



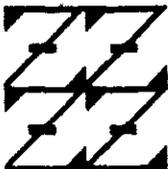
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PURIFICACION PARCIAL DE GLUTATION PEROXIDASA (GSH-Px) DE CISTICERCOS DE Taenia solium.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MA. ANTONIETA REYES ESPINOSA

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: M. en C, AGUSTIN PLANCARTE CRESPO

Handwritten signature

MEXICO, D. F.

2000



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.

DEDICATORIA.

A mis padres Juana y Antonio por la sabia decisión de permitirme nacer y por darme siempre todo su amor y apoyo incondicional. Por haber formado una familia armoniosa, con sus altas y bajas pero al fin una buena familia que nos permitió crecer llenos de amor.

A mis hermanos Irene, Verónica, Gabriel, Norma y Alicia, por su cariño y ayuda incondicional, sin la cual yo no hubiera podido llegar.

A mis sobrinos Julio, Gabriel, Víctor, Andrea, Fernando, Mohacid, Antonio, Saúl y Miguelito porque siempre han sido la alegría de mi vida.

A Francisco por ser una de las personas más importantes de mi vida y porque sin reservas ha compartido conmigo la suya.

A la familia Herrera Vigenor por brindarme su amistad.

A mis amigos Ceci, Joel, Flor, Laura, Isa, Lulú, Chela y Landy por brindarme su amistad y compartirla conmigo en todo momento.

A todos los profesores que han estado presentes a lo largo de mi vida escolar porque han puesto su granito de arena en mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios porque me ha dado vida y salud, una hermosa familia, amistades y un hombre maravilloso con quien compartirlas y por si eso fuera poco la oportunidad de llegar hasta donde me encuentro.

A Agustín Plancarte por haberme aceptado como parte de su equipo de trabajo y por compartir conmigo sus conocimientos, su experiencia, su amor por la investigación y su amistad.

A Guille, Pablo y Mayra por su amistad y sus consejos.

A la Dra. Ma Teresa Rabiela por sus acertados consejos.

A Baldra, Rosa, Araceli y Lilia por compartir sus conocimientos, su experiencia y también su amistad.

A la Dra. Regina Montero porque sin su ayuda no hubiera podido llevarse a cabo una parte muy importante del presente trabajo.

A la Dra. Patricia del Arenal y a la Biol. Ma. Esther Rubio, por su asesoría técnica.

Al Sr. José por su ayuda en la obtención del material fotográfico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al CCH oriente (a mucha honra), a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Facultad de Medicina, por ser orgullosamente Universitaria.

*Este trabajo fue desarrollado en el
Departamento de Microbiología y Parasitología
de la Facultad de Medicina, UNAM.*

ABREVIATURAS.

Ac	Anticuerpo.
AE	Actividad enzimática.
Ag	Antígeno.
BP	Bandas protéicas.
°C	Grados celsius.
g	Gravedad (es).
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GSH-Px	Glutación peroxidasa.
GSSG	Glutación oxidado.
GST	Glutación s-transferasa.
IET	Inmunoelctrotransferencia.
kDa	Kilodalton.
M	Molaridad.
mA	Miliamperes.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
µM	Micromolar.
ME	Mezcla de ensayo.
ml	Mililitros.
mM	Milimolaridad.
nm	Nanómetros.
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PHGSH-Px	Glutación peroxidasa fosfolípido hidroperoxidasa.
PM	Peso molecular.
S	Siemens
SNC	Sistema Nervioso Central.
Sn	Sobrenadante.
SOD	Superóxido dismutasa.
U	Unidades enzimáticas.
V	Volts.

INDICE.

Resumen.	1
1. Introducción.	3
2. Fundamentación teórica.	7
2.1. Ciclo biológico.	7
2.2. Morfología del parásito.	8
2.3. Epidemiología.	12
2.3.1. Teniosis.	12
2.3.2. Cisticercosis.	13
2.4. Cestodos y evasión inmune.	15
2.5. Radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno.	17
2.6. Producción biológica de las especies reactivas de oxígeno.	18
2.7. Las especies reactivas de oxígeno y los parásitos.	21
2.8. Enzimas inactivadoras de especies reactivas de oxígeno.	22
2.9. Glutatión peroxidasa: una selenoenzima.	26
2.9.1. Propiedades bioquímicas de GSH-Px.	27
2.9.2. La reacción enzimática de GSH-Px.	28
2.9.3. Mecanismo de acción de GSH-Px.	29
2.9.4. Estabilidad de GSH-Px.	30
2.9.5. Especificidad de GSH-Px hacia GSH como donador de electrones.	30
2.9.6. Especificidad de GSH-Px hacia su sustrato.	31
2.10. Glutatión peroxidasa selenio independiente (Glutatión-S-transferasa).	32
3. Planteamiento del problema.	33

4. Objetivos.	34
5. Hipótesis.	35
6. Diseño de investigación.	35
7. Metodología.	36
7.1. Obtención de cisticercos.	38
7.2. Solubilización de las proteínas de los cisticercos.	38
7.3. Purificación de GSH-Px a través de columnas cromatográficas.	39
7.4. Determinación de la actividad enzimática.	41
7.5. Análisis de las muestras por PAGE-SDS.	42
7.6. Visualización de GSH-Px en PAGE-nativa.	43
7.7. Electroelución y análisis de GSH-Px.	44
7.8. Producción de anticuerpos de conejo anti- GSH-Px.	45
7.9. Preparación de la membrana para la evaluación de Ac.	46
7.10. Análisis de los anticuerpos anti- GSH-Px.	46
7.11. Purificación de huevos de <i>T.taeniaeformis</i> .	47
7.12. Ensayo de la capacidad protectora de GSH-Px de <i>T.solium</i> .	48
8. Resultados.	49
9. Discusión de resultados.	77
10. Conclusiones.	82
11. Propuestas y recomendaciones.	83
12. Anexos.	84
13. Bibliografía.	108

RESUMEN.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como anión superóxido, radical perhidroxilo, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo se forman durante el metabolismo celular y en fagocitos activados. Las ERO son altamente reactivas con las moléculas biológicas porque les extraen con facilidad electrones, alterando su estructura y función además de provocar en el sitio inicial de interacción una reacción en cadena oxidoreductiva. Aunque todas las biomoléculas (lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas) son capaces de reaccionar con los radicales de oxígeno, parece que los lípidos son los más susceptibles, por lo que las membranas son las más expuestas a sufrir daños.

En respuesta probablemente a la gran reactividad de las ERO, los seres vivos cuentan con una serie de enzimas antioxidantes. Dentro de los parásitos se ha observado que tanto en helmintos como en protozoarios existen algunas de estas enzimas tales como Superóxido dismutasa, Glutación-S-transferasa, Catalasa y Glutación peroxidasa e incluso éstas moléculas se han relacionado con mecanismos a través de los cuales los parásitos logran evadir el sistema inmune del hospedero.

En el presente trabajo se purificó parcialmente a GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* extraídos de carne de cerdo infectada, para ello se estandarizó un procedimiento de purificación bioquímico. Las proteínas de los cisticercos fueron solubilizadas en sales y después de centrifugaciones y diálisis subsecuentes, el sobrenadante se hizo pasar por diversas columnas cromatográficas líquidas, con resinas de QAE-Cellex, Fenilsefarosa CL-4B y Sefadex G-200; el análisis de las

fracciones por PAGE- SDS mostró que las columnas fueron concentrando la actividad enzimática para GSH-Px hasta una fracción compuesta de aproximadamente 6 diferentes bandas protéicas con pesos moleculares de 30-70 kDa (Sn5); dicha actividad fue determinada realizando el ensayo de Paglia y Valentine (1967) en las diferentes fracciones de las columnas cromatográficas.

El Sn5 fue sometido a electroforesis en geles nativos para visualizar la actividad enzimática específica, con la banda con actividad se obtuvieron anticuerpos de conejo que revelaron el reconocimiento hacia bandas correspondientes a albúmina de cerdo y hacia una proteína de ~30 kDa.

Las bandas con actividad de 4 geles nativos fue sometida a electroelución y después analizada por PAGE-SDS, revelando una proteína de ~30 kDa.

Por otro lado, fue necesario eliminar la posibilidad de estar detectando Catalasa en lugar de GSH-Px, por lo que se realizó el ensayo de Paglia y Valentine (1967), pero con Catalasa de *A. niger*, sin embargo no se detectó actividad; este resultado fue corroborado con anticuerpos anti GSH-Px de cisticercos de *T. solium*, que no reconocieron a Catalasa.

La capacidad protectora de esta fracción se evaluó utilizando el modelo *Taenia taeniaeformis*-rata, obteniéndose 65 y 72% de protección. Esto permite concluir que GSH-Px está presente en los cisticercos de *Taenia solium* y es una buena candidata como probable vacuna.

1. INTRODUCCION.

Taenia solium es un cestodo parásito del hombre y del cerdo, sus larvas o cisticercos se desarrollan en sus tejidos produciéndoles la cisticercosis. Particularmente en el hombre la enfermedad es grave cuando los parásitos se sitúan en su tejido nervioso central y le ocasionan neurocisticercosis (NC) (Dixon y col. 1961, Raviela y cols. 1979). En el cerdo con cisticercosis los problemas se presentan por un lado, al decomisar la carne infectada con las consecuentes pérdidas económicas para el porcicultor, y por el otro al ser este huésped el reservorio natural del gusano es por lo tanto un eslabón para mantener su ciclo biológico (Flisser y cols. 1993 y 1997).

