



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

*“INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE
LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE Cu/Zn
RECOMBINANTE DE Taenia solium (TsSODCu/Zn)
POR EL COMPUESTO 4.”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:

ROBERTO FLORES LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA



Los Reyes Iztacala, Edo de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión del Dr. Abraham Landa Piedra, en colaboración con el Área de Biofísicoquímica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Esto fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por el proyecto CONACyTPN-594 (Producción de inhibidores enzimáticos contra tres enzimas esenciales de *Taenia solium*), y el proyecto DGAPAPAPIIT-IN215714-3 (Desarrollo de dos inhibidores enzimáticos contra *Taenia solium*). Además, Roberto Flores López recibió una beca de ayudante de investigador nivel III del SNI-CONACYT con número de folio 13632.

AGRADECIMIENTOS

Al equipo del Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*. En especial al Dr. Abraham Landa Piedra por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo. A los miembros del laboratorio: Dra. Alicia Ochoa por brindarme su toda paciencia desde el primer día en el laboratorio, a Dra. Lucia Jiménez y a la Dra. Vera Teresa Vega y a la M en C Narda Karina Castro por ayudarme inclusive en los más pequeños detalles que parecieran insignificantes.

Al equipo del Área de Biofisiología (UAM-I) dirigido por el Dr. Andrés Hernández Arana en especial al Dr. Ponciano García por brindarme su enseñanza y ayuda durante la elaboración de este trabajo, así como al Dr. Menandro Camarillo por los consejos y apoyo durante mi breve estancia en el laboratorio de Biofisiología.

DEDICATORIA

Sin duda esta es la parte más difícil, pero bueno; esto no sería posible sin el apoyo de mis padres, gracias por estar ahí, gracias madre por motivarme en todos los aspectos. A mi familia por haber pasado por momentos poco ortodoxos, me han demostrado que sin duda nada nos detiene.

Y así respiro, recuerdo a los que cuidan de mi espalda y me inspiro...

Gracias por compartir tantos momentos e inclusive este presente, les prometo compartir mejores tiempos. A mi viejo equipo del grupo 52 por hacer el tiempo siempre ameno, aprendí mucho de ustedes, les agradezco por haberme soportado. A mis viejos amigos de la cuadra por recordarme de dónde vengo. Espero reencontrarme una vez más con ustedes.

A mis padres y hermanos

INDICE

ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS.....	13
<i>CAPITULO 1</i>	14
MARCO TEÓRICO.....	14
1.1. Generalidades de los Céstodos.....	14
1.2. Morfología del parásito eucéstodo.....	14
1.3. Morfología y ciclo de vida de <i>T. solium</i>	17
1.4. Clasificación taxonómica para <i>T. solium</i>	17
1.5. Características clínicas de la NCC	21
1.5.1. NCC parenquimatosa	22
1.5.2. NCC Subaracnoidea.....	23
1.6. Diagnóstico.....	23
1.6.1. Neuroimagen.....	24
1.6.2. Métodos serológicos.....	25
1.6.3. Métodos coproparasitológicos.....	25
1.7. Tratamiento	26
1.7.1. Taeniasis.....	26
1.7.2. NCC.....	26
1.8. Especies reactivas de oxígeno.....	29
1.9. Mecanismos enzimáticos antioxidantes	31
1.10. Mecanismos no enzimáticos antioxidantes	34
1.11. SOD en helmintos.....	35
1.12. SODCu/Zn de <i>T. solium</i>	35
<i>CAPITULO 2</i>	38
ANTECEDENTES.....	38
<i>CAPITULO 3</i>	39
OBJETIVOS	39
<i>CAPITULO 4</i>	40

MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.1. Expresión y purificación de la <i>TsSODCuZn</i>	40
<i>CAPÍTULO 5</i>	44
RESULTADOS	44
5.1. Expresión y purificación de SODCu/Znr.....	44
5.3. Inhibición enzimática mediante el compuesto 4 sintetizado.....	48
5.4.	49
<i>CAPÍTULO 6</i>	51
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA.....	55
ANEXOS DE SOLUCIONES.....	64

ABREVIATURAS

SOD	Superóxido dismutasa
TsSODCu/Zn	Superóxido dismutasa Cu/Zn de <i>Taenia solium</i>
TsSODCu/Znr	Superóxido dismutasa Cu/Zn recombinante de <i>Taenia solium</i>
EC-SODCu/Zn	Superóxido dismutasa Cu/Zn extracelular
HsSODCu/Zn	Superóxido dismutasa Cu/Zn de <i>Homo sapiens</i>
PDB	Banco de datos de estructuras de proteínas (Protein Data Bank)
°C	Grados Celsius
C-4	Compuesto 4(C ₂₄ H ₃₃ N ₇ O ₄)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
T	Temperatura
Tris-HCl	Hidroximetil aminometano ácido clorhídrico
t	Tiempo
DEAE-Sepharose	2-dietilaminoetanol sefarosa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
LB	Medio Luria Bertani
Tris-HCl	Hidrocloreuro de tris (hidroximetil) aminometano
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
μM	Concentración micromolar
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Abs450nm	Absorbancia a una longitud de onda 450 de nanómetros
CuSO₄	Sulfato de cobre
ZnSO₄	Sulfato de cinc

KCN	Cianuro de potasio
NaN₃	Azida de sodio
DMSO	Dimetil sulfóxido
m/z	Relación masa carga
U/mg	Actividad enzimática específica (unidades por miligramo)
1U	µg de enzima que reduce el 50% la absorbancia del citocromo
CC	Cisticercosis
NCC	Neurocisticercosis
IgM	inmunoglobulina M
NK	Linfocitos Natural killers
SNC	Sistema Nervioso Central
TC	Tomografía computarizada
IRM	Imagenología de resonancia magnética
FCE	Fluido cerebroespinal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
ELIZA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EITB	Inmunolectrotransferencia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PyMOL	Visor molecular basado en Python

RESUMEN

La cisticercosis es una parasitosis de humanos y cerdos causada por la larva del cestodo de *Taenia solium*. Se ha demostrado bioquímicamente la presencia de varias enzimas que proporcionan protección contra las especies reactivas de oxígeno en cestodos incluyendo a la Superóxido dismutasa (SOD), una metaloenzima eficiente en contrarrestar el radical $O_2^{\cdot-}$ producido por células del sistema inmune y el metabolismo aerobio tanto del hospedero como del parásito, mediante la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 .

En este trabajo se llevó a cabo la expresión y purificación de la superóxido dismutasa de Cu/Zn recombinante del parásito *T. solium* (*TsSODCu/Znr*) mediante dos cromatografías de intercambio iónico a diferentes pHs (7.5 y 8.9). Por medio del análisis en gel de poliacrilamida con SDS, se determinó la pureza de la enzima, además de su peso molecular aproximado de 16kDa, y mediante ensayos de actividad con el método de la xantina-xantina oxidasa se obtuvo la actividad específica de 2777 U/mg. También se obtuvo una concentración de 1164 $\mu\text{g/mL}$ y un rendimiento de 5.8 mg a partir de un cultivo de 500 mL.

Se identificó el tipo de SOD mediante ensayos con inhibidores específicos (KCN y NaN_3), los cuales indicaron que la SOD es del tipo Cu/Zn. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de inhibición con el compuesto 4, el cual no fue capaz de inhibir la enzima. Sin embargo si se observó que disminuye la movilidad de los cisticercos lo cual conlleva a la sugerencia y posibilidad de realizar modificaciones para el mejoramiento del compuesto 4 para que pueda inhibir a la enzima y matar a los cisticercos.

INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una parasitosis de humanos y cerdos causada por la larva del cestodo *Taenia solium*. La infección se desarrolla en los seres humanos después de la ingestión de huevos producidos por el estadio adulto del parásito y que vienen en las heces de un portador del estadio adulto (contaminación fecal-oral) (Kimura., 2010; Del Brutto., 2005; Saavedra., 2010). La infección puede afectar cualquier órgano y tejido, pero los más comprometidos son el sistema nervioso central (parénquima, espacios subaracnoideos, ventrículos y la médula espinal), los ojos, corazón y los músculos (Estrada., 2013). La cisticercosis se presenta en prácticamente todos los países en vías de desarrollo (Latinoamérica, Asia y África) con excepción de los países musulmanes, que no consumen cerdo. Sin embargo, en los últimos años la incidencia de esta infección ha aumentado en los países desarrollados debido a la inmigración proveniente de las áreas endémicas (Del Brutto., 2005; Saavedra., 2010). En la actualidad hay muchas enfermedades parasitarias sin un tratamiento efectivo, por lo tanto, es imperativo encontrar nuevos blancos y desarrollar nuevos fármacos para contrarrestarlas o desarrollar una buena infraestructura en cuanto a los centros de salud (Sanabria., 2013).

Se ha demostrado bioquímicamente la presencia de varios enzimas que proporcionan protección contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) en cestodos incluyendo a la Superóxido dismutasa (SOD). Se han reportado tres tipos de SOD de acuerdo al cofactor que utilizan en la catálisis enzimática: mitocondrial SODMn, citológica SODCu/Zn y extracelular SODCu/Zn. Entre las isoformas de las SODs, las SODsCu/Zn son las más eficientes en contrarrestar al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Wipaphorn *et al.*, 2016). La enzima participa en la homeostasis de óxido-reducción y está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular al proporcionar una eficaz protección contra el $O_2^{\cdot-}$ producido por las células inmunes, y del metabolismo aerobio tanto del hospedero como del parásito mediante la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este último es catalizado a H_2O por la Catalasa y Glutatión peroxidasa, y de este modo logra contrarrestar los daños causados por el $O_2^{\cdot-}$ (Castellanos *et al.*, 2002). Debido a lo anterior se ha propuesto a la SODCu/Zn como un blanco para la elaboración de

Introducción

drogas para inhibir su actividad, utilizando ensayos de inhibición enzimática. El disponer de una SODCu/Zn recombinante de *T. solium* (*TsSODCu/Znr*) pura es de gran importancia para el estudio de su dinámica en su relación huésped-parásito en sus diferentes etapas del ciclo biológico, y poder combatirlo de manera eficaz.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la (NCC) y la teniasis siguen siendo un problema de salud así como económico en los países en vías de desarrollo, además solo se dispone del albendazol y el prazicuantel como fármacos para tratar a este parásito en donde la dosis de ingestión de estos fármacos tiende a ser muy cuidadosa respecto al estado de salud del hospedero entre otros factores, sin embargo puesto que *Taenia solium* y otros helmintos han presentado resistencia frente a estos fármacos antihelmínticos y síntomas secundarios en pacientes que han ingerido estos fármacos, así como a la insuficiente infraestructura en higiene en las zonas rurales del país, es de suma importancia buscar alternativas para combatir al parásito *T. solium* tanto en su estado larvario como en su forma adulta, puesto que las dosis y el tipo de fármaco para tratar la parasitosis varían ampliamente dependiendo de varios factores como lo son su estadio y localización en el hospedero.

La búsqueda de moléculas que alteren la homeostasis redox de *T. solium* mediante la inhibición de enzimas en especial de *TsSODCu/Znr* ayudará a combatir al parásito tanto en su forma larvaria como adulta.

HIPÓTESIS

Al incubar a la Superóxido dismutasa de Cu/Zn recombinante de *Taenia solium* con el compuesto 4 sintetizado, su actividad enzimática será inhibida. Esta inhibición podrá conducir a la muerte del parásito.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades de los Céstodos

Es una clase de endoparásitos que en la mayoría de los casos la tienen como hospedero intermediario a organismos vertebrados. El cuerpo de los cestodos adultos es plano y con aspecto de cinta y presentan un estadio larvario. Los céstodos son divididos en dos subclases:

Cestodaria los cuales carecen de escólex y proglótidos por lo que incluye formas con el cuerpo liso, algunos presentan ventosas de fijación en la parte anterior, su larva suele presentar diez ganchos. Por otro lado, la subclase de los eucéstodos cuya larva presenta seis ganchos (Buchsbaum y Lorus., 1961), que a comparación de los cestodarios todos los parásitos en estado adulto se identifican por la presencia de un escólex, cuello y estróbilo (Brusca y Brusca., 2003), como se puede observar en la figura 1.

1.2. Morfología del parásito eucéstodo

El parásito adulto consta de un escólex, con órganos de fijación, los cuales pueden ser ventosas o una corona de ganchos (llamados también uncinos) que conforman al róstelo, excepto para *Diphyllobothrium*, que posee un par de largos surcos musculares laterales y carece de ganchos (Scholz *et al.*, 2009). A continuación del escólex, por debajo presenta una zona proliferativa, llamada cuello que no presenta segmentación y es la región dotada de células neoblasto, donde se van originando los nuevos segmentos llamados proglótidos que constituyen el cuerpo o estróbilo, formado por un número variable de estos segmentos. Conforme se desarrollan los nuevos proglótidos, los más antiguos van haciéndose más distales y maduros conocidos como proglótidos maduros aquellos que se encuentran en la parte media del estróbilo con su sistema reproductivo listo para la fecundación, ya que es a partir

de esta posición en la cual se presentan tanto los órganos masculinos y femeninos. Los proglótidos grávidos son aquellos que se encuentran en la parte más distal del cuerpo, los cuales contienen a los huevos fecundados (Ruppert y Barnes., 1996). En los primeros proglótidos próximos al escólex son inmaduros ya que no se han desarrollado los órganos reproductivos; y es aproximadamente en la zona media del estrobilo donde se encuentran los proglótidos maduros por donde comienza a aparecer el primer proglótido con únicamente órganos masculinos; luego en los proglótidos sucesivos, aproximándose a la zona posterior, los órganos femeninos empiezan a manifestarse desarrollados (Marshall., 1985). La fecundación se produce entre anillos adyacentes produciendo huevos que no son operculados y que contienen un embrión hexacanto (oncosfera con seis ganchos).

