldehído 2 mM	Xantina-Oxidasa + Acetaldehído 5 mM
<i>S. mansoni</i>	66%	40%	ND
<i>F. hepatica</i>	8%	ND	ND
<i>T. solium</i>	100%	100%	100%

Tabla 1.- Resistencia al estrés oxidativo (*In Vitro*) producido por el sistema xantina-oxidasa/acetaldehído en larvas de *S. mansoni*, *F. hepatica* y *T. solium*. En la tabla se observan los porcentajes de viabilidad para cada especie, ND= no determinado. Los datos de viabilidad de *S. mansoni* y *F. hepatica* fueron obtenidos del estudio realizado por Piedrafita y cols. (2000).

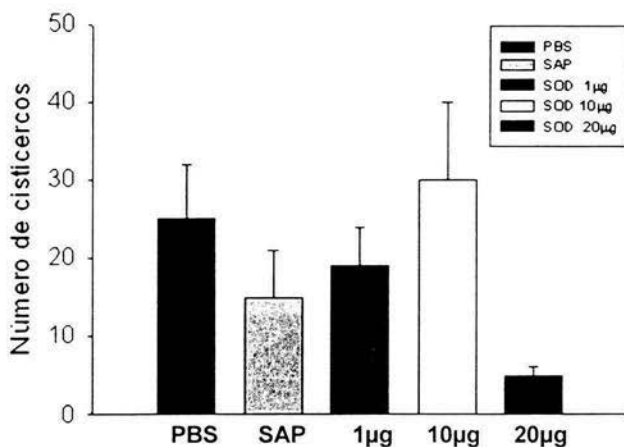


Figura 16.- Ensayo de protección en un modelo de cisticercosis (*T. taeniaeformis*-rata/gato). En las barras se observa el número de cisticercos encontrados en el hígado de las Ratas inmunizadas con diferentes concentraciones de SOD-Cu/Zn de *T. solium*. También se indican los grupos control así como las cantidades de antígeno usadas para cada grupo experimental. (Promedio \pm SD n=7).

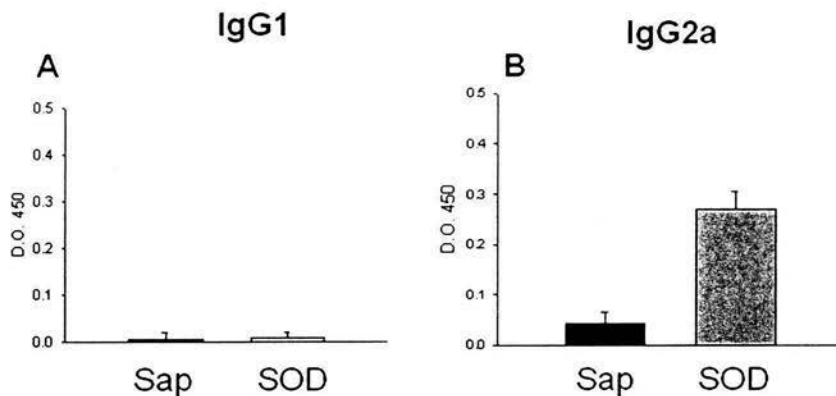


Figura 18.- Determinación de Isotipos para IgG. A) Títulos de anticuerpos IgG1 encontrados en el suero de las ratas inmunizadas con 20 µg de SOD-Cu/Zn de *T. solium*. B) Títulos de anticuerpos IgG2a encontrados en el suero de ratas inmunizadas con 20 µg de *T. solium*. (Promedio \pm SD n=7)

se puede observar que los sueros de las ratas inmunizadas con 20 μ g de SOD y los sueros de las ratas control inmunizadas solamente con saponina no muestran títulos de anticuerpos para IgG1. Sin embargo cuando se evalúa la respuesta para IgG2a, a pesar de que no se observa un elevado título de anticuerpos en el suero de las ratas inmunizadas con SOD, si se observa un incremento y diferencia respecto al grupo control. Cabe señalar que también se observa un ligero incremento en los títulos de anticuerpos IgG2a en el grupo control.

8.- DISCUSIÓN.

La cisticercosis es una enfermedad con una amplia distribución a nivel mundial que año con año afecta a miles de individuos. La neurocisticercosis (NC) es un importante problema de salud pública en países subdesarrollados como México. Existen datos que indican que en nuestro país realiza un gasto anual de alrededor de 14.5 millones de dólares destinados solamente al tratamiento de la NC. Además cabe señalar que este padecimiento afecta principalmente a individuos que se encuentran en edad productiva por lo que a los costos del tratamiento hay que agregar las pérdidas económicas ocasionadas por la inactividad de estos individuos (Flisser,1988). Los datos antes mencionados evidencian la necesidad de la implementación de medidas de control en los países endémicos. A la fecha se han realizado diferentes estudios para evaluar la efectividad de diferentes estrategias de control. En la mayoría de estos estudios se han reportado buenos resultados y se ha sugerido que es posible la erradicación de esta enfermedad (Sarti y Rajsherkhar, 2003). Sin embargo todas estas medidas de control siempre presentan un común denominador, su principal inconveniente es la elevada inversión de recursos económicos que se requieren para su implementación. Los diferentes estudios realizados también coinciden en que el suministro de vacunas y/o medicamentos tendría que ser subsidiado por los gobiernos, debido a que gran parte de la población no dispone de recursos suficientes para la adquisición de vacunas y/o medicamentos. Así pues la disposición de recursos económicos para resolver esta y otras parasitosis es un factor determinante para la implementación de las medidas de control. Si se toma en cuenta que la cisticercosis es una enfermedad que se presenta principalmente en países pobres en donde los gobiernos no están dispuestos a invertir la suficiente cantidad de dinero destinada a este fin, cabría preguntarse si es posible la erradicación de esta enfermedad si depender de los escasos recursos otorgados por parte de los gobiernos. Una alternativa en este sentido sería la implementación de una campaña permanente (5 años) a nivel nacional para la erradicación de esta y otras parasitosis intestinales, sustentada principalmente con recursos de organizaciones no gubernamentales extranjeras o nacionales y llevadas a cabo con recursos humanos provenientes de universidades, instituciones públicas y población en general. El punto fundamental de una campaña de este tipo sería la coordinación de los diferentes sectores y la obtención de los recursos económicos. En este sentido, es posible conseguir el patrocinio de diversas fuentes como empresas farmacéuticas que pudiesen costear parcialmente los fármacos o vacunas necesarios para el tratamiento de esta enfermedad, o bien se podría obtener el apoyo de fundaciones u organizaciones no gubernamentales que comúnmente destinan recursos a obras de esta naturaleza. En este mismo sentido es muy importante demostrar a los gobiernos que la inversión en la investigación enfocada al desarrollo de nuevos fármacos, vacunas y métodos diagnósticos más eficientes redundaría en la implementación de mecanismos de control más eficaces que a su vez ayudarían a reducir los costos (a mediano plazo) de inversión para controlar este tipo de enfermedades. Además el desarrollo de nuevas herramientas

podría generar recursos para el país mediante el registro de patentes y la comercialización de los productos de la investigación.

Actualmente el desarrollo de fármacos y vacunas en contra de los helmintos se ha enfocado a la identificación y caracterización de nuevas moléculas que pudiesen ser usadas como blancos útiles para la destrucción de los parásitos. Como se sabe los cisticercos logran sobrevivir durante periodos de tiempo relativamente largos dentro del organismo hospedador. Estos parásitos incluso también tienen la capacidad de desarrollarse en individuos inmunológicamente competentes. Respecto a este tema, se han descrito diversos procesos mediante los cuales los parásitos logran evadir a la respuesta inmune (Flisser y cols. 1997). Uno de los mecanismos efectores del sistema inmune es el estallido respiratorio, donde células del sistema inmune (principalmente macrófagos y neutrófilos) generan moléculas tóxicas para dañar estructuras parasitarias. Sin embargo los cisticercos y algunos otros parásitos no presentan daño aparente producido por este ataque citotóxico. Así pues se ha sugerido que los parásitos logran sobrevivir a este ataque oxidativo gracias a la producción de enzimas antioxidantes que les permiten inactivar las moléculas tóxicas antes de que estas puedan dañar estructuras lipídicas, proteicas o el DNA (Callaham, 1988, Loverde, 1998). El primer radical producido durante el estallido respiratorio es el superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que contrariamente a lo que se piensa es un radical con un bajo potencial reductor comparado con otras moléculas oxidantes (Hansberg, 2002). Sin embargo esta característica (y su tiempo de vida media) permite al $O_2^{\bullet-}$ viajar ciertas distancias desde el punto donde fue generado antes de causar daño o de reaccionar con otras moléculas. Este hecho tiene sentido biológico ya que al desplazarse el $O_2^{\bullet-}$ lejos del sitio de su generación evita que el daño oxidativo se produzca en las membranas de los leucocitos del hospedador, ocasionando así el daño (lejos del hospedador) en las estructuras parasitarias. Cabe señalar que moléculas más reactivas como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) prácticamente reaccionan en el mismo sitio donde son generadas causando el daño de manera inmediata. También se sabe que el $O_2^{\bullet-}$ debido a su carga, difícilmente logra atravesar las membranas, solamente es capaz de atravesarlas a través de ciertos poros aniónicos o cuando se encuentra como HO_2^{\bullet} (Hansberg, 2002). Sin embargo el $O_2^{\bullet-}$ puede dismutar espontáneamente, reaccionar con metales de transición o con enzimas como la SOD para formar el H_2O_2 , que si es capaz de difundir a través de la membrana causando un mayor daño oxidativo en las estructuras parasitarias. Otra reacción muy importante del $O_2^{\bullet-}$ es la que se da al reaccionar con óxido nítrico para generar el peroxinitrito el cual es altamente tóxico y dañino para las células. Por otro lado, se sabe que el $O_2^{\bullet-}$ puede actuar como una molécula pro inflamatoria que participa como agente citotáctico en el reclutamiento de células de la respuesta inflamatoria (Guzik y cols. 2003), así pues la función de este radical no solamente sería importante para el ataque oxidativo si no también para la formación de la respuesta inflamatoria, esto ha sido demostrado plenamente ya que actualmente se utiliza a la enzima SOD como medicamento antiinflamatorio para el tratamiento de diversas patologías

relacionadas con procesos inflamatorios (Cruzzocrea, y cols. 2004). Lo antes mencionado es muy interesante para el caso de la cisticercosis ya que se ha observado que los cisticercos del músculo esquelético de los cerdos presentan una reacción inflamatoria moderada que en parte podría ser explicada por la acción de enzimas antioxidantes como la SOD. Es muy importante recalcar que el $O_2^{\bullet-}$ no se genera únicamente durante el estallido respiratorio si no que también se produce durante el metabolismo del parásito como producto de la cadena respiratoria o de la acción de enzimas como la xantina oxidasa. La SODs son las únicas enzimas encargadas de dismutar al $O_2^{\bullet-}$ y se ha demostrado que organismos carentes de las SOD-Cu/Zn presentan una menor supervivencia, o una menor tasa de reproducción y los que carecen de SOD-Mn no son viables (Li y cols. 1995). Es evidente la importancia que tienen las enzimas que inactivan al $O_2^{\bullet-}$, por lo tanto la SOD podría ser una molécula clave para entender los mecanismos antioxidantes del parásito y la caracterización de esta enzima permitirá generar conocimiento que pudiese ser útil para desarrollar inhibidores específicos o inmunológicos que ayudasen al hospedero a la destrucción de *T. solium*.