El otro eslabón de *T. solium* es el hombre teniásico, que desarrolla la fase adulta en su intestino por comer carne de cerdo mal cocida e infectada con cisticercos, este individuo diariamente libera con sus heces un promedio de 50,000 huevos de *T. solium*, contaminando el medio ambiente; de esta forma, los huevos del parásito que sean ingeridos por nuevos huéspedes se desarrollarán en cisticercos (Flisser, 1990, Sartí, 1997 B).

La NC es una enfermedad común en países en vías de desarrollo como Asia, Africa y América Latina (Fliser y cols. 1991, 1997) pero también es cada vez más frecuente en algunos países desarrollados, tan sólo en los Estados Unidos se diagnostican más de 1000 nuevos casos al año (Schantz y cols. 1992; White, 1997), no obstante, es difícil establecer la verdadera morbilidad de este padecimiento ya que tiene como características el pasar desapercibida y ser crónica. Sólo el 50 % de los casos de autopsias del Hospital General de la ciudad de México, con cisticercosis cerebral

correlacionaron con algún síntoma clínico neurológico asociado con el parásito (Rabiela y cols. 1979). Por otro lado se sabe que soldados ingleses transferidos a la India adquirieron la cisticercosis y que el tiempo promedio transcurrido para que presentaran síntomas neurológicos fue de 4.8 años en un rango desde pocos meses hasta 30 años (Dixon y col. 1961). Evolutivamente, esto refleja una gran adaptación tanto por el huésped como por el parásito, en donde este último debe de desarrollar mecanismos de evasión inmune para poder sobrevivir en huéspedes inmunológicamente competentes. Dentro de la diversidad de estos mecanismos se tienen aquellos donde por ejemplo, las larvas de *Schistosoma mansoni* se mimetizan al recubrir sus membranas con antígenos de los grupos sanguíneos y de histocompatibilidad del hombre (Smithers y col. 1976), también se sabe del uso de proteasas parasitarias producidas por algunos cestodos que hidrolizan anticuerpos y otras moléculas citotóxicas producidas por los leucocitos de los huéspedes (Eckert, 1991). La producción de células supresoras estadio específicas en esquistosomiasis y filariasis permite abatir la respuesta inmune contra ellos (Piessens y cols. 1980), la existencia de inhibidores de tripsina y quimotripsina sintetizados por diversos parásitos tienen amplios efectos sobre la funcionalidad celular inflamatoria (Nemeth y col. 1981). Otra forma de evadir la respuesta del huésped por parte de los parásitos, es inactivando diversas moléculas involucradas en los mecanismos de protección en los primeros días después de la infección, por ejemplo, *T. taeniaeformis* presenta factores anticomplementarios en su superficie los cuales consumen al componente C3 del complemento (Hammemberg y col. 1978), así mismo este parásito produce una molécula denominada teniastatina que inhibe al C3 y al factor D de la

cascada alterna del complemento (Suquet y cols. 1984). Además, cisticercos de *T. solium* producen el antígeno B que se une al C1q e inhibe la vía clásica del complemento (Laclette y cols. 1992). Estos mismos cisticercos sintetizan también un factor inespecífico que anula la producción de diversas citocinas linfocitarias (Arechavaleta y cols. 1998).

Por otro lado, los macrófagos polimorfonucleares, eosinófilos y plaquetas tienen la capacidad de responder contra los parásitos produciendo diversas especies reactivas de oxígeno (ERO) durante la explosión respiratoria (ER), por medio de reducciones secuenciales de estas moléculas hasta formar agua. En esta reacción en cadena se generan las ERO primarias como los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo (HO^{\bullet}) que al interactuar con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dan lugar a las ERO secundarias y terciarias como hidroperóxidos alquilados y peróxidos lipídicos, más dañinos sobre las biomoléculas que los anteriores (Fantone y col. 1982, Birnboim y col, 1985, Hyslop y cols. 1988, Sacks y cols. 1978). Sin embargo, este evento no es capaz de eliminar a los parásitos como cabría de esperarse (Adams y col. 1984), se sabe que al menos siete diferentes especies de protozoarios y once de helmintos escapan del daño producido por las ERO; inclusive, la ausencia de enzimas antioxidantes, como la catalasa, se ha asociada a daño (Callahan y cols. 1988).

Por diversas razones no esclarecidas los ténidos logran superar el efecto de las ERO durante el proceso de infección que dura horas, permitiendo a las oncosferas fijarse en alguna parte del cuerpo y continuar su crecimiento hasta desarrollarse en cisticercos y no desplazarse más.

En la mayoría de los casos de cisticercosis humanas, porcinas y murinas con períodos de varios meses o años de convivencia huésped-parásito, se han encontrado células mononucleares, polimorfonucleares y eosinófilos además de linfocitos, alrededor de los parásitos (Aluja y cols. 1989, González y cols. 1967, Ansari y col. 1976). Estas células probablemente están produciendo activamente diversas moléculas, entre ellas las ERO y el hecho de que los parásitos puedan sobrevivir por tanto tiempo tal vez sea debido a que contienen enzimas antioxidantes.

El propósito del presente trabajo fue purificar parcialmente la enzima Glutación peroxidasa de cisticercos de *Taenia solium* y evaluar su capacidad protectora en el modelo *Taenia taeniaeformis*-rata.

2. FUNDAMENTACION TEORICA.

2.1. Ciclo biológico.

El ciclo de vida de *Taenia solium* se lleva a cabo en dos huéspedes: el cerdo o huésped intermediario por presentar cisticercos en sus tejidos y el hombre o huésped definitivo por alojar en su intestino a la forma adulta del parásito; sin embargo, el hombre puede convertirse también en huésped intermediario sin gran sentido biológico. La cisticercosis se ve favorecida por la convivencia con personas portadoras de *Taenia solium*, aunque también puede ser factor de riesgo el consumo de alimentos o agua contaminados con huevos de este parásito

El humano adquiere la teniosis cuando consume carne de cerdo mal cocida y parasitada con cisticercos. Aproximadamente cuatro meses después, comienza a liberar segmentos del parásito o proglótidos junto con su excremento. Cada proglótido puede contener de 50,000 a 60,000 huevos. Cuando el cerdo consume las heces de una persona con teniosis, desarrolla la cisticercosis (Romero,1993; Sartí 1997 B)(fig. 1).

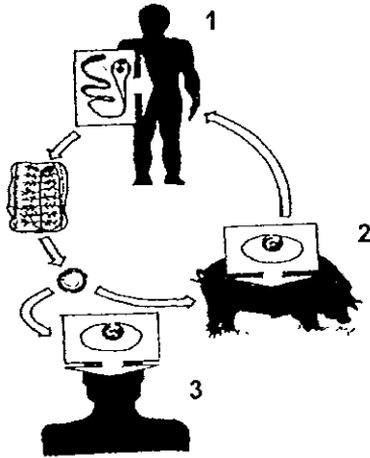


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium* 1) Huésped definitivo, 2) Huésped intermediario, 3) Huésped incidental. (Flisser y cols. 1997).

2.2. Morfología del parásito.

En el estadio adulto, *T. solium* es un gusano plano, formado por escólex, cuello y estróbilo, el escólex está constituido por cuatro ventosas y un rostelo que posee una doble corona de ganchos, la interna está compuesta de 11 a 14 ganchos largos (0.13 - 0.16 mm), y la externa de igual número pero más pequeños (0.1- 0.12 mm) (fig. 2) (Yoshino, 1933). El estróbilo mide de 2 a 7 m de longitud y está dividido en segmentos llamados proglótidos, estos se clasifican de acuerdo al grado de madurez, así, los más cercanos al cuello son pequeños e inmaduros y todavía no tienen desarrollados los órganos sexuales; unidos a estos se encuentran los maduros, con órganos sexuales desarrollados y finalmente los grávidos, portadores de los huevos del parásito (fig. 3).

Los huevos (fig. 4) poseen varias envolturas que posibilitan la sobrevivencia de la oncosfera en el medio; la envoltura más externa es el vitelo o cápsula, la siguiente envoltura es el embrióforo, formado por pequeños bloques protéicos unidos entre sí por un material cementante, esta envoltura además de ser la más importante en la protección de la oncosfera confiere a los huevecillos su apariencia estriada característica. El embrióforo a su vez es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embrioforesal; finalmente la membrana oncosferal rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto que posee tres pares de ganchos.

Por sus características hermafroditas cada proglótido cuenta con órganos sexuales tanto masculinos como femeninos; el aparato reproductor masculino está formado por numerosos testículos, conectados a través de túbulos finos a un espermoducto enrollado, que finaliza en una estructura muscular copulatoria llamada cirro. En el poro genital desembocan el espermoducto y la vagina, la cual recibe y conduce a los espermatozoides al receptáculo seminal, que a su vez se conecta con el oviducto. Hacia éste último son liberados los óvulos producidos por el ovario, que está formado por dos lóbulos grandes y uno pequeño, llevándose a cabo la autofertilización (fig. 5). Posteriormente, el huevo viaja a través de la apertura del conducto vitelino donde se recubre de células vitelinas y entra al ootipo que es una región bulbosa del oviducto que contiene glándulas, cuyas secreciones mucosas probablemente sirvan como sustratos para el embrióforo (Flisser y cols. 1997).