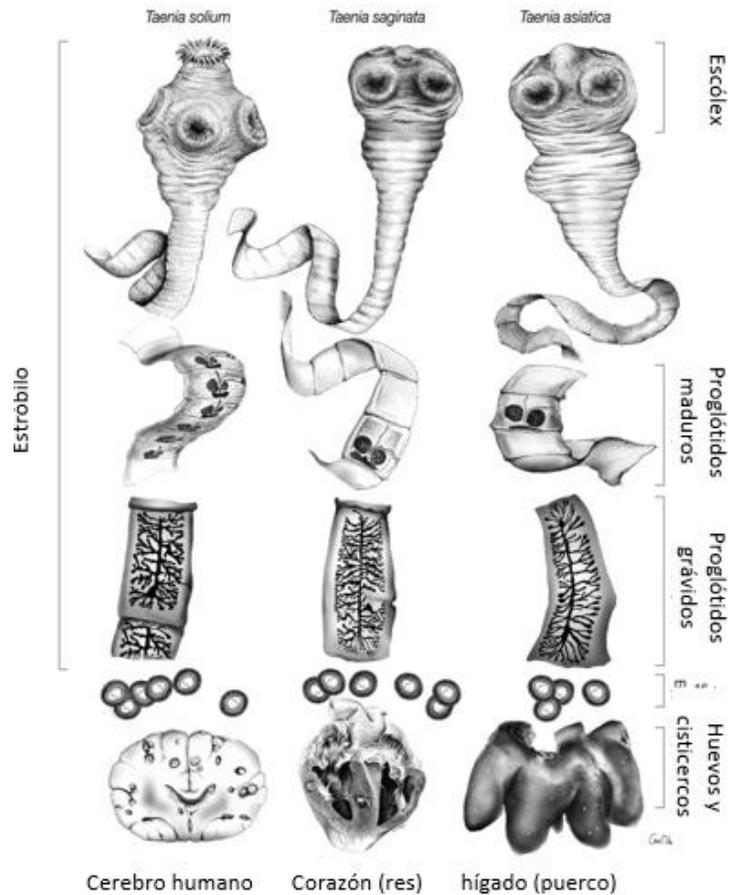


Figura. 1, Tres Tenías que parasitan al humano. Se muestran las características morfológicas (Flisser *et al.*, 2004).

Los cestodos carecen de tracto digestivo, por lo que absorben su alimento directamente desde el intestino del huésped a través de la pared blanda del gusano (Murray., 2009).

En estos organismos, la epidermis está remplazada por un tegumento que es un sincicio formado por las extensiones citoplasmáticas de células del parénquima. En la base del tegumento se encuentra una membrana basal que lo delimita del parénquima celular. La superficie externa del tegumento presenta proyecciones citoplasmáticas llamadas microtrícas que son un aumento en la superficie celular que hacen eficiente la obtención de nutrientes mediante ósmosis y pinocitosis (Smyth y Mc Manus., 1989). El parénquima puede variar de células mesenquimatosas empacadas densamente hasta redes sincitiales y fibrosas con espacios llenos de fluidos (Brusca y Brusca, 2003).

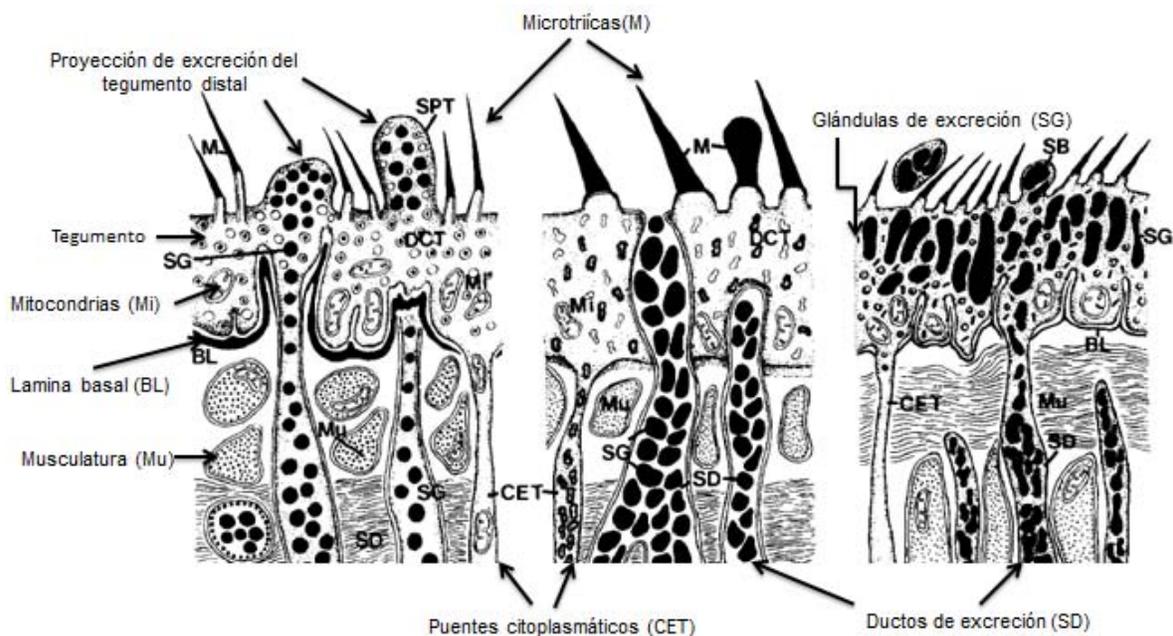


Figura. 2. Sección vertical de la pared de tres cestodos (*Eubothrium* y *Diphyllobothrium*, y un cestodo de la familia Caryophyllidae) mostrando características de la estructura interna (Tomado de Kuperman y Davydov., 1981).

1.3. Morfología y ciclo de vida de *T. solium*

Taenia solium pertenece a la clase Cestoda, uno de los grupos más grandes de las tenias parásitas, que comprende aproximadamente 5000 especies. La familia *Taeniidae* se divide en tres géneros: *Versteria* y *Taenia* (Nakao *et al.*, 2013) al cual pertenece la especie *T. solium.*, y el género *Echinococcus* (Bobes *et al.*, 2014). Desde el punto de vista de la biología del desarrollo, éstos habían sido agrupados como Spiralia, debido a que muestran una segmentación de tipo espiral durante su desarrollo biológico, por lo cual presentan una simetría bilateral.

El ciclo de vida de *T. solium* (figura 4) es complejo y puede resultar en una amplia gama de patologías, que afectan a cerdos y seres humanos. Los seres humanos son los únicos hospedadores definitivos del adulto, en donde el parásito puede completar su ciclo de vida causando la teniasis, sin embargo, los seres humanos y cerdos han sido documentados como hospederos intermediarios, que pueden desarrollar los huevos de la solitaria hasta la etapa larvaria o metacéstodo (Coral *et al.*, 2015), causando la cisticercosis. La infección se desarrolla en los seres humanos después de la ingestión de huevos procedentes de las heces de un portador del estadio adulto (Ito *et al.*, 2002).

1.4. Clasificación taxonómica para *T. solium* (Según Pechenick., 2000):

Phyllum: Platyhelminthes.

Clase: Cestoda.

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea.

Familia: Taeniidae.

Género: *Taenia.*

Especie: *solium*

La infección puede afectar cualquier órgano o tejido, pero los más comprometidos son el sistema nervioso central (parénquima, espacios subaracnoideos, ventrículos y la médula espinal), dando lugar a la neurocisticercosis (NCC), además los ojos y los músculos también suelen ser lugares de alojamiento para el parásito (Estrada., 2013). La NCC humana y porcina se debe principalmente al contacto directo con las heces humanas. Los seres humanos la contraen comúnmente a través de la ingestión de alimentos o agua contaminada con huevos. Los huevos provienen de una tenia adulta que ha alcanzado la madurez en el intestino de un huésped humano, donde los huevos son expulsados junto con las heces al medio ambiente; una tenia adulta puede expulsar hasta 100,000 huevos por día. Los huevos están provistos de envolturas que protegen a la larva; una de ellas, el embrióforo (ver figura 3), que constituye la principal capa protectora de los embriones para sobrevivir en el medio. El embrióforo, formado por bloques de una proteína similar a la queratina, se caracteriza por una serie de propiedades contrastantes. Por un lado, es impermeable y muy resistente, lo que posibilita la supervivencia en un ambiente desfavorable; por otro, los bloques proteicos están unidos entre sí por una sustancia cementante sensible a la digestión enzimática (Flisser *et al.*, 2006).

Estudios serológicos en áreas endémicas han demostrado que los huevos pueden distribuirse en el medio ambiente a grandes distancias desde el individuo infectado (Lescano *et al.*, 2009). También se ha sugerido que los seres humanos pueden ser capaces de autoinfectarse (Kobayashi *et al.*, 2013).

En el tracto intestinal del hospedero, los huevos llegan a liberar a las larvas sin recubrimiento, conocidas como oncosferas dotadas de una corona con tres pares de ganchos. Estas penetran la pared intestinal y son transportadas en el torrente sanguíneo a varios tejidos del cuerpo, incluyendo el cerebro, ojos, piel y músculos, donde son depositadas (Del Brutto., 2012). Dentro de estos tejidos, las oncosferas se convierten en metacéstodos (cisticerco), que llegan a sufrir varias etapas de desarrollo hasta llegar a un cisticerco calcificado no viable. El cisticerco, como se observa en la figura 3, es una vesícula translúcida de 5 a 20 mm de diámetro llena de líquido, contiene un escólex invaginado similar al del gusano

adulto (Delpy *et al.*, 2005). Esta larva puede vivir así durante varios años antes de degenerar y calcificarse.

La primera etapa es conocida como la “etapa vesicular” o “viable” en el que se desarrolla una membrana alrededor de cada oncosfera, formando una vesícula que contiene un líquido transparente que rodea al escólex del parásito. Según el entorno y la naturaleza de la respuesta inmune que pueda provocar, los quistes pueden permanecer en esta etapa durante meses o incluso años, antes de que empiecen a degenerar. La “etapa coloidal” marca esta transición, por la cual el escólex muestra signos de deterioro y el líquido vesicular comienza a aparecer turbio, gradualmente el líquido vesicular llega a ser más opaco y el quiste comienza a calcificarse, finalmente terminando su metamorfosis como nódulo calcificado no viable (Coral *et al.*, 2015).

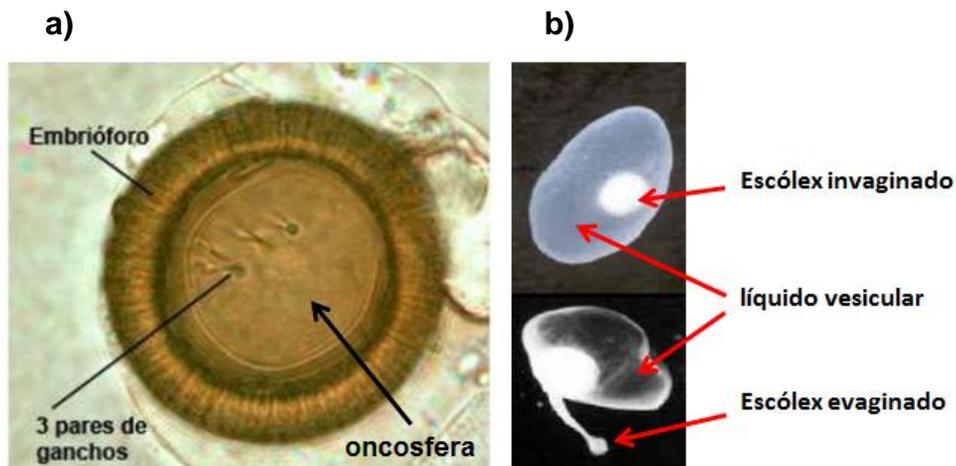


Figura 3. Observación de 2 estadios de *T. solium*. A) Huevo que contiene un embrión hexacanto cubierto por el embrióforo. **B).** Observación de un cisticerco viable donde se observa el escólex evaginado e invaginado. El cisticerco mide unos 5- 10 mm de longitud, están formados por un compartimiento interno, que engloba al escólex y el canal espiral y uno externo, que contiene el líquido vesicular (0.5 ml) y una cubierta externa. Se aprecian como vesículas blanco-amarillentas, de forma ovalada, con el escólex visible en su interior, con apariencia de un pequeño gránulo blanquecino (Tomado de <http://fundacionio.org/viajar/enfermedades/taenia%20solium.html>).

El ciclo de vida se completa cuando los humanos ingieren carne de cerdo mal cocida que contiene cisticercos viables. Las enzimas digestivas en el intestino causan la activación del cisticerco, el cual evagina su pequeño escólex de su vesícula para fijarse a la pared del intestino mediante una doble corona de aproximadamente 28 ganchos curvados y puntiagudos (de 11 a 14 ganchos por hilera) y 4 ventosas. El róstelo es protráctil, variando la posición de los ganchos. Cuando el róstelo está completamente contraído, las puntas de los ganchos están dirigidos hacia adelante, pudiendo incluso contraerse en el centro; cuando el róstelo está en extensión, los ganchos giran hasta que sus ápices quedan dirigidos hacia atrás, como un mecanismo para poder fijarse al tejido (Marshall., 1985). Aquí, la solitaria madura a la edad adulta en 6 o 7 meses o inclusive de 2 a 4 meses (Delpy *et al.*, 2005; Marshall., 1985), momento en el que las secciones que contiene los huevos en el cuerpo, llamados “proglótidos grávidos”, son liberadas en las heces del hospedador (Del Brutto., 2012). Los primeros huevos completos se encuentran en el útero de los proglótidos maduros. Esta parte del ciclo de vida representa la teniasis (Marshall., 1985).