Durante este estudio se decidió caracterizar a la SOD de tipo Cu/Zn ya que se sabe que las enzimas SODs de tipo Hierro y Níquel (Fe/Ni) solamente se encuentran en bacterias, protozoarios y en algunas plantas. Por otro lado, cabe señalar que aunque las SODs-Mn también se encuentran en los Metazoarios, estas enzimas solo se encuentran en pequeñas cantidades y su actividad esta restringida a la mitocondria. Las enzimas de tipo Cu/Zn se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes y presentan una localización más amplia: en el citósol, en el periplasmica y algunas son secretadas extracelularmente (James, 1994). El primer objetivo de nuestro trabajo, fue demostrar que *T. solium* poseía un cDNA que codificaba para una SOD-Cu/Zn. Puesto que las enzimas antioxidantes se han conservado a lo largo de la evolución, se sabe que estas enzimas presentan sitios característicos que fácilmente pueden ser identificados. Estas similitudes nos permitieron diseñar un par oligonucleótidos para amplificar una región de la SOD-Cu/Zn que pudiese servir como sonda específica. La sonda fue secuenciada para comprobar que efectivamente su secuencia correspondía a un fragmento de una SOD-Cu/Zn. La sonda permitió la identificación de 8 clonas que presentaron el mismo patrón de restricción, se seleccionaron las 2 clonas con mayor tamaño ya que era mas probable que contuviesen la secuencia completa del cDNA que codifica para la enzima. La secuencia obtenida revelo la presencia de todos los sitios esenciales para la actividad catalítica de la SOD-Cu/Zn y también se identificaron los codones de inicio y de terminación. Siguiendo con la caracterización de la secuencia, se procedió a determinar el grado de identidad (de la secuencia completa) respecto a otras enzimas de tipo Cu/Zn, este aspecto era de sumo interés para nosotros ya que esto nos permitiría establecer si existían diferencias a nivel de secuencia con las SODs-Cu/Zn del humano y del cerdo. Los resultados indicaron que el mayor porcentaje de identidad fue encontrado con el trematodo *S. mansoni* (71%) mientras que las otras especies comparadas presentaron porcentajes de entre el 53 y 59%. Al comparar la secuencia de *T.*

Cooper, zinc superoxide dismutase in E. coli, periplasmic localization

Benow L., Cheng L.H., Day B., Fridovich I.

Archives of Biochemistry and Biophysics 319 (2)

508-511

The copper- and zinc-containing superoxide dismutase from

E. coli: Molecular weight and stability

Archives 340 (2) 305-310

Benow L., Sage H., Fridovich I.

solium con la secuencia del cerdo y del humano se pudieron detectar algunas regiones diferentes, sobre todo hacia la parte amino terminal de la secuencia de aminoácidos. Estas diferencias detectadas pudiesen servir como referencia para usarlas en la producción de anticuerpos y moléculas específicas capaces de reconocer estas regiones. Continuando con la caracterización molecular se procedió a realizar un estudio de tipo Southern blot con el objeto de determinar si existían una o varias copias del gen en el genoma total de *T. solium*. el resultado indicó que la SOD-Cu/Zn presenta un patrón característico de un gen de copia única.

Para cumplir nuestros objetivos particulares necesitábamos disponer de grandes cantidades de proteína para los experimentos de: caracterización, actividad e inhibición, producción de anticuerpos, inmunoelectrotransferencias, estudios de vacunación etc. Por lo antes mencionado, se decidió producir una enzima recombinante en un sistema bacteriano. La enzima fue clonada en el sistema pRSET que permite clonar enzimas con colas de histidina para facilitar su purificación, sin embargo el uso de estos aminoácidos puede afectar la conformación nativa de la proteína o bien puede afectar la actividad enzimática, por lo tanto se optó por la producción de una enzima de tipo silvestre (Wild type). El producto de la expresión fue visualizado en un gel de acrilamida al 12% en condiciones reductoras y se observó una sola banda de alrededor de 15.5 kDa, dicho peso molecular coincidía con el tamaño teórico esperado (15, 558 Da). Hay que señalar que *E. coli* también posee una SOD-CuZn, sin embargo esta proteína presenta un peso molecular de 17, 000 Da, por lo tanto, en caso de una co-purificación serían visibles dos bandas en un gel SDS-PAGE, además se sabe que la SOD-Cu/Zn de *E. coli* se encuentra anclada al periplasma de la bacteria (Benov y cols. 1996) por lo que suponemos que esta proteína se encuentra en la fracción insoluble de la expresión.

Una característica importante que fue aprovechada durante la purificación de la SOD-Cu/Zn fue la alta solubilidad que presenta la enzima, ya que esto nos permitió separarla de la mayoría de las proteínas no solubles de *E. coli*, obteniendo así una gran cantidad de proteína desde el primer sobrenadante producto de la centrifugación de las bacterias. Posteriormente dicho sobrenadante fue adicionado a una columna de intercambio iónico equilibrada a pH 7.5. Como se esperaba la proteína no se pegó a la columna y fue obtenida en las primeras fracciones observándose un elevado grado de purificación. Las fracciones positivas nuevamente fueron dializadas y adicionadas a una columna de intercambio iónico a pH 8.9. Como producto de la 2ª cromatografía se obtuvo a la proteína purificada, sin embargo se observó que la actividad de la enzima era relativamente baja (35.7 u/mg). Este problema fue resuelto con la adición al medio de cultivo de CuSO_4 (0.2mM) y ZnSO_4 (0.17mM). Estos cofactores son esenciales para la actividad de la SOD y no se encuentran disponibles en grandes cantidades en *E. coli* (ni en los componentes del medio de cultivo), por lo que después de la adición de estos cofactores (Cu/Zn) se observó un considerable aumento en la actividad enzimática (2,941 U/mg). Una vez que se determinó la pureza y la actividad de

la SOD de *T. solium* se procedió a determinar el peso molecular nativo mediante una columna de filtración, el resultado indicó que la proteína presentaba un peso de alrededor de 30 kDa por lo que se estableció que la estructura de la proteína era dimérica con dos subunidades de 16 kDa. Este resultado es congruente con otros estudios ya que se sabe que las SODs-Cu/Zn de los Eucariontes son activas solamente como diméros, mientras que las SODs-Cu/Zn de procariontes son activas solamente como monómeros (Venov y cols. 1996)

Para caracterizar el tipo de cofactor metálico de la enzima se hicieron estudios de inhibición utilizando inhibidores específicos para cada tipo de SOD. Así pues se sabe que el KCN es inhibidor de las SODs-Cu/Zn, el NaN_3 es inhibidor de las SODs-Mn, mientras que el H_2O_2 inhibe a las SODs-Fe/Ni. Se comprobó que el KCN a una concentración de 10 mM era suficiente para abatir totalmente la actividad de la enzima y puesto que no se observó ningún efecto sobre la actividad con la adición del NaN_3 y el H_2O_2 se concluyó que la enzima era de tipo Cu/Zn. El albendazol es un fármaco de la familia de los benzimidazoles que ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de la cisticercosis, su mecanismo de acción aun no es del todo conocido, aunque se sabe que puede actuar como inhibidor de la polimerización de la actina afectando la formación del citoesqueleto. Algunos estudios de inhibición indicaban que la familia de los benzimidazoles y algunos derivados de las pirimidinas eran capaces de inhibir la actividad de enzimas como las fumarato deshidrogenada y las SODs de algunos parásitos (Sanchez-Moreno y cols. 1989). Sin embargo en estos estudios la determinación de la actividad de la enzima se realizó utilizando extractos crudos de los parásitos, por lo tanto, no se podía establecer claramente si estos fármacos estaban actuando directamente inhibiendo a la enzima o si la inhibición era producto de alguna otra molécula (secundaria) generada por la adición del fármaco. En este sentido y dado que disponíamos de grandes cantidades de enzima decidimos evaluar el efecto de dos benzimidazoles comerciales (el tiabendazol y el albendazol) sobre actividad de la enzima de *T. solium* y también comparar el efecto de los fármacos en contra de una SOD-Cu/Zn comercial de *B. taurus*. El resultado indicó que usando concentraciones de 0.5 mM y 0.3 mM para el tiabendazol y el albendazol respectivamente, se observaba una inhibición casi total de la enzima, mientras que interesantemente usando las mismas concentraciones no se observó ningún efecto sobre la SOD-Cu/Zn del mamífero. Estos resultados demuestran que existen diferencias estructurales en las enzimas que permiten a los fármacos actuar de manera diferente sobre ambas enzimas. Futuros estudios computacionales y/o de cristalografía podrían ayudar a la identificación de los sitios de unión de los fármacos en la molécula permitiendo determinar sus mecanismos de acción. Otro aspecto importante a tomar en cuenta son las concentraciones de los fármacos usadas en nuestro experimento, ya que las concentraciones utilizadas fueron relativamente altas si se comparan con las concentraciones que alcanzan estos fármacos en el organismo. Las concentraciones máximas reportadas para el tiabendazol son de 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tocco y cols. 1966), mientras que nuestros ensayos indican que a

concentraciones de tiabendazol de 10 μM y 100 μM se obtienen inhibiciones del 14 y 37% respectivamente que probablemente no son relevantes para la supervivencia del parásito. Por otro lado se sabe que el albendazol es una molécula con una menor solubilidad por lo que sus concentraciones máximas son de 2.96 $\mu\text{g/ml}$ (Jung y cols. 1992), la concentración de albendazol mas cercana en nuestro experimento fue de 10 μM donde se observo una inhibición del 10%. Aparentemente dichas concentraciones no tendrían un efecto importante sobre la inhibición de la enzima a nivel de cisticerco ya que la absorción de los fármacos es baja, sin embargo el efecto de estos fármacos si podría tener efecto sobre la enzima a nivel de adulto ya que las concentraciones alcanzadas en el intestino son mucho mayores (aprox. 10 mg por kg. de peso). Por lo tanto nuestros estudios sugieren que el albendazol pudiese estar afectando la actividad de esta enzima *in vivo* (en el adulto) contribuyendo junto con otros efectos (como la inhibición de la actina) a la destrucción del parásito. Así mismo estos estudios abren la posibilidad de estudiar los mecanismos mediante los cuales están actuando estos fármacos, lo que permitiría diseñar moléculas más específicas y solubles para inhibir eficazmente a la enzima.

Continuando con los estudios de inhibición se decidió evaluar el efecto de los anticuerpos anti-SOD-Cu/Zn sobre la enzima. Estudios realizados por otros grupos de investigación indicaban que la actividad de la enzima SOD-Cu/Zn de *Dyctiocaulus viviparus* y *O. volvulus* podría ser inhibida con anticuerpos anti-SOD-Cu/Zn en un 40% y un 80% respectivamente (Britton y cols. 1994, Henkle-Duhrsen y cols. 1994). Sin embargo nosotros evaluamos el efecto de los anticuerpos anti-SOD-Cu/Zn de *T. solium* y no observamos ningún efecto sobre la actividad de la enzima. Este resultado confirma la importancia de las diferencias estructurales entre las SODs de distintas especies ya que en este caso los epitopos reconocidos por los anticuerpos se encuentran en sitios irrelevantes o no relacionados con la actividad catalítica de la enzima.