. Los huevos se acumulan en el útero, donde maduran y se vuelven infectivos; cabe mencionar que el útero ocupa una región central dentro del proglótido y de él salen ramas, cuyo número es característico de cada especie, siendo para *T. solium* 12 o menos y para *Taenia saginata* más de 12 (Romero, 1993).

El cisticerco o forma larvaria del parásito, es una estructura esférica u ovalada con una envoltura formada por una delgada membrana blanca nacarada u opalescente llena de líquido, conteniendo principalmente porfirinas; el escólex es fácilmente observable como un gránulo excéntrico a través de la membrana translúcida.

En la neurocisticercosis, es decir, cuando el parásito se aloja en el cerebro, los cisticercos de *T. solium* puede ser celulosos, racemosos o tener una forma intermedia entre ambos, el celuloso puede medir entre 0.5 a 2 cm y es semejante al encontrado en el cerdo, mientras que el racemoso es un parásito grande que puede llegar a medir más de 10 cm (Rabiela y cols. 1982), su membrana es multifibulada y su escólex se encuentra degenerado o no existe (fig. 6).

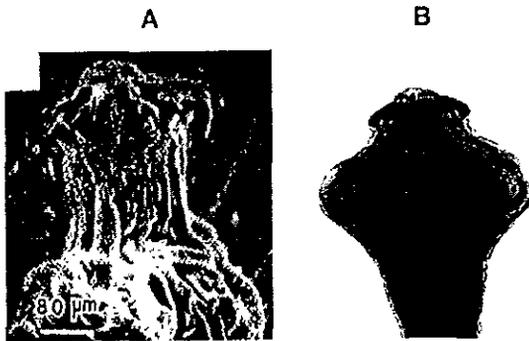


Figura 2. Escólex de un cisticerco de *T. solium* observado con microscopio electrónico de barrido (A) (Cañedo y cols. 1982) y con microscopía de luz (B), en donde se observan claramente la doble corona de ganchos y las 4 ventosas.

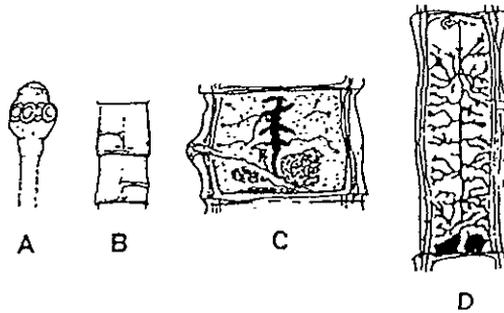


Figura 3. Representación esquemática de los tres diferentes tipos de proglótidos de *T. solium*; A: escólex, B: proglótido inmaduro, C: proglótido maduro, D: proglótido grávido, (Goldsmith y col. 1995).



Figura 4. Huevos de *Taenia* sp. observados mediante microscopía de luz (Flisser y cols. 1997).

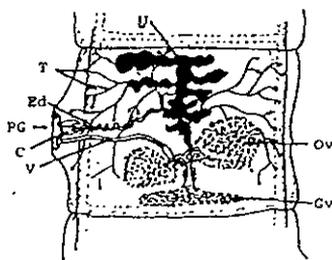


Figura 5. Representación esquemática de un proglótido maduro de *T. solium* donde es posible observar abundantes testículos pequeños (T), espermoducto enrollado (Ed), poro genital (PG), círo (C), vagina (V), ovario trilobulado (Ov) y glándula vitelógena (GV), (U) útero, (Goldsmith y col. 1995).

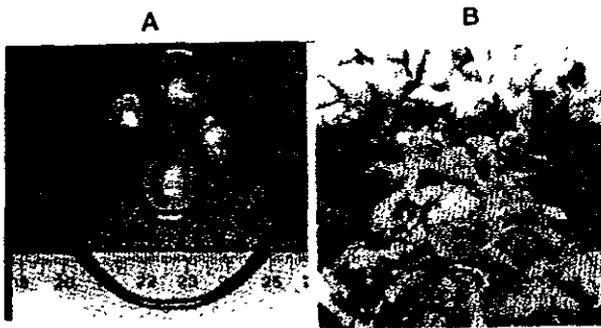


Figura 6. Cisticercos de tipo celuloso (A) y de tipo racemoso (B)
(Flisser y cols. 1997).

2.3. Epidemiología.

2.3.1. Teniosis.

La teniosis es cosmopolita, generalmente benigna por presentar escasos síntomas tales como constipación, diarrea, falta de apetito y en algunas ocasiones dolores estomacales leves.

En estudios epidemiológicos realizados en algunos países de América Latina se ha encontrado que en los últimos treinta años Colombia y Haití son los países con frecuencias más altas de teniosis por año, mientras que Costa Rica es lo opuesto. En cuatro comunidades de Guatemala (Quesada, El tule, El Jocote y Santa Gertrudis), se analizaron muestras colectadas entre los años de 1991 y 1994 y se encontraron 92 casos positivos de 3399 muestras estudiadas, lo cual representa el 2.7% y el 98% de los parásitos recuperados fueron *T. solium*, también se encontró una frecuencia de 5% en niños cuyas edades fluctuaban entre meses y 4 años de edad.

En México prevalecen frecuencias de teniasis de 0.2 a 1.1% en el periodo de 1970 a 1971, en 1984 el 1.0% y en 1989 de 3.4%, detectándose que para *T. solium* correspondía el 1.1% (Sartí, 1997 B). Estadísticas oficiales han reportado que de 1986 a 1990 existían 13 000 casos anuales y a partir de 1991 esta cifra ha disminuido a cerca de 800 casos de *Taenia sp* en el mismo periodo (Sartí, 1997 A).

2.3.2. Cisticercosis.

La cisticercosis humana puede llegar a ser una enfermedad severa, incapacitante y en ocasiones fatal. Aunque los cisticercos pueden ubicarse en cualquier tejido se ha observado que existen ciertos lugares preferenciales, como músculo esquelético, ojo y sistema nervioso central (SNC), siendo este último el de mayor importancia en salud. En América Latina es más frecuente encontrar en SNC, mientras que en países asiáticos se localizan tanto en SNC como en músculo (Flisser, 1990; Flisser y cols. 1991; Rabiela y cols. 1982). Estadísticas oficiales actuales establecen que existe un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100 000 habitantes, no existiendo diferencias en cuanto a sexo y el grupo que aparece como el más afectado es el de 15 a 44 años de edad, es decir, personas económicamente productivas (Sartí, 1997 A).

En algunos países donde la cisticercosis no era endémica, se han presentado números crecientes de casos, esto ocasionado por la migración de personas de los lugares donde la enfermedad está ampliamente distribuida, siendo considerada como una enfermedad emergente (OPS, 1997; Schantz y cols. 1992; White, 1997).

Esta zoonosis está íntimamente relacionada con la poca o nula educación en cuestiones de salud, ya que los individuos afectados desconocen de que manera se lleva a cabo la transmisión de esta enfermedad, aunado a esto, las bajas condiciones higiénicas, como el no contar con letrinas o baños bien establecidos ni con agua corriente, así como la práctica de fecalismo al aire libre y el riego de hortalizas con aguas negras favorecen la adquisición de la enfermedad (Flisser, 1990; Sartí, 1997 B).

En nuestro país incluso se han creado normas para tratar de lograr un control eficiente de la enfermedad (NOM, 1994).

Los cisticercos de *Taenia solium* son capaces de sobrevivir en el tejido de su hospedero ya sea el intermediario o el definitivo por períodos largos de tiempo e incluso el individuo permanecer asintomático o presentar síntomas muchos años después de haber adquirido la enfermedad (Dixon y col.1961, Lacleite y cols. 1992, Fliser y cols. 1993), esto ha hecho pensar que las larvas cuentan con sistemas que les ayuden a evadir la respuesta inmune del hospedero como se ha visto en otros parásitos.

2.4. Céstodos y evasión inmune.

Diversos cestodos han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune de sus huéspedes. Esto les ha permitido sobrevivir en ellos por períodos largos inclusive en individuos inmunológicamente competentes. En *T. solium* se tienen algunas evidencias que sugieren que los cisticercos pudieran estar evadiendo la respuesta inmune tanto del cerdo como del hombre:

- a) Moléculas del huésped en la superficie del parásito. En cisticercos extraídos de pacientes enfermos se ha observado que en su superficie se encuentran inmunoglobulinas de la clase IgG, IgM e IgA, debido a que el parásito cuenta con receptores para Fc. Sin embargo no se observa un 100% de correlación entre los anticuerpos encontrados en los sueros de los pacientes a los cuales se les extrajeron los cisticercos y las inmunoglobulinas adheridas al mismo. También se ha detectado C3b en el tegumento parasitario aparentemente sin producirle daño. (Correa y cols. 1985; Flisser y cols. 1986).

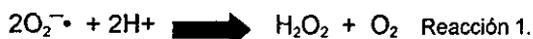
- b) Sitios inmunológicamente privilegiados. En diversos cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium* se ha observado que los cisticercos del sistema nervioso central se encuentran sin daño, y prácticamente sin ninguna célula de la respuesta inflamatoria que los rodee en comparación con cisticercos del mismo cerdo pero de tejido muscular (Aluja y cols. 1989).