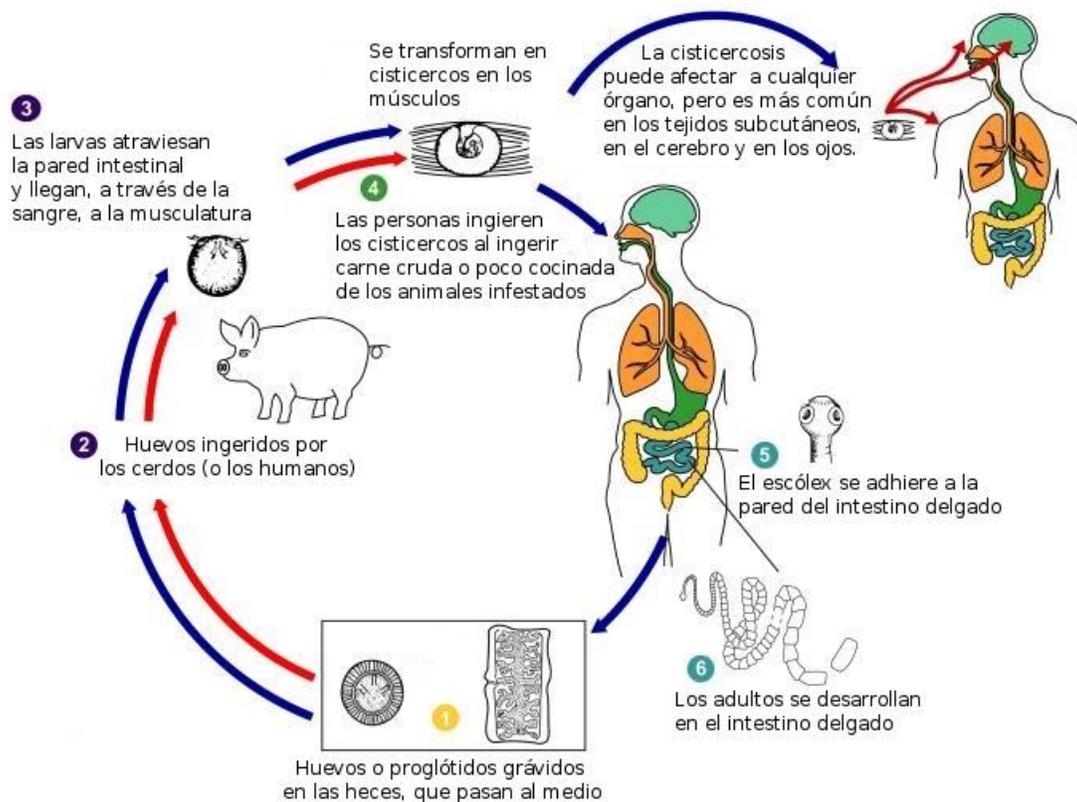


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. En su estadio adulto la tenia habita el intestino humano, causando la teniasis. La tenia produce miles de huevos, que se expulsan en la materia fecal. El cerdo se infecta al ingerir heces con proglótidos gravados o huevos del parásito adulto. Cada huevo puede convertirse en un cisticerco, ocasionando la cisticercosis porcina. El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo insuficientemente cocida infectada con cisticercos. Estos últimos se fijan en las paredes del intestino humano donde maduran hasta convertirse en gusanos adultos (Tomado de <http://animalandia.educa.madrid.org/ficha.php?id=88>).

1.5. Características clínicas de la NCC

Los mecanismos patogénicos de la NCC varían de acuerdo a la localización y número de los parásitos, estadios, su volumen de localización (intraparenquimatosa o extraparenquimatosa) así como el grado de respuesta inflamatoria del huésped, además la presentación clínica suele ser no específica (Del Brutto., 2002; Fleury *et al.*, 2016). Las características de los hallazgos dependen en gran medida del estado de la degeneración de los cisticercos. El cisticerco viable es un estadio vesicular el cual presenta una pared translúcida, donde la reacción inflamatoria es escasa, y se

pueden encontrar linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Este estadio puede causar una infección asintomática mediante la evasión y supresión de la respuesta inmune en el hospedero (Álvarez *et al.*, 2008; Fleury *et al.*, 2016), lo que le permite al parásito poder sobrevivir y no ser detectado en el cuerpo. Esto puede persistir durante un período prolongado de tiempo, con síntomas ligeros mediados por el parásito en este estadio puede vivir hasta por más de 10 años (Kimura *et al.*, 2010; Yanagida *et al.*, 2010).

El estadio coloidal del parásito en degeneración presenta una pared vesicular gruesa, y un fluido turbio (degeneración hialina); en este caso, la inflamación predomina con una respuesta de células (NK), macrófagos y células T, con formación de anticuerpos IgM, además se ha visto la respuesta inflamatoria Th1. En el caso posterior de degeneración granular, con escólex destruido, la mayor parte de la respuesta depende de las células plasmáticas, células B, linfocitos T, macrófagos y células cebadas. Las citocinas de tipo Th1 prevalecen sobre las de Th2. En el último estadio llamado cisticerco, se ha observado un nódulo calcificado y una proliferación de la microglia (Fleury *et al.*, 2016).

Finalmente, la localización y número son determinantes clave de la presentación clínica, con grupos de síntomas que muestran patrones de asociación con las zonas afectadas del (CNS). En general, la ubicación de quiste se clasifica ampliamente tanto como parénquima, dentro de tejidos funcionales del cerebro, o extra parenquimatosa, que comprende las ubicaciones restantes dentro del CNS (García *et al.*, 2002), como lo son el espacio subaracnoideo e intraventriculares (Jing *et al.*, 2015). De esta forma se pueden observar dos tipos de NCC de manera general: parenquimatosa y extra parenquimatosa.

1.5.1. NCC parenquimatosa

En la NCC el parénquima cerebral es más comúnmente infectado (Bansal *et al.*, 2014) con altas tasas de depósito de cisticercos en los sitios terminales de los vasos sanguíneos del parénquima. La NCC parenquimatosa generalmente tiene un pronóstico más favorable que la de tipo extra parenquimatosa, que presenta convulsiones y dolores de cabeza, las cuales tienden a ser resueltas de forma

independiente con el tiempo, siendo las manifestaciones más consistentemente reportadas (Singhi y Suthar., 2015). Los síntomas psiquiátricos se han divulgado en la ocasión, sin embargo, la mayoría de estudios han encontrado esto como una ocurrencia rara, que se presenta en aproximadamente el 5% de los casos de NCC (Carabin *et al.*, 2011). El enlace entre la NCC y la epilepsia es una relación causal en la mayoría de los estudios. Definiciones sobre lo que distinguen las convulsiones a las de la epilepsia deben establecerse más claramente; por definición 'epilepsia' es la aparición de convulsiones recurrentes y no provocadas, por lo tanto, convulsiones relacionadas con cisticercos sería clasificadas como convulsiones sintomáticas agudas, que no son sinónimas de epilepsia (Carpio y Romo, 2014)

1.5.2. NCC Subaracnoidea

En la NCC extraparenquimatosa como en el caso de la subaracnoidea, el parásito alcanza por vía hematógena las cisternas basales, espacios subaracnoideos y meninges, desencadenando una intensa reacción inflamatoria perilesional. Esta reacción inflamatoria puede afectar las leptomeninges en la base del cráneo, produciendo una leptomeningitis basilar que engloba nervios y arterias craneales (Sarria *et al.*, 2013).

1.6. Diagnóstico

El diagnóstico exacto de la NCC es notoriamente difícil; los métodos disponibles son problemáticos y la aplicación en las zonas endémicas por los recursos es desigual. Del Brutto *et al.* (2001) propone un conjunto de criterios de diagnóstico en un intento de combinar aspectos de historia clínica, neuroimagen y pruebas inmunológicas, así como factores epidemiológicos, para formar pautas definidas para el diagnóstico de NCC. Este enfoque multifacético permite un diagnóstico en la ausencia de criterios que puede ser inestable en ciertas situaciones.

Utilizando la evidencia disponible, un diagnóstico positivo puede considerarse como “definitivo” o “probable” basado en el peso atribuido a los criterios que se han cumplido. Si bien no de forma sistemática validado, este

enfoque permite de otra manera inalcanzables diagnósticos en situaciones difíciles, con una tasa razonable de éxito (Fogang *et al.*, 2012).

Los métodos más utilizados para la diagnosis de la NCC son la neuroimagen, métodos serológicos, así como microscopia de heces.

1.6.1. Neuroimagen

La Neuroimagen es el método preferido para el diagnóstico de NCC, usando la tomografía computarizada (TC) y las exploraciones de imagenología de resonancia magnética (IRM) es posible visualizar a los cisticercos y evaluar su número y la ubicación dentro del CNS. Con experiencia, se puede definir el estado del cisticerco: los viables aparecen como pequeñas áreas redondas que se distinguen fácilmente en el parénquima del cerebro, con el escólex que aparece como un nódulo de alta densidad dentro del cisticerco; la degeneración de los cisticercos es mucho menos definidos y tienden a ser rodeados por un área de edema perilesional (Del Brutto., 2012). Un típico patrón indicativo observado en la NCC es la aparición del llamado “cielo estrellado” formado por la presencia de múltiples cisticercos en diferentes etapas (Singhi y Suthar., 2015). El diagnóstico por TC muestra una mayor sensibilidad para la detección de calcificaciones que ocurren en aproximadamente el 50% de los pacientes (Sinha y Sharma., 2009). La resolución más alta de las exploraciones de IRM, permiten mejor distinción de la fase degenerativa de los cisticercos y puede detectar parásitos en sitios que no pueden ser percibidos por un escaneo de TC, por ejemplo, aquellos que se encuentran situados en la fosa posterior, cisternas basales y ventrículos (Takayanagui y Odashima., 2006). Hay problemas con la sensibilidad, especialmente para las formas intraventriculares y subaracnoideas, donde el líquido del quiste y el fluido cerebroespinal (FCE, o líquido cefalorraquídeo LCR) tienen densidades similares en los contrastes que la visualización es improbable, aun cuando se estén usando exploraciones con el uso de contrastes mejorados mediante el escaneo de la IRM (Kimura *et al.*, 2010; Singhi y Suthar., 2015).

1.6.2. Métodos serológicos

La neuroimagen es costosa y requiere tanto personal capacitado como recursos tecnológicos que no están disponibles del todo en la mayoría de los países de bajos ingresos en los que la NCC es endémica, por lo que hay mayor dependencia del uso de pruebas serológicas para la detección de NCC. Las principales pruebas serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunoelectrotransferencia (EITB) o Western blot, que detectan anticuerpos en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (Pinilla *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, el ensayo de inmunoelectrotransferencia (EITB), que utiliza antígenos glicoproteínas dirigidos para detectar anticuerpos contra *T. solium* en suero de pacientes, ha proporcionado los resultados más consistentes (Fogang *et al.*, 2015; Ito., 2015). Esta prueba diagnóstica tiene una especificidad reportada del 100%, con una sensibilidad general de 98% (García y Del Brutto., 2005); estas tasas disminuyen significativamente en los casos en los que sólo existe un solo cisticerco, ya que la baja carga parasitaria provoca una respuesta de anticuerpos mucho más débil, y la sensibilidad llega a bajar hasta el 50% (Fogang *et al.*, 2015; Ito., 2015). Los anticuerpos pueden persistir en el suero durante largos períodos después de que el parásito se ha eliminado del cuerpo y pueden ser estimulada por una siguiente exposición al parásito en la ausencia de una infección establecida (Gilman *et al.*, 2012). Además, la presencia de anticuerpos en el suero no informa sobre la ubicación de un quiste; ya que los resultados positivos para la infección del cisticerco no son sinónimo de la implicación con el CNS (Fogang *et al.*, 2015; Ito., 2015).

1.6.3. Métodos coproparasitológicos

Métodos tradicionales tales como la microscopía se han utilizado para evaluar visualmente la presencia de huevos de *T. solium* en las heces de un portador potencial. Mientras que esto no necesariamente indica una infección de la NCC, ayuda en la detección de portadores de la solitaria y la consiguiente interrupción del

ciclo de transmisión. Mientras que este método puede tener alta especificidad dependiendo de la experiencia del examinador, tiene muy baja sensibilidad debido a la necesidad de una cierta cantidad de huevos para poder ser visibles bajo el microscopio (Gilman *et al.*, 2012). Métodos moleculares aplicados a muestras de heces, tales como PCR y ELISA, puede mejorar las tasas de detección, pero como tantas otras pruebas disponibles, el equipo y la necesidad de los operadores entrenados es impráctico en muchos lugares endémicos (Mahanty y García., 2010).

1.7. Tratamiento

1.7.1. Taeniasis

En taeniasis el tratamiento adecuado de los hospederos de cestodos es crucial para interrumpir la transmisión de cisticercosis. La taeniasis puede ser combatida con una dosis única de niclosamida (2 g) o praziquantel (5 mg/kg). La niclosamida es el medicamento de elección porque no es absorbido en el intestino, evitando así el riesgo de desarrollar síntomas neurológicos si el paciente además tiene NCC. El tratamiento con niclosamida o praziquantel es supuestamente efectivo en un 95% o más (García y Del Brutto., 2005). Desafortunadamente la niclosamida ya no se produce.

1.7.2. NCC

La heterogeneidad de las presentaciones clínicas de la NCC y el procedimiento de diagnóstico no sólo es complicada, sino que también afecta el plan de manejo de la enfermedad; no puede haber ningún enfoque terapéutico único y estándar cuando deben considerarse muchos factores interconectados. Antes de comenzar el tratamiento, se debe determinar el perfil de la enfermedad completa, incluyendo pruebas de la implicación del CNS, caracterización de la respuesta inmune existente, y el número, localización y viabilidad de quistes que presentan los pacientes. Una vez que estos factores han sido comprobados se puede determinar un plan de tratamiento que se adapte a la persona (Lucy y Susan., 2017).

Albendazol (ALB)

El albendazol es una droga del grupo de los benzanidazoles los cuales presentan una rápida absorción después de su ingestión y es rápidamente convertido a su forma activa el albendazol sulfóxido el cual es efectivo contra varias especies de cestodos y nematodos que infectan a los humanos (Horton., 2000), ya que impide la inhibición de la polimerización de la β -tubulina interrumpiendo la formación de los microtúbulos e inhibiendo la captura de la glucosa, haciendo de este modo que los niveles de energía intracelulares sean inadecuados e impidiendo la supervivencia del parásito mediante la inmovilización, llegando a la muerte debido a la insuficiencia de la producción de energía (Horton., 2000; Palomares *et al.*, 2006).

Los esquemas de tratamiento han tenido un desarrollo empírico y, en su mayoría, consideran un ciclo de 15 mg/kg/día por 7-28 días (Kalra *et al.*, 2003.), que han mostrado similar efectividad, independientemente de su duración (Pérez *et al.*, 2003). En algunas formas, en especial en los quistes subaracnoideos gigantes (>5 cm de diámetro), se han repetido hasta cuatro ciclos (Proaño *et al.*, 2001).

Prazicuantel (PZQ)

Generalmente permanece por 4 horas, aproximadamente, en el plasma, y es representado principalmente por prazicuantel hidroxilatado, con el 4-hidroxiciclohecil-carbinol como el principal metabolito. El prazicuantel causa contracción muscular y daño en el tegumento alterando la redistribución de los iones de Ca^{2+} en los tejidos del parásito (Fraga *et al.*, 2012).