Otro estudio consistió en investigar si los anticuerpos eran capaces de reconocer a las SODs de otros organismos, así pues encontramos que nuestros anti-SOD-Cu/Zn de *T. solium* reconocen claramente a nivel de genero a varias especies de Tenidos (*T. saginata*, *T. taeniaeformis* y *T. crassiceps*), sin embargo no cruzan con extractos crudos de Trematodos (*F. hepatica* y *S. mansoni*), Nematodos (*Gnathostoma sp.* y *T. trichiura*) y Mamíferos (*B. taurus*, *S. scrofa* y *H. sapiens*). Las reacciones cruzadas con los tenidos seguramente se relacionan con el parentesco filogenético que existe entre las diferentes especies de Taenias. Como una evidencia clara de esta similitud podemos mencionar que una SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps* secuenciada por nuestro grupo presento un 98% de identidad respecto a la SOD-Cu/Zn de *T. solium* (Dato no publicado) por lo tanto es de esperar que las similitudes inmunológicas se conserven entre ambas especies. En este caso, parece ser que las similitudes inmunológicas tienden perderse cuando se avanza en la escala filogenética, ya que se observó que los anticuerpos no reconocen a nivel de clase a los Trematodos y a nivel de phylum a los Nematodos y los

Mamíferos. Esto podría deberse a las diferencias que se pueden observar en las secuencias de aminoácidos, ya que estas zonas (diferentes) podrían estar siendo expuestas en la molécula y por lo tanto pudiesen funcionar como epitopos dando la especificidad a los anticuerpos. El que nuestros anticuerpos no presenten reacciones cruzadas con las SODs del cerdo y del humano es muy importante, ya que esto sustenta la posibilidad del uso de la SOD-Cu/Zn como antígeno en ensayos de vacunación. Las inmunoelctrotransferencias también sirvieron para demostrar que la SOD-Cu/Zn es constitutiva y que se expresa durante todo el ciclo de vida del parásito. Esto apoya la hipótesis de que la enzima es muy importante para el metabolismo y protección del parásito, sobre todo por la diversidad de microambientes a los que tiene que adaptarse *T. solium* durante su ciclo biológico. En este sentido el desarrollo de una vacuna o de algún fármaco específico basado en la inhibición de esta enzima sería efectivo para cualquier estadio de *T. solium* lo cual representaría una ventaja.

Como se sabe la SOD es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de las células aunque puede llegar a tener localizaciones específicas. Por lo tanto procedimos a determinar la localización de la enzima en cortes de cisticercos. Utilizando los anti-SOD-Cu/Zn de *T. solium* se determinó que la SOD se encuentra distribuida a lo largo del tegumento, observándose también en las células subtegumentales. Esta localización posiblemente pudiese estar relacionada con la protección que pudiese estar dando la enzima en la interfase huésped-parásito, debido a que el tegumento es la zona más externa del parásito y se encuentra en contacto con la respuesta inflamatoria, por lo tanto el disponer de enzimas protectoras como la SOD cerca de la interfase sería un punto muy importante para la defensa de los cisticercos. Este resultado concuerda con la localización de otras enzimas antioxidantes de *T. solium* que han sido caracterizadas por nuestro grupo, como es el caso de la GST y de la PRX, cuyas localizaciones son claramente tegumentales (Vibanco y cols. 1999). También es importante mencionar que el tegumento de *T. solium* es de naturaleza sincicial y que por debajo de este se encuentran una gran cantidad de células subtegumentales (como los citones y células flamíferas) que probablemente tengan funciones secretoras, además esta zona se encuentra conectada con el tegumento por una serie de canales en red. Por lo tanto existe la posibilidad de que la SOD-Cu/Zn este siendo sintetizada en este tipo de células para posteriormente ser exportada hacia el tegumento o hacia el exterior. Sin embargo sería necesario realizar más estudios para determinar esta posibilidad.

El experimento de supervivencia al estrés oxidativo fue generado por el sistema xantina oxidasa/acetaldéhidó, se sabe que este sistema es un generador de $O_2^{\cdot-}$. Además cabe señalar que este sistema fue elegido para permitirnos comparar nuestro estudio con los resultados obtenidos para larvas de *S. mansoni* y *F. hepatica*. Los resultados indican que en comparación con larvas de *S. mansoni* y *F. hepatica*, el cisticercos de *T. solium* es más resistente al estrés oxidativo. Es evidente que los cisticercos logran sobrevivir al estrés

gracias a sus mecanismos antioxidantes y probablemente la SOD-Cu/Zn tenga un papel importante en la protección del cisticerco ya que como se menciono anteriormente este sistema genera grandes cantidades de $O_2^{\cdot -}$, sin embargo hay que tomar en cuenta que este radical también puede generar otros radicales mas tóxicos por lo que la participación de otras enzimas también es importante.

Para evaluar el posible efecto protector de la SOD-Cu/Zn en contra de la cisticercosis utilizamos el modelo de *T. taeniaeformis*/rata/gato. Como ya se menciono la SOD-Cu/Zn de los Tenidos presenta grandes similitudes a nivel de secuencia y a nivel inmunológico (reacciones cruzadas con anticuerpos). Además, el modelo utilizado presenta similitudes con el desarrollo de las oncosferas de *T. solium*, ya que las los huevos de *T. taeniaeformis* eclosionan en el aparato digestivo de la rata y una vez que se han activado las oncosferas tienen que atravesar el epitelio gástrico para desplazarse hacia el hígado por vía sanguínea para pasar al estadio de cisticerco. Por lo tanto durante este proceso las oncosferas están expuestas al ataque inmunológico del huésped. Como se sabe la enzima SOD-Cu/Zn también se encuentra en organismos mamíferos, por lo tanto cabria preguntarse si es posible utilizar a la SOD como inmunogeno. En este sentido cabria señalar que aparentemente las diferencias que existen entre las SODs de diferentes especies permiten al sistema inmune distinguir de las SODs exógenas de las propias. A la fecha existen pocos estudios en donde se ha utilizado a la SOD como antígeno, sin embargo al menos en los reportes existentes y en nuestra experiencia no han observado evidencias de respuestas autoinmunes. Los estudios preliminares de vacunación que realizamos en este trabajo, indican que 20 μ g de SOD-Cu/Zn de *T. solium* son capaces de conferir una protección de alrededor del 60% en ratas inmunizadas e infectadas con cisticercos de *T. taeniaeformis* (Fig. 17). Estudios de vacunación realizados por otros grupos en donde se ha utilizado a la SOD-Cu/Zn (periplasmica) como antígeno indican que la proteína también es capaz de proteger a ratones inmunizados en contra de la Brucellosis (Oñate y cols. 1999) y recientes estudios realizados en *S. mansoni* indican una protección del 40 al 60% en ratones inmunizados con un plasmido recombinante que expresa la SOD-Cu/Zn citosolica mientras que la SOD-Cu/Zn Extracelular induce una protección del 22-45% (Shalaby y cols. 2003). Otro estudio realizado por este mismo grupo indico que la inmunización con la SOD-Cu/Zn en un modelo murino también protege en un 39% a ratones a los que les fueron inoculados gusanos adultos de *S. mansoni* por vía intravenosa (Cook y cols. 2004). Los resultados antes mencionados son alentadores para nuestro grupo ya que aparentemente la SOD-Cu/Zn es un buen candidato para ser usado como antígeno en ensayos de vacunación.

Para determinar la respuesta humoral inducida por la SOD, se evaluaron los títulos de IgG1a e IgG2a. Solamente se evaluaron los títulos de las ratas inmunizadas con 20 μ g de proteína ya que a dosis menores no se observo producción de anticuerpos. Los resultados indicaron que tanto las ratas control como las ratas inmunizadas no presentaron títulos de anticuerpos específicos

IgG1 para la SOD de *T. solium*, pero por otro lado si se observo un claro incremento en los niveles de IgG2a en las ratas inmunizadas (Fig. 18). También se observo un ligero incremento en los niveles de IgG2a (específicos para SOD) en las ratas control, probablemente debido a que el parásito expone cantidades muy pequeñas de este antígeno. Estudios de vacunación en donde se ha evaluado la respuesta inmune inducida por la SOD se han demostrado que esta enzima induce tanto una respuesta humoral como celular, puesto que se detecta un incremento en los niveles de anticuerpos IgG2a así como en los niveles de interferón gama y no así en los niveles de IgG1 y de la IL-10 e IL-4, demostrándose una respuesta típica del tipo Th1 (Oñate y cols. 2003). Los resultados obtenidos con los anticuerpos son similares a los que se obtuvieron en nuestro trabajo y estos datos sugieren que la inmunización con SOD produce una respuesta de tipo humoral característica del patrón Th1. También en el estudio realizado por Cook y cols. (2004) se demuestra que la inmunización con SOD-Cu/Zn produce una respuesta de tipo Th1 caracterizada por un incremento en los niveles de IgG2a e IFN- γ . Estos resultados son interesantes ya que en los estudios de vacunación que se han realizado en *T. crassiceps* se ha visto que las respuestas de tipo Th2 favorecen la infección de ratones, mientras que las respuestas de tipo Th1 son protectoras (Terrazas y cols. 1999). Por lo que de comprobarse que la SOD-Cu/Zn de *T. solium* induce una respuesta tipo Th1, podría explicarse en parte el efecto protector de la enzima. Sin embargo en el caso de la SOD-Cu/Zn todavía hay que evaluar la participación de la respuesta inmune celular y citotóxica.

Hasta la fecha se conoce poco acerca de las enzimas que participan en el metabolismo de *T. solium*, el estudio de estas enzimas permitirán un entendimiento mas claro de la biología de este parásito, lo que a su vez permitirá desarrollar mejores estrategias para el desarrollo de herramientas útiles en el control y el tratamiento de esta enfermedad. Nuestro trabajo es una importante contribución en este sentido. La descripción de la caracterización y purificación de la enzima permitirá la obtención de enzima suficiente para la realización de los futuros estudios de vacunación, inhibición específica y cristalografía. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que la SOD-Cu/Zn tiene una participación importante en el metabolismo oxidativo de *T. solium* y demuestran que existe la posibilidad de inhibir específicamente a esta enzima, además se evidencia el potencial uso de esta enzima en la vacunación en contra de la cisticercosis.

9.- CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- La *T. solium* posee una enzima SOD-Cu/Zn capaz de inactivar al $O_2^{\cdot -}$.
- Los estudios de actividad demuestran que el Albendazol y el Tiabendazol son capaces de abatir la actividad enzimática de la SOD.
- Los anticuerpos anti-SOD-Cu/Zn no tienen efecto sobre la actividad de la enzima.
- La SOD-Cu/Zn se expresa constitutivamente durante todo el ciclo de vida del parásito.
- La SOD-Cu/Zn presenta una localización tegumental y subtegumental en los cisticercos de *T. solium*.
- Los cisticercos son resistentes al estrés oxidativo producido por el $O_2^{\cdot -}$ *In Vitro*.
- Los anticuerpos anti-SOD-Cu/Zn de *T. solium* reconocen las SODs-Cu/Zn de Tenidos pero no reconocen a las SODs-Cu/Zn de los distintos organismos evaluados en este estudio.
- La inmunización de ratas con la SOD-Cu/Zn de *T. solium* confiere protección parcial en contra de la cisticercosis por *T. taeniaeformis*.
- La inmunización con SOD produce una respuesta humoral caracterizada por un incremento en los niveles de IgG2a.
- La SOD-Cu/Zn de *T. solium* es un potencial blanco para el desarrollo de fármacos y vacunas en contra de la cisticercosis.