- c) Antígenos inmunodominantes inocuos. El antígeno B de cisticercos de *T. solium* por ser un antígeno de secreción e inmunodominante podría "distraer" a los anticuerpos del huésped fijándolos lejos de él, volviéndolos ineficientes, (Correa y cols. 1989) .
- d) Factores anticomplementarios. La teniastatina es una glicoproteína de *Taenia taeniaeformis* que inhibe la activación del complemento por sus dos vías, así como un glucosaminoglicano polisulfatado que interfiere con la actividad lítica del complemento (Clinton y cols. 1997; Suquet, 1984).
- e) Producción de prostaglandinas. La prostaglandina E2 inhibe la generación de citocinas por las células T cooperadoras, estas moléculas han sido aisladas de fluidos de excreción / secreción de cisticercos de *T. taeniaeformis* (Clinton y cols. 1997).
- f) Presencia de enzimas que inactivan especies reactivas y radicales libres de oxígeno. Superóxido dismutasa, Glutatión-S-transferasa, Glutatión peroxidasa y Catalasa son algunas enzimas que participan en la hidrólisis de diversos compuestos tóxicos derivados del oxígeno que se generan durante la estimulación inmunogénica de células de la respuesta inflamatoria (Callahan y cols. 1988).

2.5. Radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno.

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado, pueden ser considerados como fragmentos de moléculas, las cuales son generalmente muy reactivas. El reactivo más importante en la bioquímica de los radicales libres es el oxígeno y sus radicales derivados (radicales superóxido e hidroxilo) y peróxido de hidrógeno (Cheeseman y cols. 1993).

El radical superóxido aunque es un radical libre de oxígeno, no es particularmente dañino, su importancia estriba en que puede ser fuente de H_2O_2 (reacción 1) y como agente reductor de iones de metales de transición; a valores bajos de pH, puede protonarse para formar el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) que es más reactivo, pero a pH fisiológico no más del 1% se encuentra en forma protonada.



El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se encuentra dentro de la categoría de "Especies Reactivas de Oxígeno" (ERO), aunque no es un radical libre, es un compuesto muy importante en la bioquímica de los radicales libres porque puede descomponerse fácilmente en presencia de iones metálicos de transición, para producir el más reactivo y dañino de los radicales libres de oxígeno: el radical hidroxilo $^{\bullet}OH$ (Reacción de Fenton, reacción 2).



2.6. Producción biológica de las Especies Reactivas de Oxígeno.

Las especies de oxígeno altamente reactivas son producidas durante el metabolismo celular normal, por algunos medicamentos antiparasitarios y especialmente por fagocitos activados (fig. 7).

La producción de ERO en los fagocitos se lleva a cabo de la siguiente manera:

Anión superóxido: la fuente más importante de producción de este ERO *in vivo* es cuando ocurre un aumento súbito en el consumo de oxígeno de las células fagocitarias que son activadas al entrar en contacto con partículas extrañas (Zagoya y cols. 1995). Estas células tienen en la membrana citoplásmica un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa, que cataliza la reacción de formación del ion superóxido (reacción 3).



El fagocito en su citoplasma cuenta con la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la reacción de formación de H_2O_2 (reacción 4).



La enzima mieloperoxidasa de los fagocitos utiliza al peróxido de hidrógeno para transformar los halogenuros en hipohalogenuros (reacción 5 y 6):



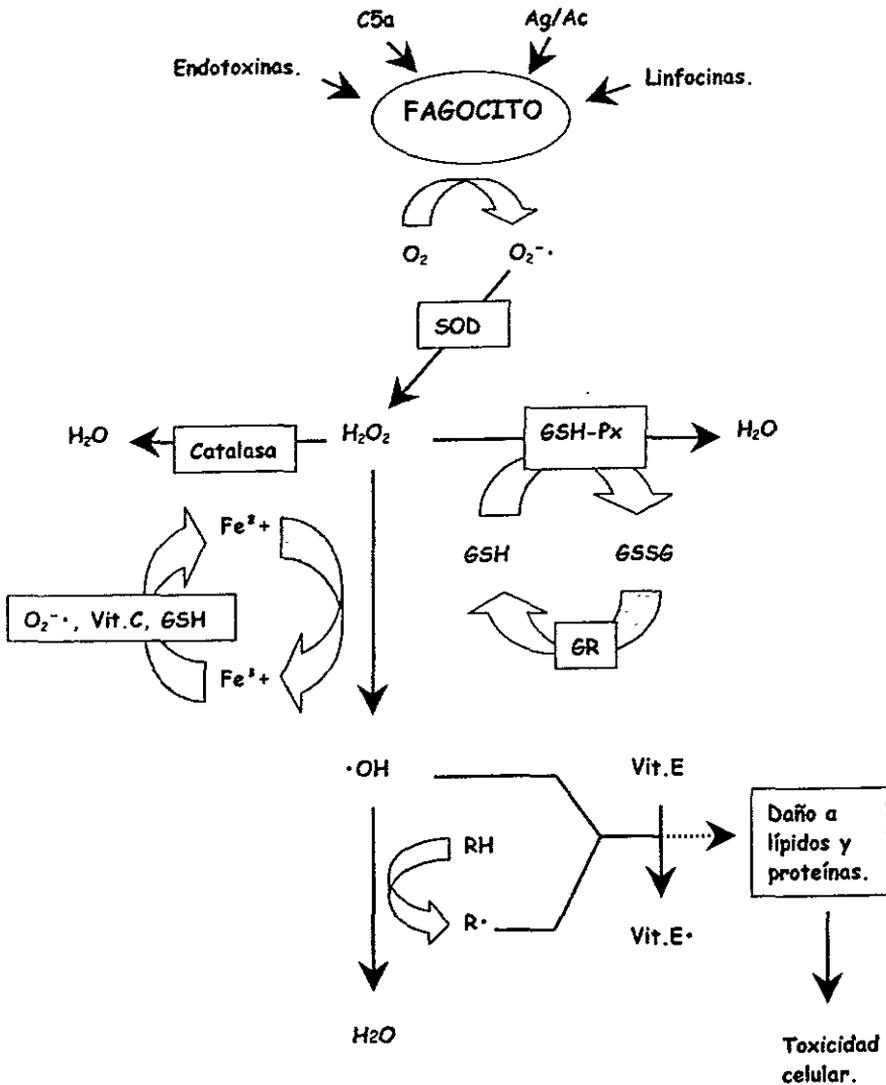


Figura 7. Formación y detoxificación de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos. $O_2^{\cdot-}$, superóxido; SOD, Superóxido dismutasa; GSH, Glutatión reducido; GSSG, Glutatión oxidado; GSH-Px, Glutatión peroxidasa; GR, Glutatión reductasa; $\cdot OH$, Radical hidroxilo; $R\cdot$, Radical secundario (Clarck y cols. 1986).

2.7. Las Especies Reactivas de Oxígeno y los parásitos.

Los radicales libres son muy reactivos con las moléculas biológicas, al removerles un electrón en forma de átomos de hidrógeno. Esto altera la estructura y la función de las moléculas adyacentes, convirtiéndose en radicales libres que destruyen su entorno. Este proceso afecta a lípidos, proteínas y carbohidratos, la reacción en cadena finaliza al aparecer una molécula, que al haber perdido un electrón, la energía del electrón remanente es distribuída en varios sitios dándole estabilidad por resonancia.

Aunque todas las biomoléculas pueden ser atacadas por los radicales libres, los lípidos son probablemente los más susceptibles, las membranas celulares son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) que son los más atacados por estas especies, ocurriendo una peroxidación lipídica. La oxidación de los AGPs genera un radical de ácido graso ($L\cdot$), que rápidamente capta oxígeno para formar el radical peroxilo del ácido graso ($LOO\cdot$), éste radical puede oxidar a otros ácidos grasos y comenzar una reacción en cadena, produciendo peróxidos lipídicos que pueden romperse y producir aún más radicales y otros compuestos, principalmente aldehídos biológicamente activos (fig. 8) (Cheeseman y col. 1993), éstos son mucho más estables y pueden causar daño aún a cierta distancia del sitio de generación del radical (Clarck y cols. 1986).

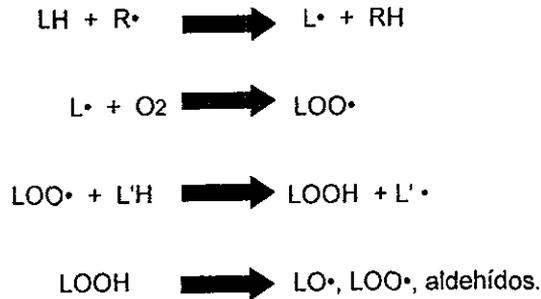


Figura 8. Reacción en cadena de la oxidación de lípidos por radicales libres.

Por esta razón los radicales libres pueden interaccionar con los lípidos de las membranas del parásito, iniciando la peroxidación lipídica y causando la descarga de hidroperóxidos lipídicos y carbonilos citotóxicos en las células del parásito, sin embargo este responde con la producción de enzimas para inactivar las especies reactivas de oxígeno (fig. 9) (Brophy y cols. 1992).

2.8. Enzimas inactivadoras de Especies Reactivas de Oxígeno.

Las enzimas son catalizadores proteínicos para las reacciones bioquímicas, cada enzima cataliza un pequeño número de reacciones y frecuentemente sólo una. Las enzimas son así catalizadores altamente específicos de las reacciones (Murray, 1988). La eficacia catalítica de las enzimas es de 10^6 a 10^{12} mayor que la de reacciones no catalizadas; aceleran sus reacciones a temperaturas menores a $100\text{ }^\circ\text{C}$ y a pH cercanos a la neutralidad, mientras que los catalizadores químicos frecuentemente requieren altas temperaturas y presiones, así como pH's extremos (Díaz, 1995).