La mayoría de los estudios que han empleado PZQ han usado esquemas de tratamiento de dos semanas con dosis entre 50 a 75 mg/kg, con similar efectividad y seguridad (Nash., 2003; Garg., 2001; Pérez *et al.*, 2003.) En los últimos años se han publicado (quistes celulosos hemisféricos), con aparente eficacia, de un día de tratamiento con dosis total de 75 mg/kg dividida en tres dosis 25 mg/kg, asociando cimetidina y dieta hiperproteica para aumentar la absorción y el nivel plasmático del cestocida. El PZQ es, por lo general, bien tolerado y sus efectos adversos incluyen cefalea y molestias digestivas.

Los efectos adversos de la ingesta de estos compuestos son escasos. Sin embargo, tanto PZQ como ALB, al provocar degeneración y muerte del parásito, generan una reacción inflamatoria local, la que alcanza su mayor expresión entre el quinto y séptimo día de tratamiento. Dependiendo del efecto sumatorio de encefalitis focales y reacciones meningíticas, esto puede llegar a determinar hipertensión endocraneana, en magnitudes muy diversas, incluyendo eventuales formas graves y fatales (Nogales *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que en el caso de *Taenia crassiceps*, los cestodos pueden utilizar otras vías alternas para la producción y utilización de energía cuando la absorción de glucosa es interrumpida mediante la administración tanto de albendazol como del prazicuantel (Fraga *et al.*, 2012), como mecanismo de resistencia.

De esta manera los helmintos han empezado a desarrollar resistencia a estos antihelmínticos, aunque por otro lado la niclosamida ha sido muy eficaz, desafortunadamente ya no se encuentra a la venta, lo que ha generado la necesidad del desarrollo de nuevas moléculas con potencial farmacéutico para su posible uso (García y Del Brutto., 2005; Sanabria., 2013)

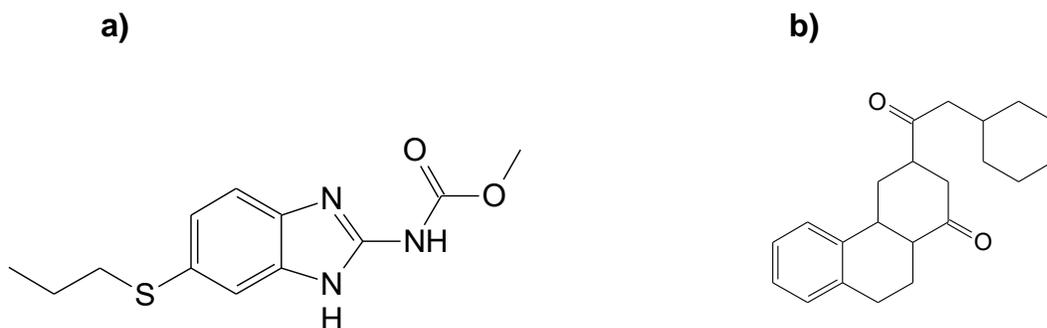


Figura 5. Estructura química de **a).** Albendazol, metil-5-(propiltio)-2-bencimidazol carbamato. **b).** Prazicuantel, 4H pirazin (2,1 – a) Isoquinolin – 4 – 1,2 (ciclohexilcarbonil) - 1, 2, 3, 6, 7,11 b – hexahidro (García Gutiérrez *et al.*, 2011).

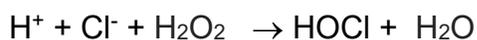
1.8. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son formadas y degradadas por todos los organismos aerobios, también son requeridas para el funcionamiento normal de la célula, por lo que las concentraciones fisiológicas deben ser reguladas, ya que pueden entrar en un estado de estrés oxidativo cuando las cantidades de las ERO son excesivas, esta producción excesiva de ERO y sus intermediarios pueden perjudicar la integridad de varias moléculas como proteínas, lípidos y ADN (Stadtman y Levine., 2000).

Las ERO incluyen un gran número de moléculas químicamente muy reactivas, como el radical hidroxilo, mientras que otros son menos inestables como el superóxido y el peróxido de hidrógeno. Los radicales libres con un electrón desapareado pueden formar fácilmente ERO (Arner y Nordberg., 2001).

La formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se realiza por la adición de un electrón al oxígeno molecular. Esta formación tiene lugar en las proximidades del interior de la membrana mitocondrial en la cadena respiratoria (Martin., 2010); además el superóxido es producido también por las flavoenzimas (Nicholas., 2010). Para contrarrestar la producción excesiva de superóxido, dos moléculas de superóxido son dismutadas rápidamente a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular donde la reacción es acelerada por la superóxido dismutasa (SOD) (Lehninger., 2004).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es considerado radical libre con gran poder oxidante, sin embargo, es de gran importancia debido a su habilidad para penetrar membranas biológicas (Murphy., 2009). Éste tiene un rol importante en la formación de más ERO incluyendo al ácido hipocloroso (HOCl) por la acción de la mieloperoxidasa, una enzima presente en los fagosomas de neutrófilos (Winterbourn *et al.*, 2000), además también puede formar al anión hidroxilo ($\cdot OH$) vía oxidación de metales de transición (Arner y Nordberg., 2001).



Una vez producido el H₂O₂ por el mecanismo de la SOD, este es removido por al menos tres sistemas enzimáticos antioxidantes, las catalasas (Cats), la glutatión peroxidasa (GPxs) y las peroxirredoxinas (Prxs).

En el caso del radical hidroxilo (•OH) debido a que este es fuertemente reactivo con biomoléculas, el •OH es probablemente capaz de hacer más daño al sistema biológico que algunas otras ERO. Este radical es formado por el H₂O₂ en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe²⁺ o por Cu⁺), frecuentemente ligado a un complejo con diferentes proteínas u otras moléculas. Esto es conocido como reacción de Fenton (Cárdenas y Pedraza., 2005):



Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralicen. De esta manera se ha demostrado bioquímicamente la presencia de varios mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que proporcionan protección contra las especies reactivas de oxígeno. Dentro de los mecanismos enzimáticos se han encontrado a las SODs, GPxs, Cats, y las Prxs (Tutkun *et al.*, 1997). Los mecanismos no enzimáticos constan de algunas vitaminas como la vitamina E y C, además de carotenoides y del glutatión (GSH) (Koyro *et al.*, 2012).

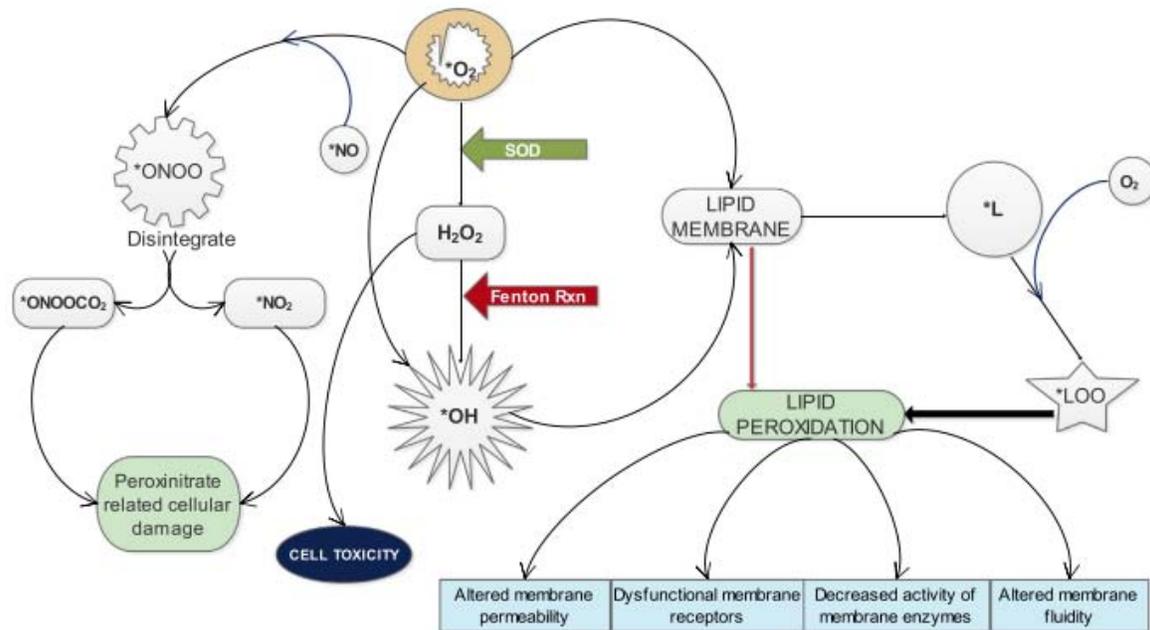


Figura 6. Papel del anión superóxido en la generación de otras especies reactivas (Ighodaro, y Akinloye., 2017)

1.9. Mecanismos enzimáticos antioxidantes

Las SODs son un grupo de metaloenzimas esenciales para contrarrestar el daño por estrés oxidativo ya que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Castellanos *et al.*, 2002). Se han reportado tres tipos de SODs de acuerdo al cofactor que utilizan: mitocondrial SOD-Mn, citológica SODCu/Zn y extracelular SOD-Cu/Zn. Entre las isoformas de las SODs, las SODsCu/Zn son las más eficientes (Wipaphorn *et al.*, 2016). La isoforma SODMn es una proteína tetramérica de 22 kDa. La isoforma SODCu/Zn es una proteína dimérica de 16 kDa por subunidad, mientras que la isoforma extracelular es una glicoproteína tetramérica compuesta de cuatro subunidades de 30 kDa. (Castellanos *et al.*, 2002).

La catalasa (Cat) es una hemoproteína que generalmente se encuentra como homotetrámero con una masa molecular de 240 kDa. Esta enzima cataliza la reacción para producir dos moléculas de H_2O y una de O_2 a partir de dos moléculas de H_2O_2 las cuales son formadas por la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 por la SOD

(Arnér y Nordberg., 2001), por lo que es un enzima regulador de la producción del peróxido de hidrógeno que se lleva a cabo dentro de los peroxisomas (Lehninger., 2004) en los eritrocitos y otros tejidos, tales como los del páncreas y corazón (Glorieuxa *et al.*, 2016).

La glutatión peroxidasa (GPx) al igual que la SOD son metaloenzimas, lo que significa que dependen de la presencia de algunos metales para llevar a cabo su catálisis enzimática (Rotruck *et al.*, 1976). Esta enzima ha sido desarrollada por la célula como otro sistema de protección de la peroxidación de lípidos, ya que cataliza la degradación de peróxidos de hidrógeno a moléculas de alcohol usando a la GSH reducida, como donador específico de hidrógeno (Lemaitre *et al.*, 1997). Existen al menos cuatro tipos diferentes de GPx en mamíferos (GPx1–4), todas ellas contienen selenocisteína (Ursini *et al.*, 1995). Las isoformas GPx1 y GPx4 son citosólicas, las cuales son abundantes en varios tejidos (De Haan *et al.*, 1998; Mates *et al.*, 1999).

Las Prxs Son una familia de enzimas antioxidantes encontradas ubicuamente en diferentes compartimentos celulares, como el citosol, núcleo, mitocondrias y retículo endoplásmico (Wood *et al.*, 2003). Basado en la ubicación y el número de residuos de cisteína conservados en catálisis se dividen en tres clases: la típica Prxs 2-Cys, atípica Prxs 2-Cys las cuales contienen dos cisteínas y la que presenta solo una cisteína Prxs 1-Cys. En los seres humanos, hay seis isoformas de la Prxs (Prx1-6): 4 Prx1 y Prx5 están categorizadas como 2-Cys típica y atípica? 2-Cys, respectivamente, mientras que Prx6 está catalogada como 1-Cys Prx (Kyung *et al.*, 2016). Todas ellas comparten el mismo mecanismo catalítico básico, en el cual la cisteína se encuentra en el sitio activo redox, la cual es oxidada a ácido sulfénico por el sustrato peróxido (Manevich *et al.*, 2004).

La Tiorredoxina (Trx) es una proteína ubicua ya que está ampliamente distribuida desde las archeas, bacterias hasta la especie humana (Holmgren y Lu., 2014). Así la familia de la Trx incluye a la Trx citosolica (Trx-1), mitocondrial (Trx-2) y a la isoforma específica de espermatozoides (Sp-Trx-3) (Mahmood *et al.*, 2013; Hanschmann *et al.*, 2013). Todas estas enzimas han sido reportadas en *Echinococcus granulosus*, *T. crassiceps* y en *T. solium*, donde se ha encontrado una mayor transcripción de las enzimas es en el estadio larvario (Jiménez *et al.*, 2014).

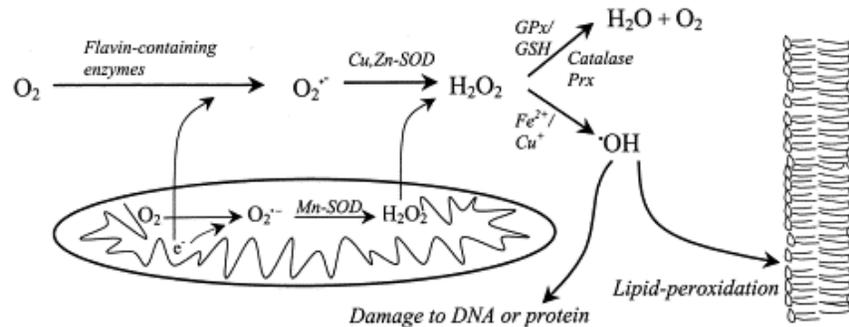


Figura 7. Esquema simplificado de sistemas oxidantes y antioxidantes dentro de la célula (Tomado de Arnér y Nordberg., 2001).

Cabe mencionar que estos helmintos tienen un único y simplificado sistema redox, el cual consta de la selenoproteína Tiorredoxina-glutación reductasa (TGR), una fusión de un dominio Grx con un dominio de TrxR. Esta enzima TGR puede ceder electrones desde la NADPH a la forma oxidada tanto de la glutación (GSSG) como de la Trx (Trx-S₂) así este complejo de flavoenzima cumple funciones tanto de GR como de TrxR (Bonilla *et al.*, 2011).

Tabla 1. Reacciones catalizadas por algunas principales enzimas antioxidantes.