10.- BIBLIOGRAFÍA.

Allan JC, Velasquez-Tohom M, Torres-Alvarez R, Yurrita P, Garcia-Noval J. Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Apr;54(4):352-6.

Beauchamp C.O., Fridovich I. 1971. Superóxide dismutase: improve assays and assays applicable to polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.

Benitez L, Garate T, Harrison LJ, Kirkham P, Brookes SM, Parkhouse RM. Cloning and sequencing of the gene encoding the principal 18-kDa secreted antigen of activated oncospheres of *Taenia saginata*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Jun;78(1-2):265-8.

Benov, L., Sage, H, Fridovich I. The Copper- and Zinc-Containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*: Molecular Weight and Stability *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 340, Issue 2, 15 April 1997, Pages 305-310.

Britton C, Knox DP, Kennedy MW. Superoxide dismutase (SOD) activity of *Dictyocaulus viviparus* and its inhibition by antibody from infected and vaccinated bovine hosts. *Parasitology.* 1994 Aug;109 (Pt 2):257-63.

Brandt JR, Geerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, Falla N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int J Parasitol.* 1992 Jul;22(4):471-7.

Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today.* 1988 Aug;4(8):218-25.

Choromanski L, Estrada JJ, Kuhn RE. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. *J Parasitol.* 1990 Feb;76(1):69-73.

Correa D, Sandoval MA, Harrison LJ, Parkhouse RM, Plancarte A, Meza-Lucas A, Flisser A. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Nov-Dec;83(6):814-6.

Cuzzocrea S, Thiemermann C, Salvemini D. Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr Med Chem.* 2004 May;11(9):1147-62.

Del Brutto OH, Sotelo J, Roman GC. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. *Clin Infect Dis.* 1993 Oct;17(4):730-5.

Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop.* 2003 Jun;87(1):79-86.

Erhart A, Dorny P, Van De N, Vien HV, Thach DC, Toan ND, Cong le D, Geerts S, Speybroeck N, Berkvens D, Brandt J. *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Viet Nam: seroprevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 May-Jun;96(3):270-2.

Ferreira AP, Vaz AJ, Nakamura PM, Sasaki AT, Ferreira AW, Livramento JA. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997

Flury A, Bouteille B, Garcia E, Marquez C, Preux PM, Escobedo F, Sotelo J, Dumas M. Neurocysticercosis: validity of ELISA after storage of whole blood and cerebrospinal fluid on paper. *Trop Med Int Health*. 2001 Sep;6(9):688-93.

Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today*. 1988 May;4(5):131-7.
Flisser A y Malagon. Epidemiología de la cisticercosis porcina. *En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación*. 1989 (eds). Limusa. México. 3-6.

Flisser A, Gonzalez D, Shkurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodriguez-Carbajal J, Cohen S, Rodriguez-del-Rosal E, Collado M, Fernandez B. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 1. Radiological, physiological and histopathological studies. *Parasitol Res*. 1990;76(3):263-9.

Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol*. 1994;4:77-116.

Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis humana. Manual moderno. 1997. ed. Manual moderno. 176pp.

Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):43-51.

Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martinez-Ocana J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowers MW. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5292-7.

Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*. 1998 Apr;201 (Pt 8):1203-9.

Garcia E, Sotelo J. A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. *J Neurol*. 1991 Oct;238(7):379-82.

Garcia HH, Gilman RH, Catacora M, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VC. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. Cysticercosis Working Group in Peru. *J Infect Dis*. 1997 Feb;175(2):486-9.

Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Pacheco R, Verastegui M, Tsang VC. Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the highlands of Cusco, Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Acta Trop*. 1999 May 25;73(1):31-6.

Garcia HH, Parkhouse RM, Gilman RH, Montenegro T, Bernal T, Martinez SM, Gonzalez AE, Tsang VC, Harrison LJ; Cysticercosis Working Group in Peru. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000 Nov-Dec;94(6):673-6.

Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH; Cysticercosis Working Group in Peru. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Oct;16(5):411-9. Review.

Garcia-Noval J, Moreno E, de Mata F, Soto de Alfaro H, Fletes C, Craig PS, Allan JC. An epidemiological study of epilepsy and epileptic seizures in two rural Guatemalan communities. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001 Mar;95(2):167-75.

Gauci CG, Flisser A, Lightowers MW. A *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18 kDa antigens. *Int J Parasitol*. 1998 May;28(5):757-60.

- Gauci CG, Lightowers MW.** Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. 2001
- Gonzalez AE, Falcon N, Gavidia C, Garcia HH, Tsang VC, Bernal T, Romero M, Gilman RH.** Time-response curve of oxfendazole in the treatment of swine cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Nov;59(5):832-6.
- Gottstein B, Tsang VC, Schantz PM.** Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Mar;35(2):308-13.
- Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T.** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003 Dec;54(4):469-87.
- Hansberg-Torres W.** Biología de las Especies de Oxígeno Reactivas. En mensaje Bioquímico. Fac. Medicina. UNAM. 2002. 19-51pp.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.** Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford Univ. Press; 1999.
- Harrison LJ, Joshua GW, Wright SH, Parkhouse RM.** Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1989 Jul;11(4):351-70.
- Harrison GB, Heath DD, Dempster RP, Gauci C, Newton SE, Cameron WG, Robinson CM, Lawrence SB, Lightowers MW, Rickard MD.** Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. *Int J Parasitol.* 1996 Feb;26(2):195-204.
- Henkle KJ, Liebau E, Muller S, Bergmann B, Walter RD.** Characterization and molecular cloning of a Cu/Zn superoxide dismutase from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Infect Immun.* 1991 Jun;59(6):2063-9.
- Henkle-Duhrsen K, Kampkotter A.** Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 May;114(2):129-42.
- Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernandez M, Gevorkian G, Acero G, Diaz A, Alvarez I, Avila R, Beltran C, Garcia G, Martinez JJ, Larralde C, Sciutto E.** Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine.* 2001 Oct 12;20(1-2):262-6.
- Hong Z, LoVerde PT, Hammarskjold ML, Rekosh D.** *Schistosoma mansoni*: cloning of a complementary DNA encoding a cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and high-yield expression of the enzymatically active gene product in *Escherichia coli*. *Exp Parasitol.* 1992 Nov;75(3):308-22.
- Ito A, Takami T, Itoh M.** Vaccine effect of intact metacestodes of *Taenia crassiceps* against *T. taeniaeformis* infection in rats. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Jun;44(6):696-701.
- Ito A, Hashimoto A.** Vaccination with hatched but non-activated, non-viable oncospheres of *Taenia taeniaeformis* in rats. *J Helminthol.* 1993 Jun;67(2):165-8.
- Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY, Liu YH, Kamhawi S, Lightowers MW, Schantz PM.** Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Aug;59(2):291-4.

James ER. Superoxide dismutase. *Parasitol Today*. 1994;10(12):481-4.

Johnson KS, Harrison GB, Lightowlers MW, O'Hoy KL, Cogle WG, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG, Heath DD, Rickard MD. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 1989 Apr 13;338(6216):585-7.

Jung, H., Hurtado, M., Sa´nchez, M., Medina, M.T., Sotelo, J., 1992. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J. Clin. Pharmacol.* 32, 28–31.

Kim TS, Jung Y, Na BK, Kim KS, Chung PR. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):3941-8.

Ku-chuan H. A fast and simple procedure for sequencing double stranded DNA with Sequenase. 1991. *Nucleic Acids Research*. 19:10

Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT & Willms K. Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In: *Cysticercosis. Present state of Knowledge and perspectives*. Academic Press, New York.1982, 337.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Larralde C, Padilla A, Hernandez M, Govezensky T, Sciutto E, Gutierrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepulveda J. Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico. *Salud Publica Mex*. 1992 Mar-Apr;34(2):197-210.

Li, y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C. Andchan, P. H. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet.* 11, 376–381.

Loverde PT. Do antioxidants play a role in *Schistosoma* host parasite interactions?. *Parasitology Today*. 1998, 4, 284-289.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol*. 1996 Apr;82(2):250-4.

Martinez HR, Rangel-Guerra R, Elizondo G, Gonzalez J, Todd LE, Ancer J, Prakash SS. MR imaging in neurocysticercosis: a study of 56 cases. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1989 Sep-Oct;10(5):1011-9.

McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6056-63.

Miller B, Goldberg MA, Heiner D, Myers A, Goldberg A. A new immunologic test for CNS cysticercosis. *Neurology*. 1984 May;34(5):695-7.

Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Oct;49(4):502-12.

- Nascimento E**, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995 Mar;45(1-2):127-37.
- Onate AA**, Vemulapalli R, Andrews E, Schurig GG, Boyle S, Folch H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun*. 1999 Feb;67(2):986-8.
- Oñate AA**, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, Munoz C, Folch H, Andrews E. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):4857-61.
- Parkhouse RM**, Harrison LJ. Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia* sp. metacestodes. *Parasite Immunol*. 1987 Mar;9(2):263-8.
- Piedrafita D**, Spithill TW, Dalton JP, Brindley PJ, Sandeman MR, Wood PR, Parsons JC. Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*. 2000 Jun;22(6):287-95.
- Rice-Evans CA**, y Burdon RH. Free Radical Damage and its Control. 1994. Ed. Elsevier. 392pp.
- Roca C**, Gascon J, Font B, Pujol T, Valls ME, Corachan M. Neurocysticercosis and population movements: analysis of 23 imported cases in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Jun;22(6):382-4
- Rocha SM**, Suzuki LA, Silva AD, Arruda GC, Rossi CL. A rapid latex agglutination test for the detection of anti-cysticercus antibodies in cerebrospinal fluid (CSF). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002 Jan-Feb;44(1):57-8.
- Sanchez-Moreno M**, Garcia-Ruiz MA, Garcia-Rejon L, Valero A, Leon P. Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by a series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis. *Arzneimittelforschung*. 1989 Jul;39(7):759-61.
- Sarti E**, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Feb;56(2):127-32.
- Sarti E**, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000 Jan-Feb;94(1):85-9.
- Sarti E**, Rajshekhar V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):137-43.
- Sciutto E**, Fragoso G, Fleury A, Lacleite JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*. 2000 Dec;2(15):1875-90.
- Schantz PM**, Sarti-Gutierrez E. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden*. 1989;57(2):153-63.
- Schantz, P.M.**, Wilkins, P.P., Tsang, V.C.W., 1998. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: Scheld, W.M., Craig,

W.A., Hughes, J.M. (Eds.), *Emerging Infections 2*. American Society of Metals, Washington, DC, pp. 213_242.

Selkirk ME, Smith VP, Thomas GR, Gounaris K. Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Int J Parasitol*. 1998 Sep;28(9):1315-32.