De acuerdo a las reacciones que catalizan pueden clasificarse en oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Se ha observado que ciertos parásitos cuentan con más de una enzima anti-oxidante (Tabla I), pudiendo tener gran importancia en la protección de éstos frente a la respuesta inmune del hospedero (Callahan y cols. 1988), tales enzimas son:

- a) Superóxido dismutasa: esta es una metaloenzima que puede contener cobre o zinc.
- b) Glutación- S-transferasa: cataliza la conjugación de glutación a compuestos hidrofóbicos con centros electrofílicos.
- c) Glutación peroxidasa: esta enzima actúa sobre peróxido de hidrógeno, el cual es producido por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y plaquetas, cuando ocurre el estallido respiratorio.
- d) Catalasa: su actividad también está enfocada a la eliminación de H_2O_2 .
- e) *Peroxidoxinas: a diferencia de las anteriores éstas no cuentan con iones metálicos en su sitio activo, pero en su mecanismo catalítico se encuentra involucrada una cisteína en posición 47 que está altamente conservada (McGonigle y cols. 1998).*

HELMINTOS.	SOD (U/mg).	CATALASA (U/mg).	GSH-Px (mU/mg).
<i>Trichinella spiralis.</i>			
Larva recién nacida	6.8	0	0
Adulto	19.2	0	16
Larva muscular.	30.8 ó 15 0	0	36
<i>Taenia taeniaeformis.</i>	34.29	ND	ND
<i>Hymenolepis diminuta.</i>			
Adulto.	7.9	0	0
<i>Nippostrongylus brasiliensis.</i>			
Adulto	15.34	1.13	29
<i>Dirofilaria immitis</i>			
Adulto	37.0	0.00001	7 6
Microfilaria	35.2	0.0004	13
PROTOZOARIOS.			
<i>Trypanosoma brucei.</i>			
Extracelular.	4.83	ND	ND
<i>Leishmania donovani.</i>			
Promastigotes.	4.1	0.0009	1
Amastigotes.	12.1	0.0025	17600
<i>Leishmania tropica.</i>			
Promastigotes	6.4	0.00054	0.4
<i>Plasmodium berghei.</i>			
Intracelular	Derivada del huésped.	0	41

ND: No se cuenta con el dato.

0: Baja sensibilidad.

Tabla I. Enzimas antioxidantes de algunos helmintos y protozoarios (Callahan y cols. 1988).

En la tabla 1 no se muestran datos acerca de *Schistosoma mansoni*, sin embargo se ha observado que hay cierta resistencia a las ERO, de acuerdo al estadio del parásito, las actividades específicas de ciertas enzimas como Glutación peroxidasa (GSH-Px), Glutación transferasa (GST), Glutación reductasa (GR) y Superóxido dismutasa (SOD), se ha observado que aparecen en el siguiente orden: Schistosomula < Estadio pulmonar < 2 semanas < 4 semanas < 8 semanas (Nare y cols. 1990).

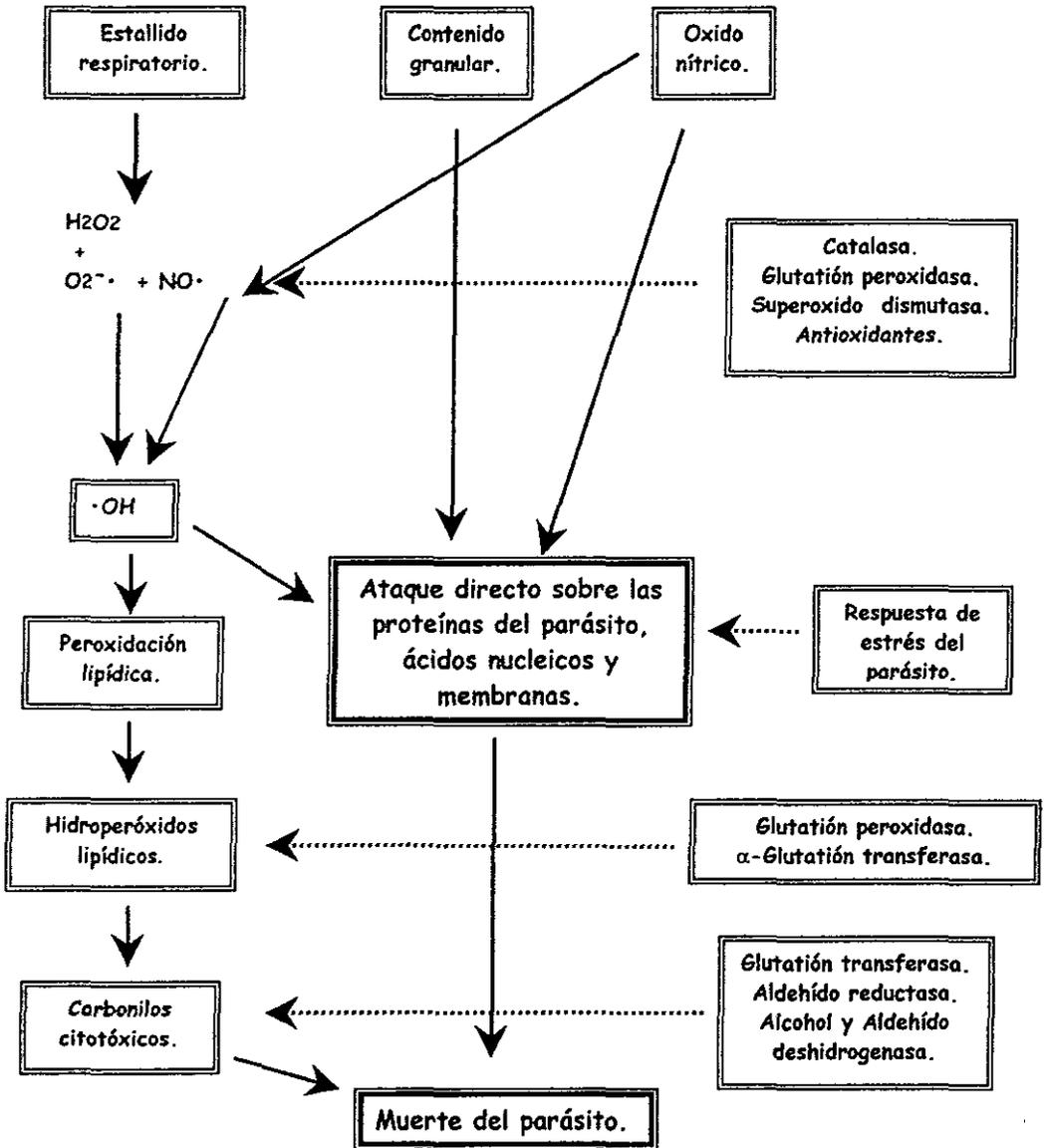


Figura 9. Sistema bioquímico hipotético de la protección que los parásitos helmintos desarrollan en contra la respuesta inmune del huésped (Flechas continuas), mecanismo de defensa del parásito (flechas discontinuas) (Brophy y col. 1992).

2.9. Glutación peroxidasa: una selenoenzima.

La enzima Glutación peroxidasa fue descrita por primera vez por Mills en 1957 (Mills, 1959) en eritrocitos bovinos; la define como una enzima que evita la oxidación de la hemoglobina por H_2O_2 . Demostró que preparaciones parcialmente purificadas de la enzima inhibían la formación de metahemoglobina en hemolisados incubados aerobicamente con ascorbato y atribuye este efecto a la eliminación catalítica del H_2O_2 en presencia de GSH (Flohé, 1988 A).

Existen cuatro tipos de GSH-Px en el hombre, la GSH-Px clásica (E.C. 1.11.1.9) se encuentra en el citosol de varios tejidos y células sanguíneas, reduce peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos, pero no reduce hidroperóxidos fosfolipídicos; GSH-Px plasmática, ahora llamada extracelular, reduce peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos fosfolipídicos, (Saito, 1999); GSH-Px gastrointestinal, es altamente expresada en el epitelio mucoso del tracto gastrointestinal y por último la GSH-Px fosfolípido hidropoxidasa (PHGSH-Px) (E.C. 1.11.1.12), ésta fue descrita por primera vez por Ursini en 1982, se encuentra mayormente en el citosol y parcialmente unida a la membrana, es capaz de reducir hidroperóxidos fosfolipídicos además de peróxido de hidrógeno, (Spallholz, 1990; Ursini, 1995).

2.9.1. Propiedades bioquímicas de GSH-Px.

Los primeros tres tipos de GSH-Px tienen un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, están formadas por cuatro subunidades idénticas de 182 aminoácidos cada una, los monómeros tienen un radio de 19 Å. (Chaudiere y cols. 1983; Tappel, 1978; Wendel, 1981). Cada subunidad está construida por una estructura central de 2 cadenas paralelas y 2 antiparalelas de hojas plegadas, rodeada por 4 α -hélices; una de las hélices corre antiparalela a la cadena β vecina (Wendel, 1981).

Contienen un átomo de selenio por cada subunidad, éste se encuentra unido a una cisteína, es decir, que en lugar de azufre, éste aminoácido contiene un selenio, éste residuo de selenocisteína se encuentra localizado dentro de una concavidad plana, rodeada por residuos de aminoácidos aromáticos y representa el sitio activo; así, cada molécula de GSH-Px contiene 4 selenocisteínas (Flohé, 1988 B; Tappel y cols. 1982) (fig. 10).