Enzima	Reacción
SOD	$2O_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
CAT	$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
GPx	$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$
Prx	$Trx-(SH)_2 + H_2O_2 \longrightarrow Trx-S_2 + 2H_2O$

1.10. Mecanismos no enzimáticos antioxidantes

Otro nivel de defensa antioxidante consiste de la vitamina E, coenzima Q (CoQ), carotenoides, vitamina A, ácido ascórbico, ácido úrico y algunos otros antioxidantes. El sistema de glutatión (GSH), también tienen un papel importante en el segundo nivel de defensa antioxidante el cual interacciona con el sistema tiorredoxina (Peter *et al.*, 2016). La GSH es el antioxidante intracelular más abundante, se encuentra en concentraciones milimolares en células aerobias. Su función es mantener el medio intracelular reductor mediante su grupo sulfhidrilo, aunque también puede reaccionar con la GPx y la glutatión transferasa para desintoxicar compuestos nocivos o xenobióticos (Van., 2000).

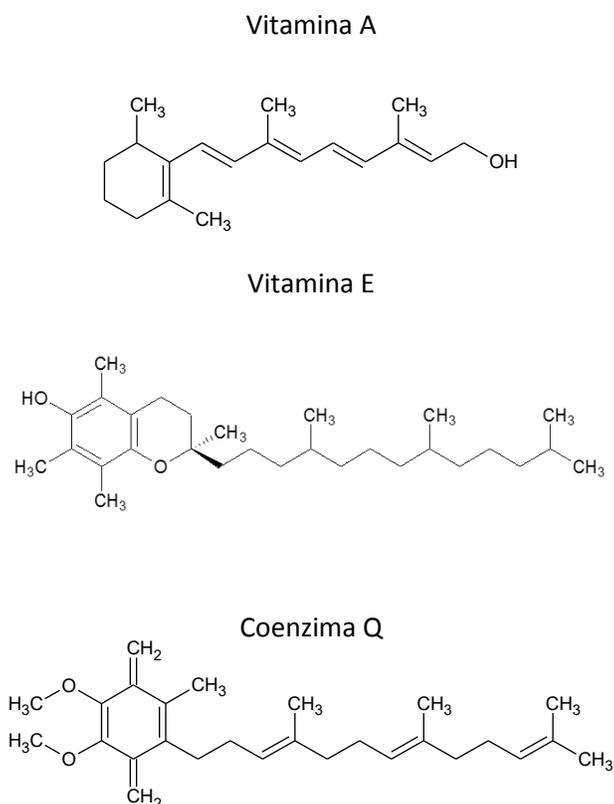


Figura 8. Algunos antioxidantes importantes en el segundo nivel de defensa. (Lehninger., 2005).

1.11. SOD en helmintos

Hay tres tipos de enzimas SOD en helmintos: SODMn mitocondrial, la SODCu/Zn citosólico y la SODCu/Zn extracelular (EC-SODCu/Zn) (González *et al.*, 2002; Piacenza *et al.*, 1998; Lalrinkima *et al.*, 2015; Farankima *et al.*, 2013; Loverde, 1998), las cuales son codificadas por genes distintos (Piacenza *et al.*, 1998). Cada subunidad de SODCu/Zn contiene un ion de Cu (II) y un ion de Zn (II) asociados no covalentemente a la apoproteína (Fridovich, 1989, 1995).

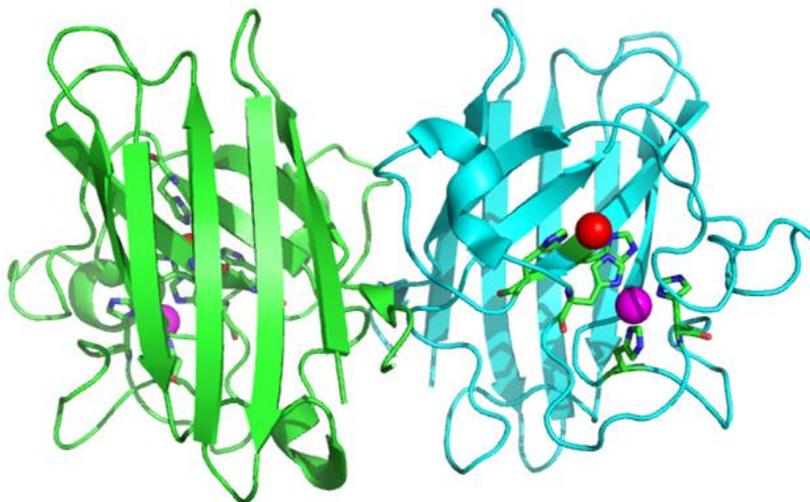
1.12. SODCu/Zn de *T. solium*

La SODCu/Zn de *T. solium* es una proteína de aproximadamente 16 kDa por monómero (Castellanos *et al.*, 2002) como se observa en la figura 5. Cada monómero adopta plegamiento de barril β tipo sándwich formado por ocho hebras β ($\beta 1-\beta 8$) dispuestas antiparalelamente y conectadas por siete lazos (L1-L7). Cada monómero tiene residuos altamente conservados involucrados en la interacción con el cofactor metálico (His-43, His-45, His-60, His-68, His-77 y H-80, His-117).

El ión Cu (II) está coordinado a cuatro residuos de histidina (H43, 45, 60 y 117) en una geometría de tetraedro distorsionado. La H60 hace un puente entre el ión cobre y el zinc. A su vez el Zn (II) está enlazado a otras dos histidinas (H68 y 77).

Dos lazos, el electrostático (L7) y el de unión del Zn (L4) junto con algunos residuos del barril β , conforman las paredes de este canal activo que lleva al radical superóxido desde la superficie de la enzima hasta el sitio catalítico. Varios residuos cargados positivamente en el lazo electrostático crean un gradiente de carga que conducirá al sustrato hasta el Cu (II) (Getzoff *et al.*, 1983).

a)



b)

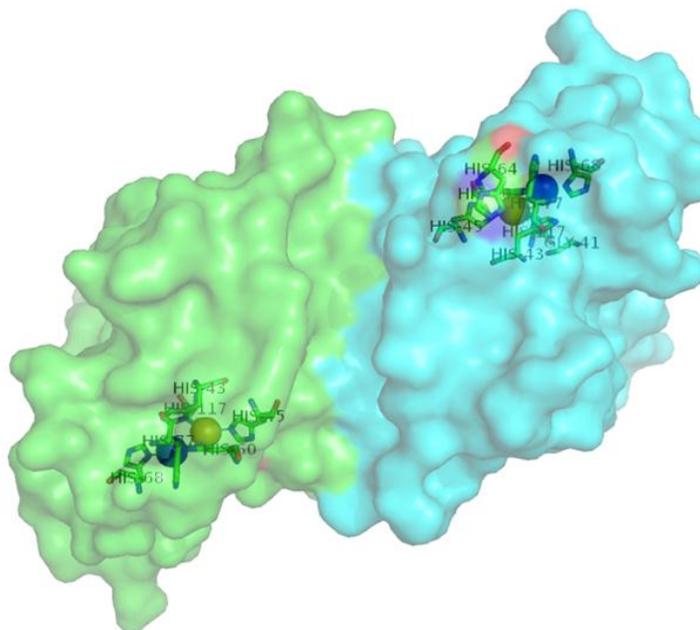


Figura 8. Estructura tridimensional de la enzima recombinante *TsSODCuZn* obtenida del archivo 3MND (PDB) mediante el visualizador molecular PyMOL. **(a)** Representación en cintas de la forma dimérica. **(b)** La estructura de cada monómero consta de un sitio catalítico, como se puede observar utilizando la función superficie and maps del PyMOL.

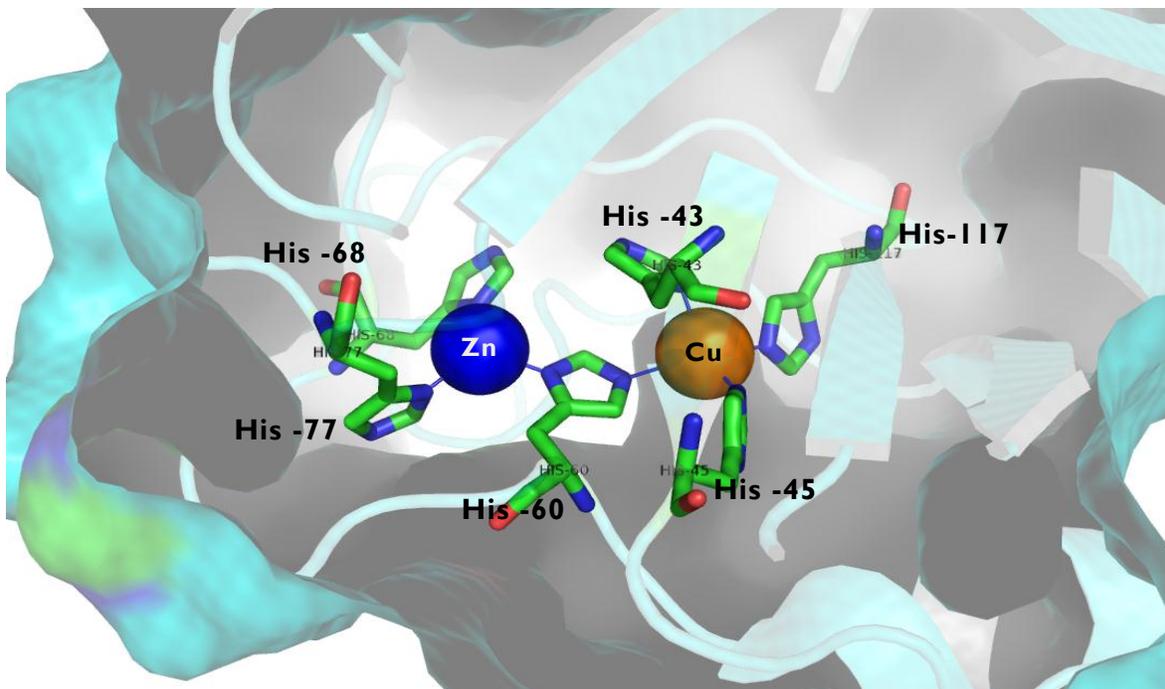
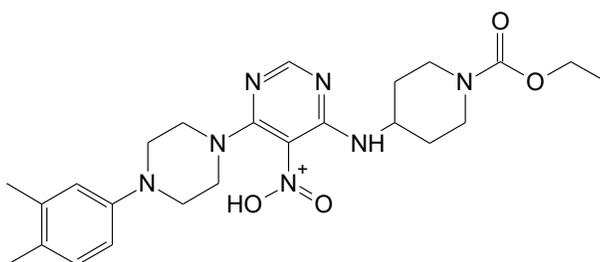


Figura 9. Representación del sitio catalítico. Se observa la coordinación de los metales Cu y Zn mediante histidinas obtenido del archivo 3MND (PDB) apreciado mediante el visualizador molecular PyMOL. El Zn se encuentra coordinado por las histidinas 60, 68 y 77, mientras que para el Cu las histidinas implicadas son His 43, 45, 60 y 117. Se puede apreciar que la His. 60 participa como puente de coordinación para ambos metales.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

Actualmente no se han reportado estudios sobre la inhibición de SODCu/Zn de *T. solium*, Sin embargo, García, *et al.*, (2011) logró identificar seis inhibidores específicos de *TsSODCuZn* mediante simulación de acoplamiento molecular proteína-ligando. Cinco de los inhibidores encontrados (1 a 5) además de mostrar diferentes porcentajes de inhibición de la SODCu/Zn de *T. solium* también lograron inhibir a la SODCu/Zn de humano. En dicho estudio se identificó que el compuesto 4 comercial logró una inhibición del 96% para la *TsSODCu/Zn*, sin afectar a la SODCu/Zn de humano. Por lo que se decidió llevar a cabo más experimentos con este compuesto. Sin embargo, debido a la limitante de obtener el compuesto 4 comercial (por la quiebra de la compañía), se llevó a cabo la síntesis del compuesto 4 en el laboratorio de química orgánica de la Facultad de Química UNAM (Tesis. Miranda-Malagón. Síntesis y evaluación del efecto del compuesto 4 y su clorhidrato en cisticercos de *T. crassiceps*. En proceso). Una vez obtenido el compuesto 4 mediante síntesis, esta tesis tuvo la meta de comprobar el potencial de éste para inhibir a la *TsSODCu/Zn* y observar sus efectos en los cisticercos en cultivo junto con el compuesto.



Formula química: $C_{24}H_{33}N_7O_4$

Peso molecular: 483.26

4-{6-[4-(3,4-Dimetil-fenil)- piperazin-1-il]-5-nitropirimidin-4-ilamino}- piperidin-1-carboxil ácido etil éster

Figura 10. Se muestra la estructura química del compuesto 4 que fue utilizado para los ensayos de inhibición enzimática.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Producir una SODCuZn recombinante de *Taenia solium* y lograr la inhibición de su actividad enzimática con el compuesto 4 sintetizado.

Objetivos particulares

- Expresar y purificar la enzima en forma recombinante.
- Determinación del rendimiento y pureza proteica
- Determinar su actividad e inhibición enzimática

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Expresión y purificación de la TsSODCuZn

Se utilizó un stock de bacterias *E. coli* competentes previamente transformadas con el vector pRSET el cual contiene el ADNc que codifica para TsSODCuZn, las cuales fueron crecidas a 37°C en agitación a 250 rpm por una noche en 50 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y suplementado con ampicilina a una concentración de 10 ug/mL. Este cultivo fue diluido a un volumen 500 mL mayor de medio LB con ampicilina en concentración igual a la del primer cultivo. Este nuevo cultivo fue sometido bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación descritas anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica igual a $DO_{600nm} = 0.6$. En este momento se adicionó sulfato de cobre ($CuSO_4$), sulfato de zinc ($ZnSO_4$) e isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 0.17 mM, 0.20 mM y 1 mM, respectivamente. El medio resultante fue incubado durante 6 horas más, el cual fue centrifugado a 15°C por 4000 rpm durante 15 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en amortiguador salino de fosfatos (PBS) y fue centrifugado con las condiciones anteriores. El nuevo precipitado obtenido fue lisado seis veces durante un minuto, con intervalos de un minuto entre cada una, mediante sonicación en 15 mL de amortiguador de Tris-HCl 50 mM y pH 7.5 en baño maría-hielo para luego centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos.

El sobrenadante se dializó con solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM y pH 7.5 (amortiguador A) y fue concentrado hasta un volumen de 5 mL empleando un equipo Amicon® equipado con una membrana de corte molecular de 10,000 Da (NMWL= 10,000 Da, Millipore). Este concentrado fue inyectado en una columna DEAE-Shepadex de intercambio aniónico (HiPrep 16/10 DEAEFF), previamente equilibrada con el mismo amortiguador del concentrado (amortiguador A).