Shalaby KA, Yin L, Thakur A, Christen L, Niles EG, LoVerde PT. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine*. 2003 Dec 8;22(1):130-6.

Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch Intern Med*. 1985 Mar;145(3):442-5.

Sotelo J, Central Nervous System Infectious Diseases and therapy, Marcel Dekker. In: Ross ed. 1997. Marcel Dekker, Inc., New York, 545-571.

Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin Pharmacokinet*. 1998 Jun;34(6):503-15.

Sotelo J, Del Brutto OH. Brain cysticercosis. *Arch Med Res*. 2000 Jan-Feb;31(1):3-14.

Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res*. 1999 Feb;85(2):135-41.

Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989 Jan;159(1):50-9.

Tocco, D.J., Roseblum, C., Martin, C.M., Robinson, H.J., 1966. Absorption, metabolism, and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 9, 31–39.

Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Garfias CK, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun*. 1999 May;67(5):2522-30.

Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, Lopez-Casillas F, Hernandez B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1766-73.

Towbin, H., Staehelen, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4.

Vibanco-Perez N, Jimenez L, Merchant MT, Landa A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol*. 1999 Jun;85(3):448-53.

Wang CY, Zhang HH, Ge LY. A MAAb-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma*. 1992 Dec;11(6):825-7.

Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VC. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis*. 1991 Nov;164(5):1007-9.

Wilkins PP, Allan JC, Verastegui M, Acosta M, Eason AG, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VC. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Feb;60(2):199-204.

Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998 Sep;25(4-5):434-56.

White Jr, A.C., 2000. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu. Rev. Med.* 51, 187–206.

Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*[☆]

Alejandro Castellanos-González, Lucía Jiménez, Abraham Landa*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Edificio A, 2^{da} piso, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

Received 3 December 2001; received in revised form 6 May 2002; accepted 8 May 2002

Abstract

A full-length complementary DNA clone encoding a cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase with a M_r of 15,588 Da was isolated from a *Taenia solium* larvae complementary DNA library. Comparison analysis of its deduced amino acid sequence revealed a 71% identity with *Schistosoma mansoni*, 57.2–59.8% with mammalian and less than 54% with other helminth cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. The characteristic motifs and the amino acid residues involved in coordinating copper and zinc enzymatic function are conserved. The *T. solium* Cu/Zn superoxide dismutase was expressed in the pRSET vector. Enzymatic and filtration chromatographic analysis showed a recombinant enzyme with an activity of 2,941 U/mg protein and a native M_r of 37 kDa. Inhibition assays using KCN, H_2O_2 , NaN_3 and SDS indicated that Cu/Zn is the metallic cofactor in the enzyme. Thiabendazole (500 μ M) and albendazole (300 μ M) completely inhibited the activity of *T. solium* Cu/Zn superoxide dismutase. Thiabendazole had no effect on bovine Cu/Zn superoxide dismutase; in contrast, albendazole had a moderate effect on it at same concentrations. Antibodies against *T. solium* Cu/Zn superoxide dismutase did not affect the enzymatic function; nevertheless, it cross reacts with several *Taenia* species, but not with trematodes, nematodes, pig, human and bovine Cu/Zn superoxide dismutase enzymes. Western blot analysis indicated the enzyme was expressed in all stages. These results indicate that *T. solium* possesses a Cu/Zn superoxide dismutase enzyme that can protect him from oxidant-damage caused by the superoxide anion. © 2002 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Superoxide dismutase; Albendazole; Thiabendazole; Cestoda; *Taenia solium*; Complementary DNA

1. Introduction

Superoxide dismutases (SODs, 1.15.1.1) are a group of metalloenzymes essential for defending organisms against oxidation produced by the superoxide anion (O_2^-). The O_2^- is produced in organisms by enzymatic and non-enzymatic metabolic processes (Fridovich, 1998). Although O_2^- is a mild reductant, it can cause direct or indirect damage to the membranes and DNA, when it is protonated to the hydroxyl radical ($HO\cdot$) or dismutated to H_2O_2 (Birnboim and Kanabus-Kaminka, 1985). Likewise, O_2^- can react with O_2 , Fe^{3+} , H_2O_2 , and $\cdot NO$ producing other species such as peroxynitrite with high oxidising potential (Wink and Mitchell, 1998). So far, three types of SOD enzymes have been identified in helminths: the mitochondrial Mn-SOD, cytosolic Cu/Zn-SOD and extracellular Cu/Zn-SOD. The

Mn-SOD enzyme is a tetrameric protein with 22 kDa subunits, Cu/Zn-SOD is a dimeric protein with a M_r of 16 kDa per subunit, whereas the extracellular form is a tetrameric glycoprotein composed of four 30 kDa subunits with high affinity for heparin (Love, 1998; Henkle-Dürshen and Kampkötter, 2001). The Cu/Zn-SOD enzymes are inhibited specifically by KCN, moderately by H_2O_2 , but not by NaN_3 , which inhibits Fe-SOD and Mn-SOD. Organisms lacking these enzymes exhibit a decreased growth rate, short life span, hypersensitivity towards redox cycling compounds, such as paraquat and quinones, and increases in spontaneous mutagenesis and death rates (Fridovich, 1998). *Taenia solium* is the causal agent of taeniosis in humans and cysticercosis in human and pigs. Taeniosis and cysticercosis represent important public health and economic burdens for many underdeveloped countries and, recently, have become public health concerns in even developed countries, due to immigrants that carry the adult parasite (White, 2000). As other parasitic organisms, *T. solium* must neutralise endogenous and exogenous O_2^- produced by its own metabolic processes, because its larval and adult stages live

[☆] Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank data base under the Accession number (AF439353).

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5623-2357; fax: +52-55-5623-2382.

E-mail address: landap@servidor.unam.mx (A. Landa).

in tissues that are in intimate contact with a host inflammatory response (Willms et al., 1982; Monroy-Ostria et al., 1993). To now Cu/Zn-SOD enzymes from helminth parasites such as *Schistosoma mansoni*, *Onchocerca volvulus* and *Fasciola hepatica* have been cloned, expressed and characterised (Hong et al., 1992; Henkle-Dührsen et al., 1994; Kim et al., 2000). These and other reports have suggested that the enzyme is involved in parasite defense (Loverde, 1998).

Here, we report the isolation of the complementary DNA (cDNA) encoding Cu/Zn-SOD enzyme from the first cestode, *T. solium*, as well as the production and partial characterisation of the recombinant enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and crude extract preparations

Taenia solium larvae were obtained from naturally infected pigs and tapeworms from hamsters infected with 10 cysticerci for 1 month. Eggs were isolated from gravid proglottids of the adult worm obtained from a human treated with niclosamide. Oncospheres were prepared from hatched eggs in 10% sodium hypochlorite and a Percoll gradient. All stages of the parasite were washed in PBS and stored at -70°C . Crude extracts were prepared by homogenisation of parasites (1 g/5 ml) in 0.015 M phosphate, 0.45 M NaCl, pH 7.4 and centrifuged at 35,000 rpm for 15 min in a TL-100 ultracentrifuge (Beckman Inst.). The supernatant was dialysed overnight at 4°C in PBS, centrifuged as before and the crude extract stored at -20°C , until use.

2.2. Cloning and sequencing

Taenia solium larval RNA was obtained using the Trizol method and the cDNA was prepared using the Superscript preamplification system for first-strand cDNA synthesis (GIBCO-BRL). A *T. solium* Cu/Zn-SOD cDNA fragment was obtained from PCR, using 1 μg of total cDNA from the larval stage. Degenerate oligonucleotides were designed from two amino acid conserved regions of the enzyme and termed SOD1 and SOD2 (Fig. 1). PCR conditions were one cycle (95°C for 2 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min), 30 cycles (94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min) and one cycle (94°C for 1 min, 50°C for 2 min, 72°C for 10 min). The amplified PCR fragment was sequenced using a CircumVent thermal cycle dideoxy DNA sequencing kit (New England BioLabs Inc.). The amplified fragment was used to isolate a complete cDNA encoding *T. solium* Cu/Zn-SOD. Briefly, we screened 40,000 recombinant phages from a larval cDNA library constructed in vector $\lambda\text{gt}10$ (Jiménez et al., 2000), and the cDNA inserts from the positive clones were amplified through PCR using commercial $\lambda\text{gt}10$ oligonucleotides flanking the vector. The amplified products were subcloned into *Sma*I pUC18 vector via blunt-end ligation method. The DNA sequences were

carried out using the dye primer method on an automated fluorescent dye DNA sequencer ABI Prism model 310 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). Sequence analysis was performed with the freeware available at the www.biosupplynet.com/cfdocs/btk/btk.cfm.

2.3. Purification of recombinant enzyme

The complete coding region of the *T. solium* Cu/Zn-SOD cDNA was amplified by PCR, using oligonucleotide primers designed from the first and last six amino acids of the deduced polypeptide sequence. The *Nde*I and *Bgl*II sites were placed in the 5' sense and 3' antisense primers, respectively. The PCR fragment was digested with the endonucleases mentioned above and ligated into the pRSET vector, previously digested with the same enzymes. The host, *Escherichia coli* BL21 (DE) strain was transformed and the transformants were selected on LB plate with ampicillin. Selected bacteria were grown at 37°C in 1 l culture until reaching $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$. Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) was added to 1 mM and the culture incubated at 37°C for another 4 h. The bacteria were centrifuged at $11,000 \times g$ for 10 min and the pellet washed with cold PBS and centrifuged as above. Bacteria were suspended by sonication in 10 mM Tris-Acetate, pH 7.5, with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.75 M sucrose, and incubated for 30 min. The suspension was centrifuged as above and the supernatant was loaded onto a HiPrep 16/10 DEAE FF column (Amersham Pharmacia Biotech.) previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. The column was washed three times with the same buffer and the first wash (9 ml) was collected (unbound material). The bound proteins were eluted with a linear gradient of 0–0.5 M of NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Protein concentrations in the unbound and bound fractions were determined at $\text{OD}_{280\text{nm}}$ and assayed for specific Cu/Zn-SOD activity (in the absence or presence of KCN at a final concentration of 10 mM). The fractions containing the SOD activity were pooled, dialysed in a 50 mM Tris-HCl at pH 8.9, and loaded onto the same DEAE column following the same procedure as before. Again, the fractions with specific Cu/Zn-SOD activity were pooled, dialysed, concentrated, and the protein content determined by the Lowry method. The flow rate for both procedures was 5 ml/min and fractions of 3 ml were collected. To increase the proportion of active recombinant *T. solium* Cu/Zn-SOD recovered, 0.2 mM CuSO_4 and 0.17 mM ZnSO_4 were added to the bacterial cultures at the time of IPTG induction. Bovine and Human Cu/Zn-SOD enzymes were purchased from Sigma and Pig Cu/Zn-SOD enzyme was purified from blood according to method described by Lin et al. (1997).