La secuencia primaria del sitio activo es Val-Leu-Leu-Ile-Glu-Asn-Val-Ala-Ser-Leu-SeCys-Gly-Thr-Thr-Thr-Arg (determinada en Hígado de rata) (Douglas, 1987).

El pH óptimo es de 8.8 y la temperatura óptima de 42°C (Wendel, 1981).

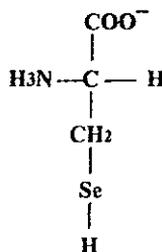


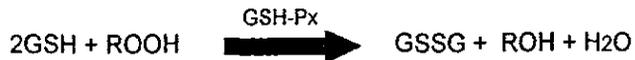
Figura 10. Selenocisteína, el Selenio sustituye al azufre de la cisteína (Lenninger, 1987).

La PHGSH-Px es monomérica, con peso molecular de 20 kDa, contiene un átomo de selenio, difiere de las otras GSH-Px tetraméricas por un alto nivel de actividad hacia fosfolípidos e hidroperóxidos de colesterol, incluso si estos están integrados en las biomembranas (Spallholz, 1990; Roche, 1996). En *S. mansoni* se ha encontrado una PHGSH-Px de 20 kDa en extractos de hembras de parásitos adultos en ensayos de Western blot (Roche, 1996).

2.9.2. La reacción enzimática de GSH-Px.

La acción de la enzima es la protección y detoxificación de biomembranas, evita el daño oxidativo y la acumulación de radicales libres de oxígeno.

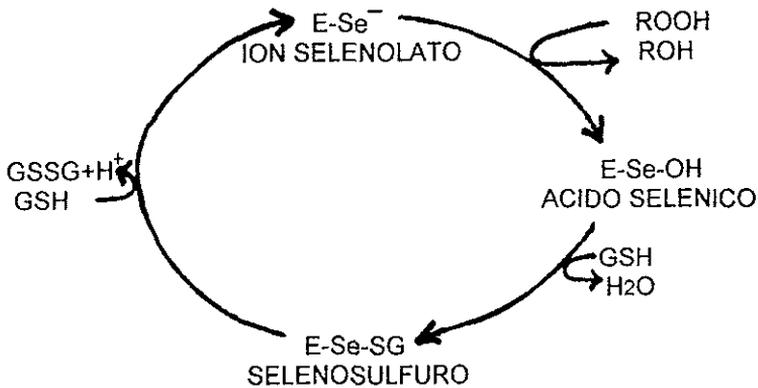
La reacción que cataliza es la siguiente:



2.9.3. Mecanismo de acción de GSH-Px.

El mecanismo de acción propuesto para la catálisis enzimática es el siguiente

(Wendel, 1981):



Este mecanismo es llamado de tipo Ping-Pong, en él, la enzima reacciona con un sustrato para dar una enzima covalentemente modificada y liberar un producto, reaccionando después con un segundo sustrato (Fesht, 1985).

2.9.4. Estabilidad de GSH-Px.

La enzima es relativamente estable en un rango de pH de 7 a 10 en una concentración de 1 mg/ml, como un precipitado en 2.5 mM de fosfato de potasio a pH 7.0, o en estado cristalino en 1.2 M de fosfato de potasio a pH 7.0. Tiende a sufrir autooxidación para dar lugar a formas de diferente estabilidad, pero puede ser reactivada por incubación con GSH (Wendel, 1981).

2.9.5. Especificidad de GSH-Px hacia GSH como donador de electrones.

La especificidad de GSH-Px para utilizar al GSH como donador de electrones es muy alta, ya que con donadores de electrones típicos para hemoperoxidasas tales como o-toluidina, guayacol, pirogalol no presenta ninguna actividad y muy baja actividad frente a tioles diferentes de GSH (Mills, 1959).

Un estudio realizado con 30 tioles y GSH-Px bovina sugiere que los dos grupos carbonilo del GSH están involucradas en la unión del sustrato.

En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de cómo varía la actividad de la enzima en presencia de ciertos análogos de GSH.

ANÁLOGO DE GSH.	ACTIVIDAD CATALÍTICA (%).
Varaciones del residuo γ-glutamil.	
γ -Glu-Cys-Gly (GSH)	100
β -Asp-Cys-Gly.	7.6
Cys-Gly	6.8
N-Ac-Cys-Gly	2.7
Variaciones del residuo glicina.	
γ -Glu-Cys-Gly	100
γ -Glu-Cys-OMe	26
γ -Glu-Cys-NH ₂	1.4

Tabla 2. Algunos ejemplos característicos de oxidación de RSH por H₂O₂ catalizada por GSH-Px bovina (Flohé,1988A).

2.9.6. Especificidad de GSH-Px hacia su sustrato.

En estudios realizados sobre GSH-Px de pulmón de rata se ha encontrado que la enzima presenta especificidad para hidroperóxidos con la estructura general ROOH y su actividad disminuye marcadamente cuando los hidroperóxidos tienen una estructura ROOR.

En la tabla 3 se muestran algunos datos de actividad relativa de la enzima con diferentes sustratos.

SUSTRATO	ACTIVIDAD RELATIVA.
Peróxido de hidrógeno.	100
Hidroperóxido de cumeno.	97
Hidroperóxido de tert-butilo.	84
Lauril-Hidroperóxido.	77
Peróxido de Cumeno.	5

Tabla 3. Algunos datos de actividad relativa de GSH-Px de Pulmón de rata frente a distintos sustratos (Flohé,1988A).

2.10. Glutación peroxidasa selenio independiente (Glutación-S-transferasa).

Existe una enzima que no contiene selenio en su sitio activo llamada Glutación-S-transferasa, ésta es muy específica para sus sustratos, ya que únicamente utiliza hidroperóxidos orgánicos como tales pero no peróxido de hidrógeno, mientras que la selenoenzima es menos específica.

En cuanto a las sustancias inhibitoras, ambas enzimas presentan diferencias, ya que la GSH-Px selenio independiente, no es inhibida por azida ni por incubación con ácido iodoacético 1mM por 10 minutos pero si por cianuro; mientras que GSH-Px selenio dependiente no es inhibida por azida o cianuro, sin embargo es inhibida en más del 90% por incubación con ácido iodoacético 1mM por 10 minutos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A través del tiempo, los parásitos han desarrollado mecanismos para evadir el sistema inmune de su huésped. La presencia de factores anticomplementarios, hidrólisis de inmunoglobulinas, mimetismo molecular y la existencia de enzimas inactivadoras de radicales libres de oxígeno son algunos ejemplos. En la respuesta inmune los fagocitos activados por efecto de la "explosión" respiratoria producen anión superóxido y peróxido de hidrógeno asociado a la destrucción de microorganismos intracelulares. Sin embargo diversas bacterias sobreviven a estas moléculas por presentar enzimas que las inactivan.

Se ha observado que ciertos parásitos, protozoarios y helmintos también cuentan con Catalasa, Superóxido dismutasa y Glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Callahan y cols. 1988), que podrían actuar como parte de los mecanismos de evasión inmune (Mkoji y cols. 1988; Nare y cols. 1990; Seth y cols. 1985).

La GSH-Px se ha identificado en los cisticercos de *T. crassiceps* y *T. taeniaeformis* (Leid en prensa; Moyao, 1991, Rubio, 1997).

Este trabajo tiene como propósito purificar parcialmente por procedimientos bioquímicos la enzima GSH-Px en los cisticercos de *T. solium*.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo General.

Purificar en forma parcial a la GSH-Px de cisticercos de *T.solium* obtenidos de cerdos parasitados.

4.2. Objetivos particulares.

- a) Estandarizar diversas cromatografías líquidas, QAE-Cellex, Fenilsefarosa y Sefadex G-200.
- b) Demostrar la presencia de la enzima en las diferentes etapas de purificación por medio del ensayo enzimático específico de Paglia y Valentine, (PV).
- c) Demostrar en geles nativos de poliacrilamida la banda específica de la GSH-Px empleando el ensayo de PV modificado.
- d) Producir anticuerpos de conejo contra la GSH-Px inmunizando a los animales con la banda reconocida enzimáticamente en los geles nativos, así como con GSH-Px de eritrocitos bovinos.
- e) Demostrar por inmunoblot la especificidad de la reacción entre los anticuerpos del conejo frente a fracciones enriquecidas con la enzima.
- f) Evaluar su capacidad protectora en el modelo *T. taeniaeformis*-rata.

5. HIPÓTESIS.

Los cisticercos de *T. solium* permanecen largos períodos de tiempo en sus huéspedes sin causarles algún daño aparente, por lo que Glutación peroxidasa esta participando en este mecanismo de evasión inmune.

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Población: Cisticercos de *Taenia solium* extirpados de carne de cerdo infectada de forma natural.

Criterios de inclusión y exclusión: Los cisticercos utilizados fueron aquellos en los cuales era posible observar el escólex invaginado dentro de la membrana vesicular, no se utilizaron cisticercos calcificados.

Tipo de estudio: Experimental prospectivo.

Variable independiente: Presencia de la enzima Glutación peroxidasa en los cisticercos de *Taenia solium*.

Variable dependiente: Extracción, purificación, e identificación de Glutación peroxidasa de los cisticercos de *Taenia solium*.

5. HIPÓTESIS.

Los cisticercos de *T. solium* permanecen largos periodos de tiempo en sus huéspedes sin causarles algún daño aparente, por lo que Glutación peroxidasa esta participando en este mecanismo de evasión inmune.