Para llevar a cabo la obtención de la proteína, se utilizó un gradiente de 50 mM a 200 mM de NaCl, más el amortiguador A.

Los volúmenes del eluyente fueron colectados y concentrados a 2 mL en un equipo Amicon®. Las fracciones de elución que presentaron SOD y otras proteínas, fueron sometidas a una segunda cromatografía empleando la misma columna de intercambio iónico, pero utilizando un pH de 8.9 Tris-HCl 50 mM, (amortiguador B). Obtenidas las fracciones con la SOD se concentraron y se realizó la cuantificación de la proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA-PIERCE) de acuerdo al manual del fabricante. Las muestras obtenidas de ambas cromatografías fueron sometidas a electroforesis PAGE-SDS de acrilamida al 12% a 110 volts, para determinar la pureza de la enzima purificada.

4.2. Determinación de actividad específica y ensayos de Inhibición enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó el método de xantina-xantina oxidasa (XOD) para formar el radical $O_2^{\cdot-}$, el cual reduce al citocromo C, mostrando un espectro de absorbancia que puede ser detectado a 550 nm. Este método se basa en registrar la disminución en la absorbancia debido a la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 por la presencia de la actividad enzimática de la SOD. Por el contrario en el caso de la inhibición de la SOD se presenta un aumento en el espectro de absorbancia debido a la reducción del citocromo por $O_2^{\cdot-}$ (ver figura 11). Los ensayos fueron realizados en un volumen de 1mL. Se utilizó solución amortiguadora de fosfato (KH_2PO_4) con un pH de 7.8 a 50 mM, xantina a 0.4 mM y 0.8 mM de citocromo C. En esta mezcla se agregó suficiente xantina oxidasa hasta obtener una absorbancia de 0.1 en la reducción de citocromo, el cual fue tomado como un valor de 100% de reducción. La actividad fue determinada como unidades por miligramos (U/mg) donde una unidad (1U) corresponde a la cantidad de TsSODCuZn la cual reduce la absorbancia en un 50% después de 2 minutos de haber iniciado la reacción.

Para los ensayos de inhibición se incubó el compuesto 4 (0.03, 0.05, y 0.1 mM) en solución amortiguadora KH_2PO_4 junto con 10U de TsSODCuZn a 37°C durante 30 minutos para luego determinar la actividad por el método antes mencionado. Como control negativo se realizó un ensayo en ausencia y presencia de dimetil sulfóxido (DMSO), reactivo en el cual fueron disueltos los compuestos.

Para determinar que nuestra enzima corresponde a la de tipo Cu/Zn, se realizó un ensayo con los inhibidores específicos cianuro de potasio (KCN) y azida de sodio (NaN₃).

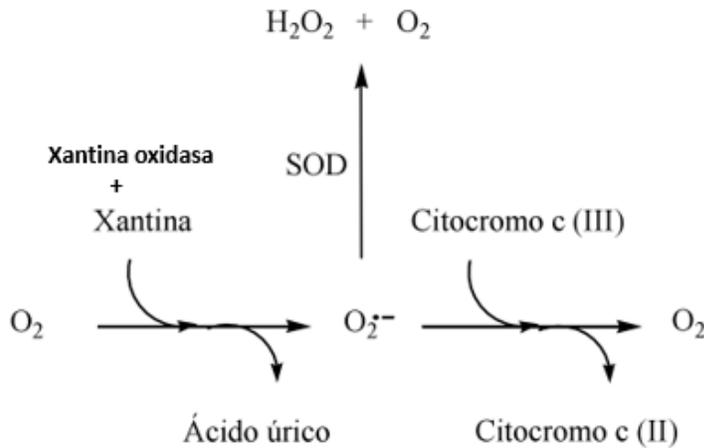


Figura 11. Determinación de la actividad de la SOD mediante la reacción de reducción del citocromo c (III) por el radical superóxido producido por el sistema xantina-xantina-oxidasa. Esta reacción puede ser inhibida por la presencia de la enzima SOD la cual lleva a cabo la reacción de dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

4.3. Efecto *in vitro* en cisticercos del compuesto 4 sintetizado

Se obtuvieron cisticercos a partir del peritoneo de una cepa de ratones WFC con cuatro meses de infección. Se incubaron 15 cisticercos en medio RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.1 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (110 mg/ml) en placas de cultivo de 24 pozos a 37 °C y 98% de humedad relativa durante 2 horas para su acondicionamiento. Luego de las 2 horas transcurridas, los parásitos fueron tratados con 3 diferentes concentraciones del compuesto 4 (100, 200 y 300 µM) utilizando como controles negativos a cisticercos tratados con el disolvente del compuesto 4 (DMSO) y a cisticercos solo con el medio de cultivo. El albendazol (300 µM) fue utilizado como control positivo en daño. Cada tratamiento y control fue monitoreado a diferentes tiempos: 3, 6, 12 hrs y con un tiempo máximo de 24 hrs. Para la determinación de la viabilidad se realizó una observación de movilidad, evaginación de escólex, así como daño a la membrana, mediante microscopía óptica.

La movilidad fue determinada como alta (++++), media (+++), moderada (++) , baja (+) o nula (-). La integridad morfológica de la membrana, fue establecida por pérdida de líquido vesicular, daño en la pared y fue clasificada como integridad completa (C) en el caso de no presentar daño alguno, y media (M) o nula (N) en el caso de presentar alguna alteración o daño en la morfología de la membrana (ver tabla 5.1 de resultados).

CAPITULO 5

RESULTADOS

5.1. Expresión y purificación de SODCu/Znr

La Fig. 5.1 muestra un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de la purificación de la *TsSODCuZnr* mediante una columna DEAE-Sefadex. En el carril 3 se observa el lisado de *E. coli* que expresa abundantemente una proteína de ~16 kDa luego de la inducción con IPTG, y donde además se puede observar una gran cantidad de bandas proteicas en un rango de 10-200 kDa. En contraste, en el carril 2 se muestra el lisado de bacterias no inducidas, que presenta las mismas bandas proteicas que el carril 3. En el carril 4 se muestra el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del lisado bacteriano del carril 3, este también presenta las mismas bandas proteicas observadas en las bacterias en un rango de 10-200 kDa. Este lisado fue pasado por la columna DEAE-Sefadex previamente equilibrada a pH 7.5 y cargado en el carril 5. En el carril 6 se observa una fracción del lavado de la columna, donde se pueden apreciar bandas proteicas que no son retenidas por la primera columna. En el carril 7 se muestran las fracciones de proteínas eluidas con las concentraciones de 100-150 mM de NaCl, se observa un enriquecimiento de la proteína de 16 kDa con 2 proteínas contaminantes de 25 y 35 kDa. Las muestras del carril 7 se juntaron y dializaron con solución amortiguadora de fosfatos a pH 8.9, y se pasaron por segunda vez en la misma columna de DEAE-Sephadex siguiendo el mismo protocolo, sólo cambiando el pH del amortiguador a pH 8.9. El carril 8 muestra la fracción eluida de la segunda columna con el gradiente de NaCl (120mM), que contiene una proteína de 16 kDa muy abundante y con una alta pureza.

Al final del proceso se obtuvo un rendimiento de 5.8 mg a partir de un 500 mL de cultivo bacteriano, el cual fue determinada por el método de ácido bicinconínico. La pureza de la enzima (95%) fue observada en un SDS-PAGE con 5 µg de proteína.



Figura 5. 1. SDS-PAGE mostrando la purificación de la Superóxido dismutasa de cobre/Zinc de *Taenia solium* (*TsSODCuZn*). 1-marcador de peso molecular. 2- *E. coli* sin inducir, 3- *E. coli* inducida con IPTG para producir la enzima recombinante, 4- Sobrenadante de lisis bacteriana de la *E. coli* inducida con IPTG, 5- Sobrenadante de lisis bacteriana de la *E. coli* inducida pasado por la columna HiTrapp™DEAE-FF. 6- lavado último de la columna con Tris-HCl 50 mM. 7- Fracciones de elución de la primera cromatografía (pH 7.5) con 100-150 mM de NaCl, y 8- Fracciones de elución de la segunda cromatografía (pH 8.9) con 120 mM de NaCl.

La *TsSODCu/Znr* fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. El correspondiente espectro de masas se aprecia en la Figura 5.2. En él se observan varias señales a diferente relación m/z (masa/carga) siendo las más importantes las de $m/z= 5198.6$, 31347.2 y 15668.8 , correspondientes a aductos generados durante la ionización de la *TsSOD* en su forma dimérica. Específicamente $m/z= 5198.6$ corresponde a la especie $[TsSOD+6H^+]^{6+}$ mientras que $m/z= 31347.2$ corresponde a $[TsSOD+2Zn+k^+]^+$ y $m/z=15668.8$ a la especie $[TsSOD+2K^+]^{2+}$. En general la *TsSODCu/Zn* pierde los iones Cu y Zn por lo que no fue posible observar al dímero con los sitios catalíticos intactos. Los aductos inestables pueden degradarse antes de llegar al detector y no generar señal. Por otro lado, el resto de las señales observadas en el espectro de masas pueden corresponder a impurezas en la muestra proteica o á aductos complejos de la *TsSODCu/Zn* como la de la m/z 7821.6. Finalmente, el pico $m/z=15668.8$ nos predice el peso molecular de 16 kDa.

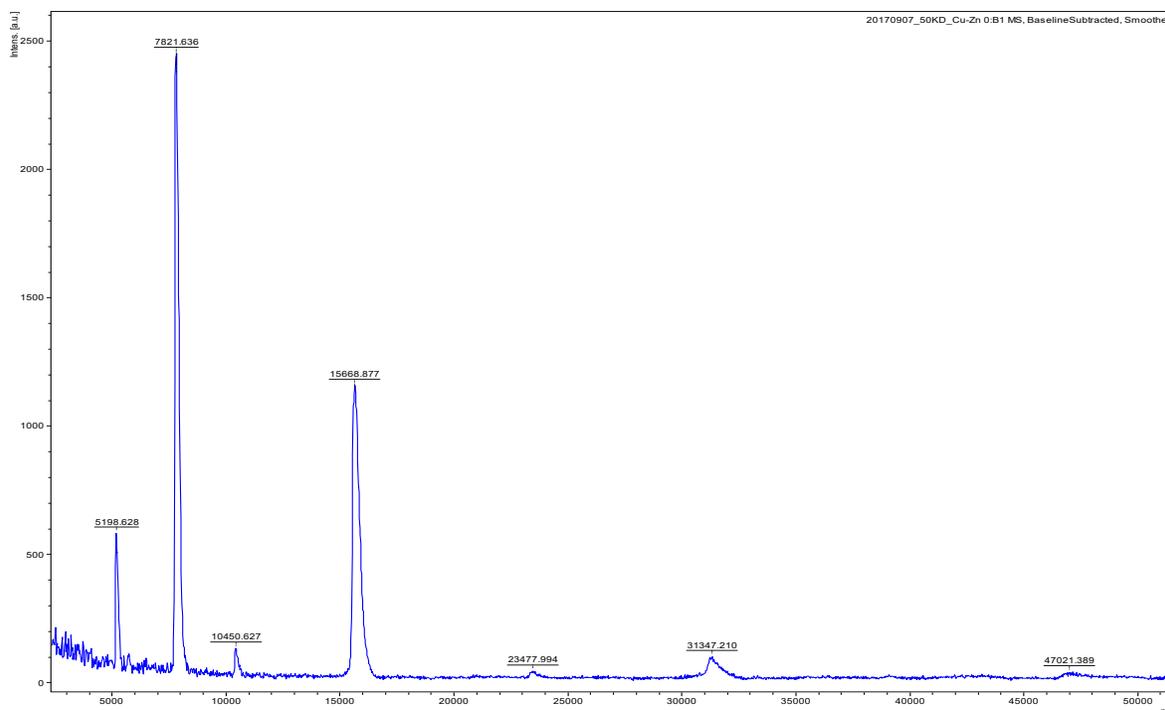


Figura 5. 2. Espectrometría de masas MALDI. Se observa el espectro de la proteína de 16 kDa. Se observan diferentes señales a diferente relación masa/carga (m/z) donde las $m/z= 5198.6$, 15668.8 y 31347.2 , corresponden a aductos generados durante la ionización de la TsSOD en su forma dimérica. Específicamente $m/z= 5198.6$ corresponde a la especie $[TsSOD+6H^+]^{6+}$ mientras que $m/z= 31347.2$ a la especie $[TsSOD+2Zn+k^+]^+$.

5.2. Determinación de la actividad específica enzimática y del cofactor enzimático Como se observa en la Figura 5.3, se determinó la actividad específica por el método de xantina-xantina oxidasa, de la proteína pura de 16 kDa, en donde se obtuvo un valor de 2,777 U/mg, y para la actividad total se obtuvo un valor de 16106.6 U/mg. Donde una unidad (1U) corresponde a 0.36 μg de SOD, se utilizaron 3.6 μg (10 U) de enzima para los ensayos de inhibición. En la Figura 5.4, se aprecia la disminución de actividad en un 82% y 96% utilizando 1 mM y 10 mM del inhibidor específico KCN, mientras que al utilizar las mismas concentraciones de NaN_3 la actividad no se ve afectada.

Actividad específica = 2777 U/mg

Figura 5. 3. Determinación de la actividad específica de SODCuZn. En la gráfica se muestra la determinación de una unidad enzimática, que se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% la reducción del citocromo C. Las líneas de intercepción indican que 0.36 μg de enzima equivalen a 1U de SODCuZn.

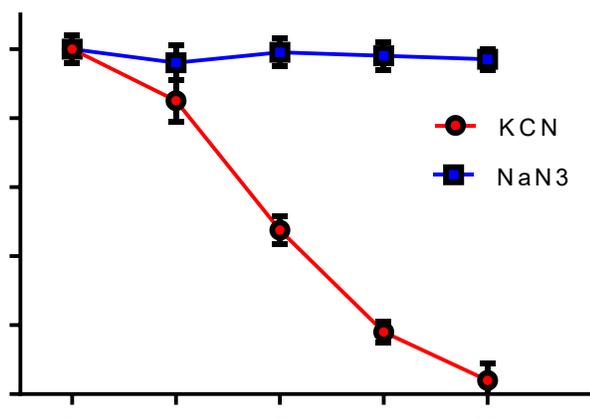


Figura 5. 4. Identificación del cofactor para la enzima SOD. En la gráfica se observa el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de KCN y de NaN₃ sobre la actividad enzimática de la proteína de 16 kDa purificada. Las concentraciones de KCN inhiben la actividad enzimática en tanto que las mismas concentraciones de NaN₃ no lo hacen.