2.4. Gel filtration chromatography

To determine the native M_r of the recombinant enzyme, it was filtered through a Superdex 75 HR 10/30 column

Hs	1	MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVGSIKGLTEGLH GFHVH FGDNTAGCTS
Bt	1	MATKAVCVLKGDPVQGTIHF EA KG--DTVVVTGSIITGLTEGDH GFHVH QFGDNTQGCSTS
Ss	1	--ATKAVCVLKGDPVQGTIYFELKGE-KTVLVTGTIKGLAEGDH GFHVH QFGDNTQGCSTS
Bp	1	MSANRIAVLRGDN-VSGIIRFKQKEGSPPTTISGEIKGLTPGLH GFHVH QYGD TT NGCIS
Ov	1	MSTNAIAVLRGDT-VSGIIRFKQKDELPTT VT GEVKGLTPGLH GFH IHQYGD TT NGCIS
Fh	1	-----MSGSSGVQGTVKFVQES TS SPVQIKVDINGLKP GKHGFHVH AYGD TT NGCIS
Sm	1	--MKAVCVMTGTAGVKGVVKTQETDNGPVHVAEFSGLKAGKH GFHVH EFGD TT NGCSTS
Ts	1	--MKAVCVMRGEEGVKGVVHFTQAGD--AVKVHAEFEG LKPGKHGFHVH EFGD TT QGCSTS
		* *
Hs	61	AGPHFNPLSRKHHGGPKDEE HRVGD LGNI TADK DGVADVSI EDSVISLSGD HCIIGRTL LV
Bt	59	AGPHFNPLSKKHHGGPKDEE HRVGD LGNI TADK NGVAIVDVIDPLISLSGEYSIIGRT MV
Ss	59	AGPHFNPEKSKHHGGPKD QERHVGD LGNI TAGK DGVATVYIEDSVIALSGDHSIIGRT MV
Bp	60	AGPHFNPNKTHGGPTDE MRHVGD LGNI VAGAD GTAHIDI SDKHV QLLGPNSIIGRSL V
Ov	60	AGPHFNPNKTHGDR TD E IRHVGD LGNI EAGAD GTAHISIS DQHI QLLGPNSIIGRSI V
Fh	53	AGPHFNPTGVDHGGPSD VRHVGD LGNI VEANQ NGLAHVE PTDS VISLSGVNSVIGRAM V
Sm	59	AGAHFNPTKQEHGAP EDSIRHVGD LGNI VVAGAD GNVAVY NATDKLIS LN SGHS SIIGRT MV
Ts	57	AGAHFNPHGKNHGAP DAEERHVGD LGNI VAGAD GKATLDL TDKML SL TGHS SVIGRSL VI
		** *
Hs	121	HEKADDLGGG--NEESTK TGNAGS R LACG VI GI AQ--
Bt	119	HEKPD DLGR GG--NEESTK TGNAGS R LACG VI GI AK--
Ss	119	HEKPD DLGR GG--NEESTK TGNAGS R LACG VI GI ITQ--
Bp	120	HADQ DDL GGV GDKK DES LKTGN AGAR VACG IV AV SAAS
Ov	120	HADQ DDL GGV GAKK DES LKTGN AGAR VACG IV AI GAAS
Fh	113	HENED DLGR GG--HEQSK ITGN AG RLACG VI GL TE--
Sm	119	HENED DLGR GG--HELSK VITGN AG RLACG VI GL AEE-
Ts	117	HVD PD DL GL GG--HELS LITGN AG RVACG IV GI AK SE
		* *

Fig. 1. Comparison of the deduced amino acid sequence of *T. solium* Cu/Zn-SOD (Ts) with various Cu/Zn-SOD enzyme sequences from: *H. sapiens* Hs (134611), *B. taurus* Bt (P00442), *S. scrofa* Ss (P04178), *B. phangi* Bp (X76284), *O. volvulus* Ov (AF009621), *F. hepatica* Fh (AAD30361) and *S. mansoni* Sm (477591). The symbol (–) indicates the absence of amino acids, (*) represents the amino acid identity. The cysteine residues used in intrachain disulphide bond, conserved residues for Cu and Zn binding and active site formation are in bold letters. Amino acid sequences used to design the sense and antisense primers are underlined and the Cu/Zn-SOD motifs are in boxes.

(Amersham Pharmacia Biotech). The column was equilibrated and used with 50 mM Tris–HCl, pH 7.5, at a flow rate of 1 ml/min and fractions of 1 ml were collected at room temperature. The column was calibrated with protein markers ranging from lysozyme (14 kDa) to β-galactosidase (116 kDa).

2.5. Antibody production

Antiserum against *T. solium* and bovine Cu/Zn-SOD enzymes were prepared by immunising rabbits with s.c. injections, under the skin neck with 50 µg of each enzyme mixed with Al(OH)₃ (v/v), every 2 weeks for 2 months. Fourteen days after the last immunisation, the rabbits were bled and the sera pooled and frozen. The IgG fraction was purified from the serum of preimmune and immunised rabbits by affinity chromatography using Protein G-agarose (Sigma). Lowry and Western blot methods were used to determine the protein concentration and specific reactivity of IgG antibodies.

2.6. Polyacrylamide Gels and Western blot

SDS-PAGE at 12.5% was performed following the method described by Laemmli (1970), where 2.5 µg of pure proteins and 10 µg of complex extracts were used. Some gels were stained by Coomassie blue and others were transferred to nitrocellulose membranes (Towbin et al., 1979). The membranes were incubated with IgG antibodies (1:1,000) produced in New Zealand rabbits. Bound antibodies to the membranes were detected by a second antibody peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2,000) and developed with 0.5 mg of 3-3'-diaminobenzidine and 20 µl of 1% H₂O₂, for 15 min at room temperature.

2.7. Determination of SOD activity by NBT-PAGE

Non-denaturing PAGE electrophoresis was performed without SDS and 2-mercaptoethanol, using the same procedure described for SDS-PAGE. Two units of the SOD enzymes were electrophoresed on 12.5% gels for 2.5 h at 100 V. The SOD activity was demonstrated in gels by the

method of Beauchamp and Fridovich (1971) as clear zones, resulting from the inhibition of photochemical reduction of NBT (Sigma). Briefly, gels were incubated in darkness for 20 min in a solution containing 10 mg of riboflavin and 25 mg of NBT in 100 ml of ddH₂O. Then, the gels were incubated in the presence of light with a solution containing 1% TEMED (Bio-Rad) in ddH₂O and the reaction stopped by adding ddH₂O. Samples were incubated for 30 min at 37°C with H₂O₂ (0, 1, 3, 6 and 12 mM), and SDS (0, 1, 2 and 4%). The bovine Cu/Zn-SOD enzyme was used as a control in all assays.

2.8. Determination of SOD activity by xanthine-xanthine oxidase

Enzyme activity was determined by the inhibition of cytochrome C reduction (McCord and Fridovich, 1969) at a final volume of 3.5 ml. The reaction included 50 mM K₂HPO₄, 10 mM EDTA, pH 7.8, 0.1 mM xanthine (Sigma) 0.019 mM cytochrome C (Sigma), and 0.3 U xanthine oxidase (Sigma). The activity was measured at OD_{550 nm} for 2 min. The assay was standardised using a commercial bovine Cu/Zn-SOD. One unit of SOD is defined as the amount that causes 50% inhibition of the reduction of cytochrome C. Specific activity was defined as units of activity per mg of protein and expressed as the mean of three independent assays. This method was also used in assays in which 100 U of the recombinant enzyme were incubated for 30 min with different concentrations of thiabendazole (0, 10, 100, 200 and 500 µM, Sigma), albendazole (0, 10, 100, 200 and 300 µM, Sigma), normal and anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD IgG antibodies (0, 1, 5, 10, 15 and 25 µg/ml), and KCN and NaN₃ (0.01, 0.1, 1 and 10 mM, Sigma).

2.9. Determination of SOD activity by epinephrine oxidation assay

This assay was performed as described previously (Kachadourian et al., 2001). Reaction mixtures contained 1 mM epinephrine (Sigma) in 50 mM sodium carbonate buffer, 0.1 mM EDTA, pH 9.8, at 23°C and 5 µg of Cu/Zn-SOD enzymes. The reaction was followed at OD_{480 nm} and read every minute after the addition of epinephrine. Thiabendazole, albendazole, normal and anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD IgG antibodies were used as described in the xanthine-xanthine oxidase method.

3. Results

3.1. Cloning and cDNA characterisation

By combining the PCR, cDNA from the parasite and a pair of oligonucleotides designed to two well-conserved regions of the Cu/Zn-SOD enzymes, we generated a 305 bp cDNA fragment encoding part of *T. solium* Cu/Zn-SOD. The fragment was used to isolate eight recombinant

phage clones from a larval *T. solium* cDNA library constructed in λgt10, three large and five short clones with cDNA inserts of around 900 and 700 bp, respectively. The sequence of two large and one short clones was identical. The large clones have a real cDNA insert of 596 bp, with 26 bp in the 5' region before the ATG codon and 110 bp after the TGA codon. Likewise, it presented a typical polyadenylation site, followed by a Poly A tail of 20 adenines at the 3' region. This clone had an open reading frame of 459 bp coding for a polypeptide of 152 amino acids (data submitted to GenBank) with a predicted *M_r* of 15.588 Da and a theoretical pI of 6.02. The short clones had a cDNA insert of 492 bp, but lacked the 26 and 78 bp at the 5' and 3' regions, respectively. Fig. 1 shows the deduced amino acid sequence from *T. solium* Cu/Zn-SOD from the large clone, which has highly conserved residues involved in the interaction with the metallic cofactor described for other Cu/Zn-SOD enzymes (H-43, H-45, H-60, H-68, H-77 and D-80, H-117). The arginine residue, which is believed necessary to guide the O₂⁻ to the active site, was found at position R-140 and the two-cysteine residues, which are also believed to form disulphide bonds, were found at positions C-54 and C-143. Furthermore, a *N*-glycosylation site was detected at the asparagine N-83 and five well conserved motifs shared by several Cu/Zn-SOD enzymes at positions 40-HGFHVHEFGDIT-51, 56-SAGAHFNP-63, 76-RHVG-DLGN-83, 121-DDLGLG-126 and 134-TGNAGGRVAC-GII-146 were also found. An analysis, comparing the amino acid sequence of *T. solium* Cu/Zn-SOD with other SOD reported in databases, showed a strong identity of 71% with *S. mansoni* and 57.2, 57.9 and 59.6% with mammals, such as *Sus scrofa* (Pig), *Homo sapiens* (Human) and *Bos taurus* (Bovine), respectively, and only 54.6% with *Fasciola hepatica*, 53.9% with *Brugia malayi* and 53.3% with *O. volvulus*, Cu/Zn-SOD enzymes.