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Población: Cisticercos de *Taenia solium* extirpados de carne de cerdo infectada de forma natural.

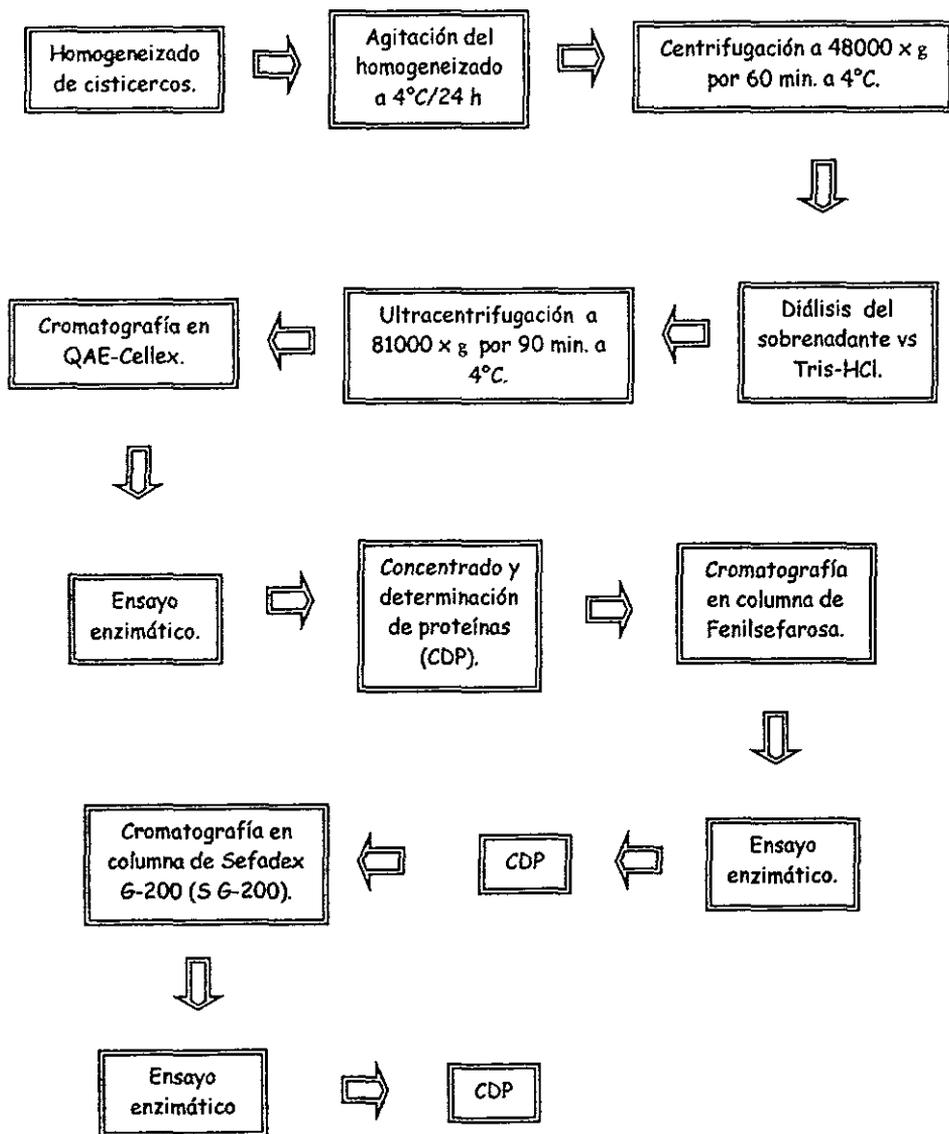
Criterios de inclusión y exclusión: Los cisticercos utilizados fueron aquellos en los cuales era posible observar el escólex invaginado dentro de la membrana vesicular, no se utilizaron cisticercos calcificados.

Tipo de estudio: Experimental prospectivo.

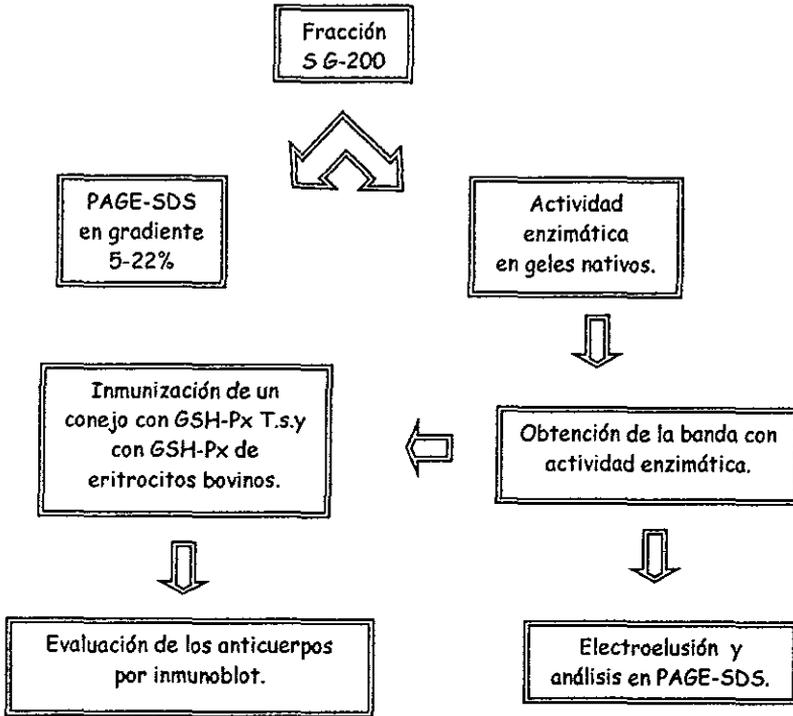
Variable independiente: Presencia de la enzima Glutación peroxidasa en los cisticercos de *Taenia solium*.

Variable dependiente: Extracción, purificación, e identificación de Glutación peroxidasa de los cisticercos de *Taenia solium*.

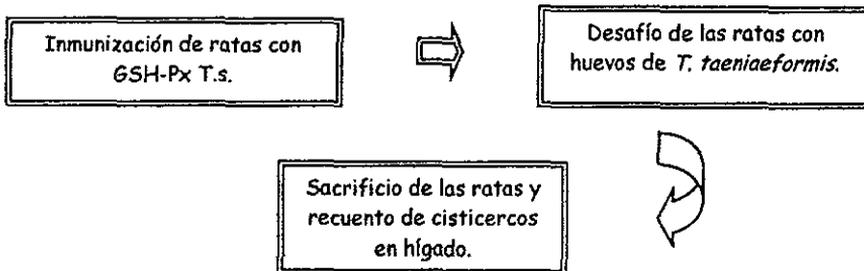
7. METODOLOGIA.



Electroforesis e inmunoblot de la fracción S G-200.



Ensayo de la actividad protectora de GSH-Px T.s.



7.1. Obtención de cisticercos.

Los cisticercos se diseccionaron del músculo esquelético de un cerdo infectado en forma natural con *Taenia solium*. Se eliminó el líquido vesicular y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

7.2. Solubilización de las proteínas de los cisticercos.

Todo el procedimiento de purificación se realizó en dos ocasiones, la diferencia entre ellas fue la cantidad de parásitos utilizada 45 g (lote A) y 161.5g de cisticercos (lote B).

La enzima fue purificada por el método de Leid y col. (en prensa) con algunas modificaciones, 45 g de cisticercos se homogeneizaron en 135 ml o 161g en 483 ml de KCl 3M en TRIS-HCl 0.01M pH 8 (1:3 m/v) empleando un polytron (kinematica GmbH, Brinkmann Instruments). Los homogenados se mantuvieron en agitación lenta toda la noche a 4°C , posteriormente se centrifugaron a $48,000 \times g$, 1 h a 4°C (Beckman J2-21), los precipitados se desecharon y los sobrenadantes (Sn1) se dializaron exhaustivamente contra TRIS-HCl 0.01 M, pH 8.0. Los Sn1 se ultracentrifugaron a $81,000 \times g$ por 1 h a 4°C (Beckman I8-60 M), se descartaron los precipitados y se recuperaron los sobrenadantes (Sn2), determinando su concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y cols. 1951).

7.3. Purificación de GSH-Px a través de columnas cromatográficas.

7.3.1. Columna de QAE-Cellex.

Un gramo de proteínas en 100 mililitros del Sn2 (lote A) se fraccionaron en una cromatografía líquida de intercambio aniónico de QAE-Cellex, para tal fin se empleó una columna de vidrio de 40 cm de altura x 3 cm de diámetro y 200 ml de resina, equilibrada con TRIS-HCl 0.01M, pH 8.0; las fracciones colectadas fueron de 3 ml.

Las proteínas del Sn2 que no fueron retenidas por la resina se excluyeron en las primeras fracciones de la cromatografía y cuando sus valores de absorción a 280 nm llegaron a cero se empleó un gradiente de TRIS-NaCl (NaCl 0.5M/ TRIS 0.01M) para eluir a la GSH-Px Ts. A cada tercer fracción eluída se le determinó su conductancia eléctrica (YSI 13200) y su actividad enzimática por la técnica de Paglia y Valentine (1967); las muestras positivas para la enzima se concentraron en un sistema de ultrafiltración Amicon, con presión positiva producida con nitrógeno gaseoso, las proteínas fueron retenidas en una membrana YM-5 (punto de corte de >5000). Las fracciones concentradas se dializaron exhaustivamente con fosfato de potasio dibásico 0.7M pH 8.0 4°C, y se determinó su concentración de proteínas (Sn3) (Lowry y cols. 1951). Esta cromatografía fue realizada 1 vez para el lote A y 4 para el lote B.