Para asegurarnos de la estructura del compuesto 4 sintetizado, se le realizó una espectrometría de masas. En la Figura 5.5, se observan varias señales a diferente

relación m/z (masa/carga), siendo la más intensa la de m/z = 484.2671 correspondiente a la fórmula del compuesto 4 protonado $[C_{24}H_{33}N_7O_4+H]^+1H$ y un pico de mucho menor intensidad con un m/z de 745,3609, que corresponde a uno de los tantos aductos producidos durante el proceso de la espectrometría.

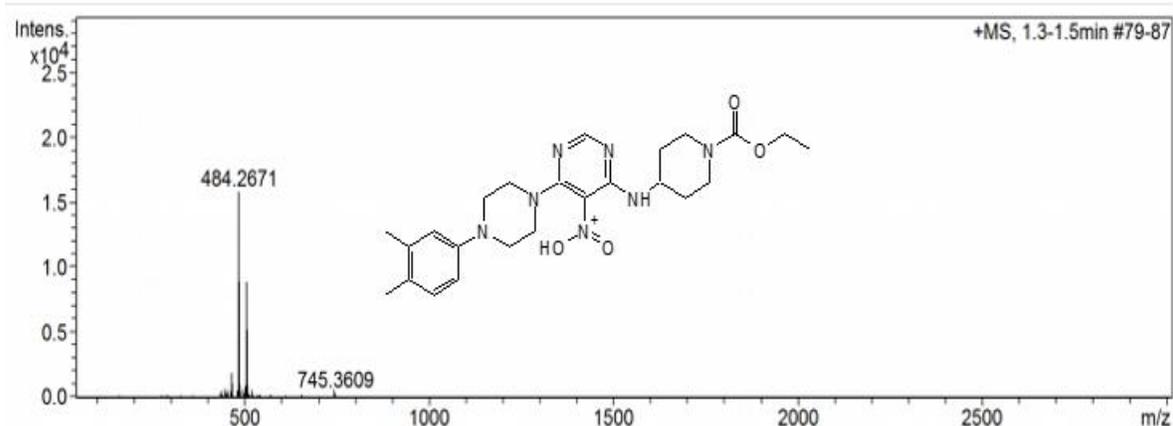


Figura 5. 5. Espectrometría de masas ESI del compuesto 4 sintetizado en Facultad de Química. Se observa la señal de mayor intensidad con un m/z=484.26 generado por la ionización del compuesto 4 (483.26g/mol) por un H⁺

5.3. Inhibición enzimática mediante el compuesto 4 sintetizado

En la Figura 5.6, se muestra el efecto que tienen diferentes concentraciones del compuesto 4 sintetizado y del compuesto 4 comercial. Los controles de la TsSODCu/Zn con y sin DMSO mostraron una actividad del 100%, mientras que la TsSODCu/Zn con el compuesto 4 comercial fue inhibida en un 50 y 95% a 30 y 50 μ M respectivamente, en presencia de DMSO. En el caso del compuesto 4 sintetizado no se observó inhibición de la actividad enzimática con las mismas concentraciones de 30 y 50 μ M.

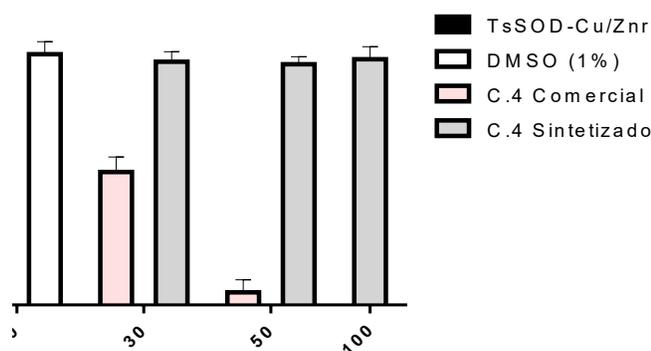


Figura 5.6. Inhibición de la actividad enzimática de *TsSODCuZnr* usando el compuesto 4 comercial y el compuesto 4 sintetizado determinada por el método xantina-xantina oxidasa. La gráfica muestra el porcentaje de actividad residual de la enzima luego de incubar 10 U de enzima en ausencia y presencia de 30, 50 y 100 μM del compuesto 4 sintetizado. Como control positivo se utilizó el compuesto 4 comercial, y como controles negativos, se incubó la enzima en ausencia de los compuestos sin o con DMSO al 1%.

5.4. Efecto *in vitro* en los cisticercos del compuesto 4 sintetizado

En cuanto a la integridad de la morfología ovoide, todos los grupos conservaron su forma, además no se observaron daños sobre la pared vesicular del cisticercos durante todos los tiempos ensayados y con las diferentes concentraciones usadas del compuesto 4 sintetizado.

Lo que si se observó fue una disminución en la movilidad de los cisticercos luego de ser incubados con diferentes concentraciones del compuesto 4 por diferentes tiempos. Con la concentración de 100 μM del compuesto, los cisticercos presentaron una disminución media de la movilidad al tiempo de 6 h, la cual se disminuyó a una movilidad moderada a las 24 horas. En cuanto a las concentraciones de 200 μM y 300 μM se observó un patrón de movilidad baja para todos los tiempos.

En cuanto a los grupos control (RPMI y DMSO), los cisticercos mantuvieron su morfología y movilidad alta durante todos los tiempos, mientras que en los grupos tratados con ALBZ (Control positivo), los cisticercos presentaron una movilidad moderada en los tiempos de 3 y 6 horas, y una movilidad baja en los tiempos de 12

y 24hrs, respectivamente, sin presentar daño en la pared vesicular ni en la morfología del cisticerco.

Tabla 5.1. Efecto *in vitro* en cisticercos, de diferentes concentraciones del compuesto 4 sintetizado.

Grupo control	Tiempo (h)			
	3	6	12	24
RPMI	++++ C	++++ C	++++ C	++++ C
DMSO	++++ C	++++ C	++++ C	++++ C
ALBZ	++ C	++ C	+ C	+ C

Compuesto 4	Tiempo (h)			
	3	6	12	24
100 µM	+++ C	+++ C	++ C	++ C
200 µM	++ C	++ C	++ C	++ C
300 µM	++ C	++ C	++ C	++ C

Movilidad: +++++ Alta; +++ Media; ++ Moderada; +Baja; -Nula.

Integridad: C=Completa; M=Media; N=Nula.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN

La proteína purificada mediante cromatografía de intercambio iónico, en un PAGE-SDS presentó una pureza del 95% y un peso molecular aproximado de 16 kDa, como el determinado previamente (Castellanos *et al.*, 2002 y García *et al.*, 2011). Este peso fue confirmado por la espectrometría de masas, que reportó un valor de 15668.87 Da. Es de notar que este valor, no tiene en cuenta los valores de los metales catalíticos (Cu y Zn). Por eso la diferencia obtenida puede ser explicada por la presencia de la especie $[TsSOD+2K+]^{2+}$, el cual es un aducto generado durante la ionización por la adición de dos iones de K, en la espectrometría de masas. La actividad específica de SOD de esta proteína de 16 kDa fue determinada por el método de xantina–xantina-oxidasa, y fue de 2,777 U/mg (Figura 5. 6). Estos valores son congruentes con lo descrito en trabajos previos (Castellanos *et al.*, 2002 y por García *et al.*, 2011) para su peso molecular y la actividad específica de SOD de 2,900 U/mg y 2,857 U/mg, respectivamente. Por otro lado, su actividad fue inhibida en 80% con 1 mM KCN, mientras que concentraciones elevadas de NaN_3 (10 mM), no la afectaron. Éstos inhibidores son específicos para las SODCuZn y las SODMn, respectivamente. El KCN es inhibidor para las SODCuZn ya que ataca en el sitio redox Cu (II), mientras que el NaN_3 afecta la actividad enzimática de la SODMn atacando al Mn sin tener efecto alguno sobre el sitio catalítico de las SODCuZn, lo que concuerda con lo reportado por Castellanos *et al.*, 2002. Estos resultados experimentales antes mencionados nos permiten concluir que la enzima de 16 kDa obtenida es la *TsSODCuZn*.

El compuesto 4 sintetizado fue verificado por medio de espectrometría de masas, concluyendo que es el mismo que el compuesto 4 comercial. Sin embargo, el compuesto 4 sintetizado, no inhibió la actividad de la *TsSODCu/Znr* a las concentraciones usadas en esta tesis, lo que no concuerda con los valores de inhibición reportados por García *et al.*, (2011) quien logro obtener un 95% de

inhibición a partir de 50 μM con el compuesto 4 comercial, el cual fue incoloro. Nuestro espectro de masas nos indica que estos compuestos 4 son iguales, aunque la síntesis se llevó a cabo en laboratorios distintos. Cabe mencionar que un inconveniente que limitó el poder determinar adecuadamente los ensayos de inhibición, fue que el compuesto 4 sintetizado fue de color amarillo y absorbe a la misma longitud de onda con la que se mide en el método de xantina-xantina-oxidasa. Experimentos de cinética de tiempo y concentraciones con el compuesto 4 sintetizado fueron realizados, pero no se observó inhibición alguna, concluyendo que no inhibe a la enzima.

Podríamos pensar que la capacidad inhibitoria es consecuencia de las interacciones alcanzadas y la complementariedad geométrica que alcanza un inhibidor o sustrato en los sitios de unión de una enzima. De acuerdo con García Gutiérrez (*et al.*, 2011) el compuesto 4 comercial, el cual presenta actividad inhibitoria para *TsSODCu/Zn*, forma una interacción tipo puente de hidrógeno entre el átomo de N en el anillo de pirimidina y el O del hidroxilo del residuo no conservado de serina 108 de la cadena B, y el N del mismo anillo que interacciona con la isoleucina 110 de la cadena B. Adicionalmente, está el que se forma entre el grupo CO del éster en el ligando y el NH en la metionina de la cadena B, también un residuo no conservado, por lo que el compuesto 4 comercial se une en un sitio de unión diferente del sitio catalítico de la *TsSODCu/Zn*. Para el caso del compuesto 4 sintetizado, estos átomos de N, es probable que se estén oxidando, lo que pudiera estar generando el color amarillo, además de perder la interacción del átomo de N en el anillo de pirimidina con la serina 108 y la isoleucina 110 de la cadena B que forman los puentes de hidrógeno.

Por otro lado, cabe mencionar que actualmente muchas empresas farmacéuticas que se encuentran en la búsqueda de nuevas formulaciones para el suministro de fármacos han utilizado excipientes que pueden agregar funcionalidad al compuesto, así como promover estabilidad física, química y biológica a los productos farmacéuticos, estas pueden ser las razones de las diferencias encontradas entre estos compuestos 4.

A pesar de la no inhibición presentada contra la *TsSODCuZnr*, este compuesto 4 se probó contra los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU. Y se observó que este compuesto disminuyó la movilidad de los parásitos en 50% a las concentraciones de 100, 200 y 300 μM , en comparación con el grupo control negativo con sólo RPMI en donde la movilidad fue del 100% y del grupo control positivo (ALBZ) en donde la movilidad disminuyó en un 30% a las 12 y 24 h. Como es sabido el ABZ se une a la tubulina y afecta la polimerización del citoesqueleto, lo que afecta la movilidad de los parásitos (Paredes., 2008).

Finalmente, muchas preguntas quedan aún por resolver acerca de las diferencias sobre el efecto inhibitorio de actividad enzimática de la *TsSODCu/Zn* por el compuesto 4 sintetizado y comercial, si estos son iguales, de acuerdo a los datos obtenidos de la espectrometría de masas. Una posible explicación son las diferencias mencionadas como la adición de algún tipo de excipiente en el compuesto 4 comercial y que no fue agregado en el compuesto sintetizado, o la posible oxidación del átomo de N, lo cual podría conllevar a la inestabilidad en el grupo funcional piperazina.

En cuanto al efecto de disminución de la movilidad de los parásitos *in vitro*, queda como una pregunta para responder, el mecanismo por el cual actúa este compuesto.