3.2. Purification and biochemical characterisation of the recombinant enzyme

The SDS-PAGE in Fig. 2A shows the steps of the purification of the recombinant enzyme. An extract obtained from transformed bacteria with the recombinant plasmid producing the *T. solium* Cu/Zn-SOD before (lane 1) and after induction (lane 2), in which the expression of the recombinant enzyme is obvious. The clarified extract was subjected to DEAE ion-exchange chromatography using 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. The unbound fractions that contained the specific Cu/Zn-SOD activity coincided with the 16 kDa protein. These fractions were pooled and loaded onto the same DEAE column using 50 mM Tris-HCl, pH 8.9. Again, the specific Cu/Zn-SOD activity was localised in the unbound fractions that also coincided with a major 16-kDa band expressed in *E. coli* (lane 3), which is similar to the predicted *M_r* from *T. solium* Cu/Zn-SOD cDNA. The yield of this purification process was 10 mg/l of bacterial culture with 95% of pure protein. The native *M_r* of the pure recombinant enzyme was

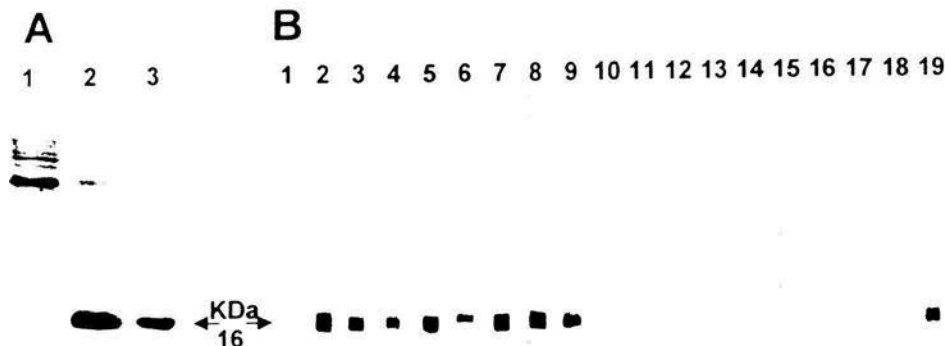


Fig. 2. Purification of recombinant *T. solium* Cu/Zn-SOD on reduced SDS-PAGE. (A) 1: lysate of *E. coli* with recombinant plasmid that produces recombinant enzyme without induction, 2: same as 1 but induced with IPTG and 3: purified *T. solium* Cu/Zn-SOD. (B) Western blot analysis of membranes with: 1: lysate of *E. coli*, 2: lysate with induced protein, 3: pure *T. solium* Cu/Zn-SOD, 4: oncosphere, 5: larvae, 6: adult from *T. solium*, 7: *T. saginata*, 8: *T. taeniaeformis*, 9: *T. crassiceps*, 10: *S. mansoni*, 11: *F. hepatica*, 12: *T. trichiura*, 13: *Gnathostoma* sp crude extracts, 14: Pig, 15: Bovine and 16: Human Cu/Zn-SODs were incubated with anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD antibodies. Membranes 17: larvae from *T. solium*, and 18: lysate of *E. coli* with induced protein were incubated with IgG isolated from preimmune rabbit serum. Lane 19: membrane with bovine Cu/Zn-SOD incubated with antiserum against bovine Cu/Zn-SOD.

obtained by filtering the enzyme through a Superdex 75 column. The enzyme eluted at around 37 kDa (data not shown), being approximately twice the size of that estimated by reduced SDS-PAGE. Fig. 2B shows the recognition of a band of 16 kDa by the specific IgG antibodies raised against the recombinant *T. solium* Cu/Zn-SOD in the Western blot membranes containing the induced *E. coli* lysate (lane 2), purified *T. solium* Cu/Zn-SOD (lane 3), crude extracts from oncospherical (lane 4), larval (lane 5) and adult (lane 6) *T. solium* stages, and crude extracts from *Taenia saginata* adult (lane 7), *Taenia taeniaeformis* adult (lane 8) and *Taenia crassiceps* larval (lane 9) stages. In contrast, the same antibodies did not recognise bands in crude extracts from *S. mansoni* adult (lane 10), *F. hepatica* adult (lane 11), *Trichiuris trichiura* adult (lane 12) and *Gnathostoma* sp. larval (lane 13) stages, and purified fraction from pig (14), commercial bovine (lane 15) and human (lane 16) Cu/Zn-SOD enzymes. Likewise, no bands were detected by these antibodies in a membrane containing *E. coli* lysate without induction (lane 1). Furthermore, no bands were seen in membranes containing *T. solium* larvae (lane 17) and *E. coli* proteins (lane 18), when the IgG fraction isolated from preimmune serum was used as first antibody. Finally, the membrane containing commercial bovine Cu/Zn-SOD (lane 19) was recognised by antiserum raised to bovine SOD. This serum cross-reacted with human and pig Cu/Zn-SOD enzymes, but did not recognise *T. solium* Cu/Zn-SOD enzyme (data not shown).

3.3. Enzymatic properties of *T. solium* Cu/Zn-SOD

Taenia solium Cu/Zn-SOD had a specific activity of 35.7

U/mg of protein, when no metal ions were added to the bacterial culture. In contrast, the activity increased to 2,941 U/mg of protein if the metal ions Cu^{2+} and Zn^{2+} were present. To determine the metallic cofactor from the enzyme, assays with increasing concentrations of KCN and NaN_3 were performed using the xanthine-xanthine oxidase method. The graph in Fig. 3A shows that KCN inhibited the enzyme activity by 14, 37 and 85% at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 mM, respectively, and completely at 10 mM; whereas NaN_3 had no effect on the enzyme at any of the concentrations tested. Fig. 3B shows that treatment with increasing concentrations of H_2O_2 and SDS did not affect the enzyme. Since H_2O_2 and SDS interfere with the xanthine-xanthine oxidase system, their effects were determined by NBT-PAGE. Fig. 4A shows that incubation of *T. solium* Cu/Zn-SOD with increased concentrations of two benzimidazoles affected enzyme function. Concentrations of 10, 100 and 200 μM of thiabendazole reduced the enzyme activity in 14, 37 and 52%, whereas a 500 μM concentration was capable of inhibiting it completely. Concentrations of 10, 100, 200 and 300 μM of albendazole reduced the enzyme activity in 14, 23 and 32%, whereas a 300 μM concentration was capable of inhibiting it completely. Of note, the thiabendazole had no effect on the bovine Cu/Zn-SOD at any concentration tested, and albendazole reduced the activity of this enzyme by 25% at the concentration of 300 μM . On the other hand, anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD antibodies did not affect the activity of *T. solium* and bovine Cu/Zn-SOD enzymes at any of the concentrations tested (data not shown). To confirm the effect obtained with thiabendazole, albendazole and the anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD antibodies on *T. solium* and bovine SOD enzymes

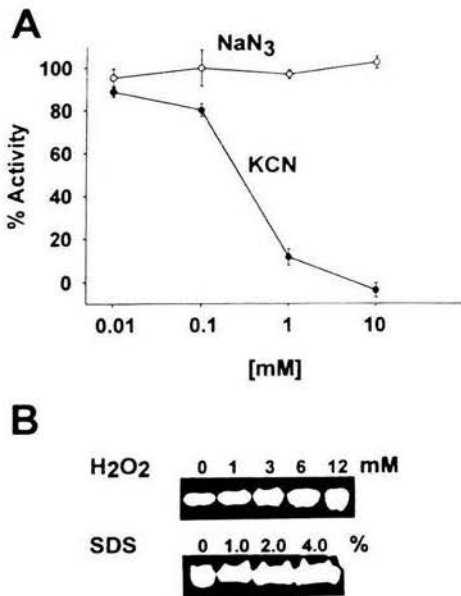


Fig. 3. Inhibition of *T. solium* Cu/Zn-SOD activity. The activity was determined: (A) in the absence and presence of increasing concentrations of KCN and NaN₃. (B) In the absence and presence of increasing concentrations of H₂O₂ and SDS.

determined by the xanthine-xanthine oxidase method, we used the epinephrine-SOD assay. It is known that epinephrine autoxidises to adrenochrome at pH >9.0 due to the presence of O₂⁻ produced in this reaction. It is also known that SOD inhibits this oxidation. Fig. 5 shows that bovine and *T. solium* Cu/Zn-SOD enzymes prevent oxidation of epinephrine. Nevertheless, increasing concentrations of thiabendazole (Fig. 5A) and albendazole (Fig. 5B) inhibit the *T. solium* Cu/Zn-SOD enzyme, preventing oxidation of epinephrine in a dose-dependent manner. In contrast, the higher concentration of thiabendazole (500 μM) did not affect the bovine Cu/Zn-SOD enzyme, since it inhibits the oxidation of epinephrine. Albendazole at 300 μM showed only moderate inhibition. On the other hand, anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD antibodies had no effect on the recombinant enzyme, since they did not inhibit the oxidation of epinephrine (data not shown). The results obtained with the epinephrine assays confirmed the data obtained by the xanthine-xanthine oxidase system for both anthelmintic drugs.

4. Discussion

We isolated a full-length cDNA clone encoding the *T. solium* Cu/Zn-SOD enzyme that presents the classical

motifs of this group of enzymes and a predictive monomeric M_r of 15,588, data that were confirmed by SDS-PAGE analysis. The native M_r of 37 kDa was determined by size exclusion chromatography, indicating that the enzyme has a dimeric structure; these data are consistent with other reports on Cu/Zn-SOD enzymes. It is worth mentioning that although *T. solium* Cu/Zn-SOD presents a high identity in its amino acid sequence with *S. mansoni* Cu/Zn-SOD, the identity with mammalian enzymes is higher than the helminth enzymes shown here. This result was unexpected due to the phylogenetic distance between these organisms. The purified recombinant SOD enzyme produced in *E. coli* showed an activity of 35.7 U/mg protein, whereas an activity of 2,941 U/mg protein was found when Cu²⁺ and Zn²⁺ ions were added during the induction process. These findings confirm that the presence of these metallic ions is essential for a recombinant functional enzyme. This result is comparable with those obtained in other recombinant helminth enzymes produced in the *E. coli* system and grown in the presence of these metallic ions (Hong et al.,

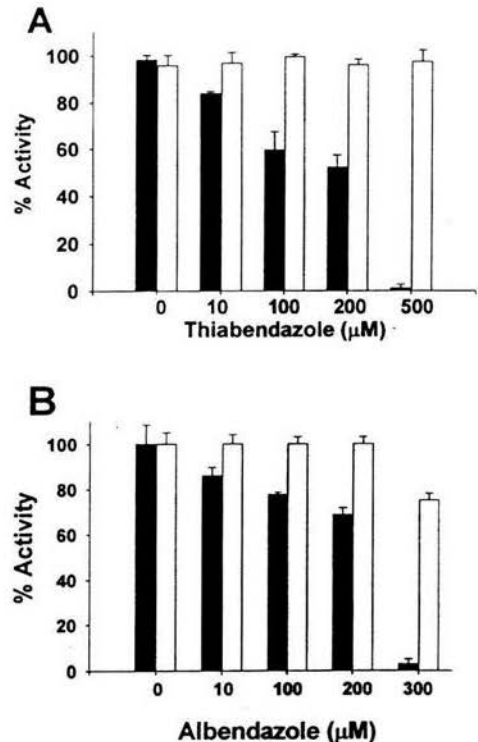


Fig. 4. Inhibition of *T. solium* Cu/Zn-SOD activity by benzimidazoles determined by xanthine-xanthine oxidase method. *Taenia solium* (black bars) and bovine Cu/Zn-SOD (white bars) were incubated in the absence and presence of: (A) thiabendazole; and (B) albendazole.