Finalmente, dicho todo lo anterior queda, clara la idea acerca del riguroso estudio que se necesita realizar para poder desarrollar algún tipo de fármaco antihelmíntico. Por ejemplo, el estudio de la composición química y estructural tanto de la molécula blanco como la del fármaco en estudio, así como determinar las características de interacción de ambos como complejo proteína-ligando y su mecanismo de acción sobre los parásitos.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

- Se logró purificar la SODCu/Zn recombinante de *T. solium* (TsSODCuZn).
- El compuesto 4 sintetizado no inhibió a la TsSODCuZn.
- El compuesto 4 sintetizado disminuye la movilidad (50%) en los cisticercos a una concentración de 100µM por 24 h.
- El estudio abre nuevas preguntas como:
 - ¿Por qué el compuesto 4 sintetizado no inhibió a la TsSODCu/Zn?
 - Determinar los mecanismos por los que el C4 sintetizado:
No inhibe a la enzima, pero si disminuye la movilidad de los cisticercos.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez J, Rivera J, Teale JM. 2008. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *Plos Negl Trop Dis*. Vol. 2 Núm. 4. Págs 1- 12
- Arnér, E. S. J., Nordberg J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. 2000. *Free Radical and Medicine*. Vol. 31, Núm. 11, Págs. 1287-1312
- Arner, E.S., A. Holmgren, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem. FEBS* Vol. 267. Págs. 6102-6109.
- Arner, E.S. 2009. Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1790 Págs. 495-526.
- Bonilla Mariana, Ana Denicola, Stefano M. Marino, Vadim N. Gladyshev, Gustavo Salinas. 2011. Linked Thioredoxin-Glutathione System in Platyhelminth Parasites. Alternative Pathways for glutathione reduction and deglutathionylation. *J. Biol. Chem*. Vol. 286. Págs. 4959-4967
- Bobes, R.J., Fragosó, G., Fleury, A., García-Varela, M., Sciutto, E., Larralde, C., Lacleste, J.P., 2014. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infect. Genet. Evol.* Vol. 23, Págs. 150–160
- Brusca, R. y G. Brusca. 2003. Invertebrates. Segunda edición. Sinauer Associates Inc. Publisher. Massachusetts, Estados Unidos; Págs.285-318.
- Cárdenas Noemí -Rodríguez y José Pedraza-Chaverri 2005. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos *Educación Química* Vol.17. Núm.2. Págs. 165-167

- Castellanos-González, A., Jiménez, L., Landa, A., 2002. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1175–1182.
- Casagrande S., V. Bonetto, M. Fratelli, E. Gianazza, I. Eberini, T. Massignan, M. Salmona, G. Chang, A. Holmgren, P. Ghezzi, 2002. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol.99. Págs. 9745-9749.
- Coral-Almeida, M., Gabriel, S., Abatih, E.N., Praet, N., Benitez, W., Dorny, P. 2015. *Taenia solium* human cysticercosis: a systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. *PLoS Negl. Trop. Dis.* Vol.9, Págs.1–20.
- De Haan, J. B.; Bladier, C.; Griffiths, P.; Kelner, M.; O’Shea, R. D.; Cheung, N. S.; Bronson, R. T.; Silvestro, M. J.; Wild, S.; Zheng, S. S.; Beart, P. M.; Hertzog, P. J.; Kola. 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* Vol. 273. Págs. 22528–22536
- Delpy R., M. Guisset, F. Klotz. 2005. Cestodoses adultes. *EMC - Maladies Infectieuses*, Vol. 2, Núm. 1., Págs. 11-32.
- Eklund H., F.K. Gleason, A. Holmgren, 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species, *Proteins* Vol.11 Págs.13-28.
- Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. 2016. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Review. Parasite Immunol.* Vol.38. Num. 3. Págs.147-57.
- Flisser A, Viniegra AE, Aguilar-Vega L, Garza-Rodriguez A, Maravilla P, Avila G. 2004, Portrait of human tapeworms. *J Parasitol.* Vol.90. Págs. 914-916
- Flisser, A., L. Vargas Parada y J. P. Laclette (2006), “*Taenia solium*: un parásito cosmopolita”, *Investigación y Ciencia*, 356:24-33.

- Garcia H, Del Brutto O. 2005. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis. *J. Trop. Med. Hyg.* Vol.72. Págs. 3–9
- Garg RK. 2001. Medical management of neurocysticercosis. *Neurol India.* Núm. 49. Págs.329-37.
- Getzoff E. D., Tainer J. A., Weiner P. K., Kollman P. A., Richardson J. S. and Richardson D. C. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 1983, Vol.306. Págs. 284-287.
- Glorieux, Christophe., Juan Marcelo Sandovala, Antoine Fattacciolid, Nicolas Dejeansa, James C. Garbee, Marc Dieuf, Julien Verraxa, Patricia Renardd, Peng Huangb, Pedro Buc Calderona, 2016. Chromatin remodeling regulates catalase expression during cancer cells adaptation to chronic oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine.* Vol. 99. Págs. 436–450
- Hanschmann, E.M. J.R. Godoy, C. Berndt, C. Hudemann, C.H. Lillig, 2013) Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling *Antioxid. Redox Signal.* Vol. 19. Págs.1539-1605
- Holmgren Arne., J. Lu, 2010 Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396 120-124.
- Holmgren Arne., J.Lu. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine.* Vol.66. Págs. 75-87
- Ito, A., Putra, M.I., Subahar, R., Sato, M.O., Okamoto, M., Sako, Y., Nakao, M., Yamasaki, H., Nakaya, K., Craig, P.S., Margono, S.S., 2002. Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. *J. Helminthol.* Vol.76, Págs.311–314

- Ighodaro, O.M. Akinloye, O.A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence. *Alex.J. Med.* Págs.1-7
- Jiménez Lucia, Oscar Rodriguez Lima, Alicia Ochoa Sánchez, Abraham Landa. 2014. Characterization of a Thioredoxin-1 Gene from *Taenia solium* and its Encoding Product. *BioMed.* Vol. 2015. Págs. 1-10
- Kalra V, Dua T, Kumar V. 2003. Efficacy of albendazole and short-course dexamethasone treatment in children with 1 or 2 ring-enhancing lesions of neurocysticercosis: a randomized controlled trial. *J Pediatr*, Núm.143. Págs. 111-4
- Kimura-Hayama, E.T., Higuera, J.A., Corona-Cedillo, R., Chavez-Macias, L., Perochena, A., Quiroz-Rojas, L.Y., Rodriguez-Carbajal, J., Criales, J.L., 2010. Neurocysticercosis: radiologic-pathologic correlation. *Radiograph.* Vol. 30. Págs. 1705–1719.
- Kobayashi, K.1, Nakamura-Uchiyama, F., Nishiguchi, T., Isoda, K., Kokubo, Y., Ando, K., Katurahara, M., Sako, Y., Yanagida, T., Ito, A., Iwabuchi, S., Ohnishi, K., 2013. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveler after returning from India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 89, Págs.58–62.
- Kohler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 336–45.
- Kondo, N. H. Nakamura, H. Masutani, J. Yodoi, 2006 Redox Regulation of Human Thioredoxin Network. *Antioxid. Redox Signal.* Vol. 8 Págs.1881-1890.
- Koyro, H.W., Ahmad, P., Nicole, G., 2012. Abiotic stress responses in plants: Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. *Springer Science* .Págs. 128.

- Kyung Hee Kim, Weontae Lee, Eunice EunKyeong Kim. 2016. Crystal structures of human peroxiredoxin 6 in different oxidation states. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 477, Núm. 4, 2. Págs 717-722
- Lescano, A.G., Garcia, H.H., Gilman, R.H., Gavidia, C.M., Tsang, V.C.W., Rodriguez, S., Moulton, L.H., Villaran, M.V., Montano, S.M., Gonzalez, A.E., 2009. Taenia solium cysticercosis hotspots surrounding tapeworm carriers: clustering on human seroprevalence but not on seizures. *PLoS Negl. Trop. Dis.* Vol. 3, Págs.1–8.
- Lehninger AL, Nelson, D., and Cox, 2005. M.principles of biochemistry (4^a ed.) Omega. Biochemistry and Molecular Biology Education, 1539-3429, 33 (1) Págs. 693-700
- Lemaitre Dominique, Evelyne Véricel, Anne Polette, Michel Lagarde. 1997. Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 53, Num. 4, Págs. 479-486
- L.E. Netto, F. Antunes, 2016. The Roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction. *Mol. Cells* Vol.39. Págs. 65-71
- Lu, J., Holmgren, A. 2012. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxid. Redox Signal.* Vol.17. Págs.1738–1747
- Mahmood, A. Abderrazak, K. El Hadri, T. Simmet, M. Rouis, 2013. The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease *Antioxid. Redox Signal.* Vol. 19. Págs.1266-1303.
- Manevich Y, S.I. Feinstein, A.B. Fisher, 2004. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol.101 Págs. 3780-3785
- Marshall, A.J., Williams, W. D. 1985. *Zoología de Invertebrados*. 7^a ed. Vol. 1 Editorial Reverte. Barcelona. Págs. 221-225

- Marnett, L. J. 2000. Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. Vol. 21. Págs. 361-370
- Martin, D. Brand. The sites and topology of superoxide production. 2010. *Exp. Gerontol*. Vol. 45. Págs. 466-472
- Mates, J. M.; Perez-Gomez, C.; Nunez de Castro, I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem*. Vol. 32. Págs. 595–603
- Mitchell D.A., M.A. Marletta, 2005. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine, *Nat. Chem. Biol*. Vol.1 Págs.154-158.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 6ª ed. Barcelona: Ed Elsevier; 2009.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A., 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *J. Parasitol*. Vol. 43, Págs.1017–1029.
- Nash T. 2003. Human case management and treatment of cysticercosis. *Acta Tropica*; 87: 61-9.
- Nicholas, J. Watmough and Frank E. Frerman. 2010. The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochem. Biophys*. 1797. Págs. 1910-1916.
- Nishiyama, A.; Matsui, M.; Iwata, S.; Hirota, K.; Masutani, H.; Nakamura, H.; Takagi, Y.; Sono, H.; Gon, Y.; Yodoi, J. 1999. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D (3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem*. Vol. 274. Págs.21645–21650).
- Nogales Jorge -Gaete, Camilo Arriagada R, Rodrigo Salinas R. 2006. Tratamiento de la neurocisticercosis: Revisión crítica. *Rev Méd*. Núm. 134. Págs. 789-796

- Oblong J.E., P.Y. Gasdaska, K. Sherrill, G. Powis, 1993. Purification of Human Thioredoxin Reductase: Properties and Characterization by Absorption and Circular Dichroism. *Biochem.* Vol.32. Págs. 7271-7277.
- Paredes Salomon Cristina. 2008. Caracterización inmunoquímica de tubbulina alfa en cisticercos de *Taenia crassiceps*. Tesis que para obtener el grado de Maestra en ciencias biológicas. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina.
- Patwari, P.; Higgins, L. J.; Chutkow, W. A.; Yoshioka, J.; Lee, R. T. 2006. The interaction of thioredoxin with Txnip—evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* Vol. 281. Págs. 21884–21891
- Pérez-López C, Isla-Guerrero A, Alvarez F, Budke M, Fernández-Miranda J, Paz 2003. Actualización en el tratamiento de la neurocisticercosis. *Rev Neurol.* Núm. 36. Págs. 805-11
- Peter F. Surai, Vladimir I. Fisinin, Filiz Karadas. 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition*, Vol. 2, Núm 1, Págs. 1-11
- Petherick, J.A. 2000. Biology of the in vertebrates. Cuarta edición. Mc-Graw Hill, New York, US. Págs.143-167.
- Plancarte Agustín y Gabriela Nava. 2015. Purification and kinetic analysis of cytosolic and mitochondrial thioredoxin glutathione reductase extracted from *Taenia solium* cysticerci. *Exp. Parasitol.* Vol. 149. Págs. 65-73
- Proaño JV, Madrazo I, Avelar F, López-Félix B, Díaz G, Grijalva I. 2001. Medical treatment for neurocysticercosis characterized by giant subarachnoid cysts. *N Engl J Med.* Núm. 345 Págs. 879-85
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* Vol.179. Págs.588-590.

- Ruppert, E. E., R. D. Barnes. 1996. Zoología de los invertebrados. 6ta edición. McGraw-Hill Interamericana, México. Pág. 253
- Salinas G., M. E. Selkirk, C. Chalar, R. M. Maizels, and C. Fernandez, Linked 2004. thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths, *Trends in Parasitology*, vol. 20, Num. 7, Págs. 340–346.
- Hernández-Santoyo A., Landa A., Gonzáles-Mondragón E., Pedraza-Escalona M., Parra-Unda R. and Rodríguez-Romero A. 2011. Crystal structure of Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium* reveals metal-mediated self-assembly. *FEBS Journal*, 278, Págs.3308-3318
- Saxena, G. J. Chen, A. Shalev, 2010. Intracellular Shuttling and Mitochondrial Function of Thioredoxin-interacting Protein *J. Biol. Chem.* Vol. 285. Págs. 3997-4005.
- Scholz T, García HH, Kuchta R, Wiicht B. 2009. Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clin Microbial Rev.* Vol.22. Págs.146-60.
- Smyth, J.D. y D.P. McManus. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Cambridge, UK. Págs. 5-21
- Stadtman, E.R., Levine, R. L. 2000. Protein oxidant. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899. Págs. 199-208
- Thormählen, Ina Arkadiusz Zupok, Josephin Rescher, Jochen Leger, Stefan Weissenberger, Julia Groysman, Anne Orwat, Gilles Chatel-Innocenti, Emmanuelle Issakidis-Bourguet, Ute Armbruster, Peter Geigenberger. 2017. Play a Crucial Role in Dynamic Acclimation of Photosynthesis in Fluctuating Light Original Research Article. *Molecular Plant*, Vol. 10, Num. 9, Págs. 168-182
- Tutkun, E., A. Özden, H. Kumbasar, H.H. Özsan, T. Söylemezoğlu, A. Keskinçe, F. Kosova. 1997. Catalase, glutathion peroxidase, superoxide dismutase and

- tbars status before and after electro convulsive therapy. *Biological Psychiatry*, Vol. 42, Page 875
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohe, R.; Aumann, K. D.; Roveri, A.; Schomburg, D.; Flohe, L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* Vol. 252. Págs.38–53
- Vaca-Paniagua, F. R. Parra-Unda, and A. Landa. 2009, Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*, *Parasitology Research*, vol. 105, no. 3, pp. 781–787
- Van Bladeren, P. J. 2000. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem.Biol. Interact.* Vol. 129. Págs. 61-76.
- Winterbourn, C. C.; Vissers, M. C.; Kettle, A. J. 2000. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* Vol. 7. Págs.53–58
- Wipaphorn Jaikua, Pornanan Kueakhai, Kulathida Chaithirayanon, Rataya Tanomrat, Sirima Wongwairo, Suda Riengrojpitak, Prasert Sobhon, Narin Changklungmoa, 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*, Vol.162, Págs. 75-82.
- Wood Z.A., E. Schroder, J. Robin Harris, L.B. Poole, 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem. Sci.* Vol. 28. Págs. 32-40.
- Yanagida, T., Yuzawa, I., Joshi, D.D., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Kawano, N., Oka, H., Fujii, K., Ito, A., 2010. Neurocysticercosis: assessing where the infection was acquired from. *J. Travel Med.* Vol.17. Págs.206–208.
- Yu, Y., Xing, K.; Badamas, R.; Kuszynski, C. A.; Wu, H.; Lou, M. F. 2013. Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 57. Págs.92–104.

ANEXOS DE SOLUCIONES

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS SDS-PAGE 10X

Tris base	30.30g
Glicina	144.10g
SDS 10%	10g
Aforar a 1Lt	

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS, pH 7.8

K ₂ PO ₄ 50mM	6.80g
-------------------------------------	-------

AMORTIGUADOR TRIS-HCl

Tris (hidroximetil) aminometano 50mM	6.057g
Aforar a 1Lt	

AMORTIGUADOR TRIS-HCl, NaCl 1M

Tris (hidroximetil) aminometano 50mM	6.057g
NaCl 1M	58.4 g
Aforar a 1Lt	

Solución Xantina, 1Lt

C ₅ H ₄ N ₄ O ₂ 0.4mM	0.061g
---	--------