1992; Henkle-Dührsen et al., 1994). The activity of the recombinant enzyme was completely inhibited by KCN (10 mM), but no inhibition was observed with NaN_3 . Furthermore, enzymatic assays on PAGE showed that H_2O_2 at 12 mM and SDS up to 4%, have no effect on the recombinant enzyme. The resistance to SDS agrees with the finding in *O. volvulus* and bovine Cu/Zn-SOD enzymes, which do not lose activity at 2 or 4% SDS (Geller and Winge, 1983; Hallewell et al., 1989). Based on these sensitivities and the present results, it can be stated that the recombinant enzyme belongs to the group of cytosolic Cu/Zn-SOD enzymes.

It had been reported that serum or IgG antibodies against *Dictyocaulus viviparus* and *O. volvulus* SOD were capable of inhibiting the enzyme activity 40 and 80%, respectively (Britton et al., 1994; Henkle-Dührsen et al., 1994). Even though the antibodies against *T. solium* Cu/Zn-SOD recognise the recombinant enzyme, they did not affect the SOD activity. The result suggests that the antibodies were generated against regions that are not relevant to the catalytic function. Moreover, the cross-reaction of the anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD antibodies with *Taenia* genus, and its failure to recognise mammalian, trematode and nematode Cu/Zn-SOD enzymes, show that there are antigenic differences among Cu/Zn-SOD enzymes. Furthermore, Western blot analysis using anti-*T. solium* Cu/Zn-SOD antibodies revealed that the Cu/Zn-SOD enzyme is expressed in all stages of (oncosphere, larvae and adult) *T. solium*. The presence of the enzyme suggests that the parasite can dismutate O_2^- during its whole life cycle.

Anthelmintic drugs such as niclosamide, praziquantel and albendazole are currently used to treat *Taenia* carriers. The last two drugs, and especially albendazole, constitute an effective treatment for several forms of neurocysticercosis in humans and cysticercosis in pigs (Sotelo and Del Brutto, 2000; White, 2000). Albendazole and thiabendazole belong to the group of benzimidazoles and their mechanism of action is exerted by binding selectively to β -tubulin to inhibit microtubule formation (Köhler, 2001). However, some reports have shown that benzimidazoles can also inhibit enzymes such as fumarate reductase and SOD enzymes in helminths (Sánchez-Moreno et al., 1988, 1989, 1996). Following these reports, we found that thiabendazole at 500 μM and albendazole at 300 μM completely abolished the activity of the recombinant *T. solium* Cu/Zn-SOD. In contrast, both anthelmintic drugs have moderate or no effect on the bovine Cu/Zn-SOD activity at similar concentrations. Thiabendazole is metabolised in the liver to 5-hydroxythiabendazole and excreted by the urine. The maximum peak concentrations of thiabendazole and its metabolite in human plasma occur after 1 h at 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tocco et al., 1966). This concentration is close to the 100 μM tested, which inhibited 37% the *T. solium* Cu/Zn-SOD activity. On the other hand, albendazole in humans is completely metabolised to albendazole sulfoxide in the liver. The maximum peak concentrations in plasma occur after 2 h at 2.96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μM (Jung et

al., 1992), a concentration that is also close to the 10 μM used to inhibit 10% of enzyme activity. Unfortunately, the concentrations that these drugs reach in tissues are lower than in plasma (<http://face.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/thiabend.htm>; Saimot et al., 1983), and it is probable that they have no effect on Cu-Zn-SOD of larval lodged in tissues. However, these drugs reach high concentrations in the intestinal tract capable of inhibiting the SOD. We suggest that SOD inhibition could contribute to the efficacy

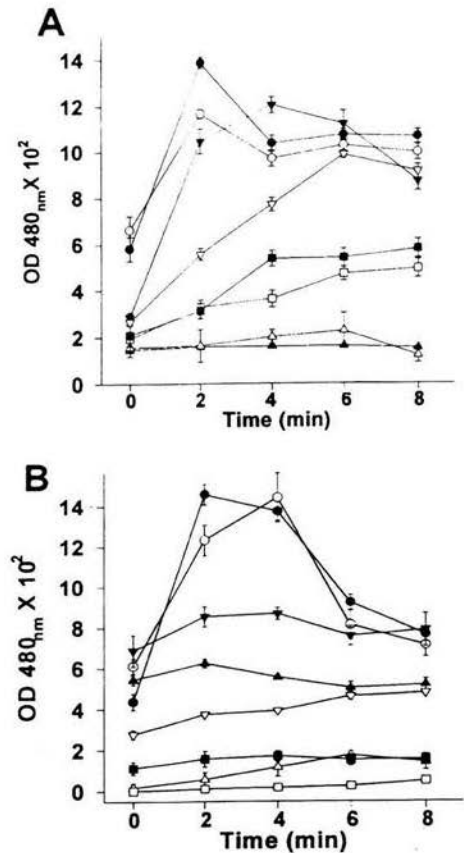


Fig. 5. Inhibition of *T. solium* Cu/Zn-SOD activity by benzimidazoles determined by epinephrine autoxidation assay. (A) Epinephrine (EP ●), EP + thiabendazole 500 μM (○), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD + thiabendazole 500 μM (▼), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD thiabendazole 200 μM (▽), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD TBZ 100 μM (■), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD thiabendazole 10 μM (□), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD (△), EP + bovine Cu/Zn-SOD + thiabendazole 500 μM (▲). (B) Epinephrine (EP ●), EP + albendazole 300 μM (○), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD + albendazole 300 μM (▼), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD albendazole 200 μM (▽), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD Albendazole 100 μM (■), EP + *T. solium* Cu/Zn-SOD (△), EP + bovine Cu/Zn-SOD + albendazole 300 μM (▲), EP + bovine Cu/Zn-SOD (□). All experiments were done in triplicate.

of these anthelmintic drugs against intestinal worms. Thiazobenzazole and albendazole inhibition findings are interesting, because they open the opportunity to explore the mechanism by which these helminth SOD enzymes are inhibited.

It has been reported that helminth resistance and persistence in the intestine are related to the levels of enzymes against reactive oxygen species (Nare et al., 1990; Batra et al., 1993). The SOD is a unique enzyme that protects organisms from oxidation-mediated damage due to the O_2^- . Inactivation of this enzyme may contribute to the host defense mechanisms by destroying the parasite. Finally, our inhibition assays with bovine and *T. solium* Cu/Zn-SOD showed that it could be possible to design a compound which can specifically inhibit the parasite enzyme. Structural and comparative inhibition studies between Cu/Zn-SOD enzymes from *T. solium* and its mammalian pig and human hosts should be carried out.

Acknowledgements

This study received financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (contracts 27556-M and 35333-M). CGA and LJ were supported by a scholarship from CONACyT and DGEP-UNAM, respectively. The authors declare that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

References

- Batra, S., Srivastava, J.K., Gupta, S., Katiyar, J.C., Srivastava, V.M.L., 1993. Role of reactive oxygen species in expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from rats. *Parasitology* 106, 185–92.
- Beauchamp, C.O., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improve assays and assays applicable to polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–87.
- Birnboim, H.C., Kanabus-Kaminka, M., 1985. The production of DNA strands breaks in human leukocytes by superoxide anion may involve a metabolic process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6820–4.
- Britton, C., Knox, D.P., Kennedy, M.W., 1994. Superoxide dismutase (SOD) activity of *Dictyocaulus viviparus* and its inhibition by antibody from infected and vaccinated bovine hosts. *Parasitology* 109, 255–61.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203–9.
- Geller, B.L., Winge, D.R., 1983. A method for distinguish Cu, Zn and Mn containing superoxide dismutases. *Anal. Biochem.* 128, 86–92.
- Hallewell, R.A., Laria, I., Tabrizi, A., Carlin, G., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Cousens, L.S., Mullenbach, G.T., 1989. Genetically engineering polymers of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 264, 5260–8.
- Henkle-Dürshen, K., Kampkötter, A., 2001. Antioxidant enzyme families in parasite nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 129–42.
- Henkle-Dürshen, K., Warnecke, C., Brattig, N., Liebau, E., Walter, R.D., 1994. Characterisation of enzymatically active *Onchocerca volvulus* Cu/Zn superoxide dismutase expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 41–47.
- Hong, Z., Loverde, P.T., Hammarskjöld, M.T., Rekosh, D., 1992. *Schistosoma mansoni*: cloning of a complementary DNA encoding a cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and high-yield expression of the enzymatically active gene product in *Escherichia coli*. *Exp. Parasitol.* 75, 308–22.
- Jiménez, L., Vibanco-Pérez, N., Navarro, L., Landa, A., 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* 30, 1007–12.
- Jung, H., Hurtado, M., Sánchez, M., Medina, M.T., Sotelo, J., 1992. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J. Clin. Pharmacol.* 32, 28–31.
- Kachadourian, R., Lochev, S.I., Cabelli, D.E., Patel, M.N., Fridovich, I., Day, B.J., 2001. 2-Methoxyestradiol does not inhibit superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 349–53.
- Kim, T.S., Jung, Y., Na, B.K., Kim, K.S., Chung, P.R., 2000. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* 68, 3941–8.
- Köhler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 336–45.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5.
- Lin, C.W., Yang, J.H., Su, L.C., 1997. The extraction and properties of superoxide dismutase from porcine blood. *Meat Sci.* 46, 303–12.
- Loverde, P.T., 1998. Do antioxidants play a role in *Schistosoma* host parasite interactions? *Parasitol. Today* 4, 284–9.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–55.
- Monroy-Ostria, A., Monroy-Ostria, T.J., Gómez, G., Hernández, M.O., 1993. Some studies on experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev. Lat. Microbiol.* 35, 91–98.
- Nare, B., Smith, J.M., Pritchard, R.K., 1990. *Schistosoma mansoni*: levels of antioxidant and resistance to oxidants increase during development. *Exp. Parasitol.* 70, 389–97.
- Saimot, A.G., Meulemans, A., Cremieux, A.C., Giovanangeli, M.D., Hay, J.M., Delaire, B., Couland, J.P., 1983. Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. *Lancet* 2, 652–6.
- Sánchez-Moreno, M., León, P., Salas-Peregrin, J.M., Osuna, A., 1988. Superoxide dismutase in trematodes. *Arzneimittelforschung* 37, 903–5.
- Sánchez-Moreno, M., García-Ruiz, A., García-Rejón, L., Valero, A., León, P., 1989. Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterisation and studies of inhibition by series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis. *Drug Res.* 39, 759–61.
- Sánchez-Moreno, M., Entrala, E., Jansen, D., Fernández-Becerra, C., Salas-Peregrin, J.M., Osuna, A., 1996. Inhibition of superoxide dismutase from *Ascaris suum* by benzimidazoles and synthesised pyrimidine and glycine derivatives. *Pharmacology* 52, 61–68.
- Sotelo, J., Del Brutto, O.H., 2000. Brain cysticercosis. *Arch. Med. Res.* 31, 3–14.
- Tocco, D.J., Roseblum, C., Martin, C.M., Robinson, H.J., 1966. Absorption, metabolism, and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9, 31–39.
- Towbin, H., Staehelen, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4.
- White Jr, A.C., 2000. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu. Rev. Med.* 51, 187–206.
- Willms, K., Merchant, M.T., Díaz, S., Arcos, L., 1982. Host-parasite interface in the metacystode of *Taenia solium*. In: Flisser, A., Willms, K., Laclotte, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (Eds.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, New York, pp. 397–411.
- Wink, D.A., Mitchell, J.B., 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 434–56.