7.3.2. Columna de Fenilsefarosa CL-4B.

La siguiente cromatografía que se empleó separó las moléculas por medio de interacciones hidrofóbicas. En una columna de vidrio de 11 cm de altura x 3 cm de diámetro conteniendo 50 ml de resina Fenilsefarosa CL-4B (Pharmacia, Biotech) equilibrada con fosfato de potasio dibásico 0.7M pH 8.0, se fraccionaron 330 mg en 10 ml del Sn3 provenientes de la columna de QAE (lote A), colectándose fracciones de 3 ml. Cuando los valores de absorbancia a 280 nm decrecieron hasta 0.3 se cambió la concentración del amortiguador a 0.1M con la finalidad de eluir las fracciones más hidrofóbicas y recuperar a la enzima. De las fracciones con actividad enzimática salidas de esta columna y siguiendo el mismo protocolo para obtener al Sn3, se obtuvo el Sn4. Esta cromatografía fue repetida 1 vez para el lote A y 4 para el lote B.

7.3.3. Columna de Sefadex G-200.

Los componentes moleculares del Sn4, se separaron por su peso molecular en una columna de vidrio de 45 cm de altura x 1.5 cm de diámetro con 40 ml de resina Sefadex G-200 para el lote A y para el lote B en una columna de 150 cm de altura x 1.5 cm de diámetro con 148 ml de resina, en fosfato de potasio dibásico 0.1M pH 8.0. El volumen de las fracciones colectadas también fue de 3 ml, aquellas en donde se detectó la mayor actividad enzimática se concentraron individualmente de la forma previamente mencionada, obteniéndose el Sn5, se determinó su concentración de proteínas (Lowry y cols. 1951) y se continuó la purificación y análisis de la enzima empleando geles de poliacrilamida (Tsang y cols. 1985). Esta cromatografía fue repetida 1 vez para el lote A y 2 para el lote B.

7.4. Determinación de la actividad enzimática.

Empleando la técnica de Paglia y Valentine (1967), se determinó la actividad enzimática de GSH-Px en las diversas fracciones obtenidas de las tres diferentes clases de cromatografías empleadas.

En cada tubo de ensayo, correspondiente a las muestras experimentales se colocaron 200 μ l de cada fracción elegida para evaluar y se le adicionaron 400 μ l de la mezcla de ensayo (ME) (anexo 3). Al tubo control positivo se le adicionó 1U de Glutación peroxidasa (Sigma) en 500 μ l de amortiguador de fosfatos con DTT más 400 μ l de ME y al control negativo, 400 μ l de ME y 500 μ l de amortiguador de fosfatos con DTT; después de incubar todos los tubos a 37°C durante 15 minutos, se adicionaron 100 μ l de una solución de hidroperóxido de cumeno (1.7 μ l/ml) preparada antes de ser utilizada, se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 minutos e inmediatamente se leyeron en un espectrofotómetro (Spectronic 21D) a 366 nm, utilizando celdas de cuarzo

El espectrofotómetro se calibró a 0.130 empleando el control, de esta forma el valor de la absorbancia del control positivo es de cero, de tal manera que las muestras experimentales cuyos valores de absorbancia tendieron o fueron de cero se consideraron con actividad enzimática.

La especificidad de la técnica se demostró realizando el mismo ensayo, pero utilizando en lugar de Glutación peroxidasa distintas unidades de Catalasa (0.009, 0.09, 1.08 y 10.08 U).

7.5. Análisis de las muestras por PAGE-SDS.

Para este fin se empleó el método de Laemmli (1970) modificado por Tsang y cols. (1985).

Los geles separadores se prepararon como se indica en el anexo 5. Antes de utilizarlos, se construyó el gel concentrador con 10 carriles verticales, encima del gel polimerizado (anexo 5). Posteriormente, se colocó el gel en la cámara de electroforesis y en la tina superior amortiguador de TRIS-HCl pH 8.6, ácido bórico, SDS al 10% y amortiguador de TRIS-HCl pH 9.18 en la tina inferior. Las muestras a analizar al igual que los marcadores de peso molecular preteñidos (18-200kDa), se prepararon mezclándolos en una proporción de 1:2 con una solución de Glicerol, EDTA, SDS, TRIS-HCl, azul de bromofenol (Anexo 5) e hirvieron un minuto en baño maría. Después de enfriarse se colocaron dentro de los pozos del gel concentrador con la ayuda de una jeringa Hamilton. Con una fuente de poder (HSI PS250 Hoefer) se indujo una corriente de 10 mA por gel durante 2h a temperatura ambiente. Al término de la electroforesis el gel se sacó de la cámara, se enjuagó con agua destilada, se tiñó con azul de Coomassie y destiñó con ácido acético al 10%.

7.6. Visualización de GSH-Px en PAGE-nativa.

Una muestra de 9.68 mg contenida en 100µl del Sn 5 se mezclaron con glicerol (1.1 vol/vol) y se colocaron con ayuda de una jeringa Hamilton en un gel nativo preparativo de acrilamida al 7.5 % (anexo 8), la electroforesis se desarrolló con amortiguador de TRIS base (20mM) y Glicina (0.15 M), pH 8.5 y una corriente de 10 mA por 4h a temperatura ambiente. Para evidenciar las bandas dentro del gel se combinaron las técnicas de Paglia y Valentine, 1967 y Sun y cols. 1988, con algunas modificaciones.

Después de la electroforesis el gel se incubó en metanol al 5% por 5 min, posteriormente se lavó ligeramente con agua destilada y se sumergió en una mezcla de GSH 12 mM, NADPH 600 µM y GSSG-R 2.07U durante 5 min, se enjuagó con agua destilada y se cambió a una solución de peróxido de hidrógeno al 0.03 % por 15 min. Nuevamente se lavó con agua destilada e incubó en una mezcla al 1% de cloruro férrico y ferricianuro de potasio (CF/FP), ésta fue preparada inmediatamente antes de ser utilizada, a partir de una solución al 2% de cada una de las dos soluciones. La tinción se llevó a cabo hasta que el gel adquirió una coloración azul oscura y las bandas con actividad enzimática aparecieron de color amarillo claro, para detener la reacción el gel se lavó con agua destilada. Como control positivo se utilizó GSH-Px de eritrocitos bovinos y como control negativo albúmina humana.

7.7. Electroelución y análisis de GSH-Px.

Para obtener en solución a la GSH-Px de *T. solium*, 9.68 mg del Sn 5 se corrieron en un gel de PAGE-nativo a 10 mA por 4h a temperatura ambiente (anexo 8). Al término de la misma se cortó aproximadamente 1 cm de los dos extremos distales del gel, los cuales se tiñeron con cloruro férrico-ferricianuro de potasio para detectar la actividad de GSH-Px (Paglia y col. 1967 y Sun y cols.1988). Sobre un vidrio se volvió a armar el gel y las porciones teñidas se utilizaron como indicadores de la migración de la enzima en el gel no teñido, con esta ubicación se cortó del fragmento del gel no teñido una tira horizontal donde debió de encontrarse a la GSH-Px, de la misma forma se realizaron 3 geles más. Los fragmentos de gel se trituraron haciéndolos pasar en forma subsecuente por agujas de 11 y 18 mm. La electroelución de la enzima se realizó en un sistema electroelutor de BIORAD (Mod. 422), utilizando una solución amortiguadora de TRIS 25mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1%, se aplicó una corriente de 9mA y 184 V por 4 horas a 4°C; la GSH-Px obtenida se colocó en una membrana para diálisis y se dializó contra 250 ml de agua por 1 hora y posteriormente contra amortiguador de Tris-ácido bórico, pH 8.64. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951) y se analizó por PAGE-SDS.

7.8. Producción de anticuerpos de conejo anti-GSH-Px.

Se inmunizó un conejo con GSH-Px de *T. solium*, obtenida de 8 geles (150 μ g de proteína por estímulo) que se realizaron en forma similar que en el apartado 5.7, excepto que la enzima se mantuvo en las tiras recortadas de la acrilamida. Estas se trituraron a través de su paso subsecuente por agujas de distinto diámetro (desde 21 x 32 mm hasta 18 x 22 mm), y se mezclaron con Adyuvante Completo de Freund (ACF) en una proporción de 1:2 m/v; la mezcla se inyectó al conejo vía subcutánea en el músculo tríceps de la extremidad posterior izquierda. Otro conejo fue inmunizado similarmente al anterior; en cada estímulo se emplearon 100 μ g de glutatión peroxidasa de eritrocitos de borrego (Sigma, Co.) en 100 μ l de PBS mezclados en 100 μ l de ACF. Los sueros obtenidos de estos animales se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su evaluación.

1er. Sangrado.	1ª Inmunización.	2ª Inmunización	Sangrado a blanco.
Día cero.	Día cero.	Día 15.	Día 21.

7.9. Preparación de la membrana para la evaluación de anticuerpos (Inmunoblot).

Se separaron por electroforesis en PAGE-SDS en gradiente (5-22%) (anexo 5), 10 µg/ 8.6 µl del Sn 4, 10 µg/ 5 µl del Sn5 y 132 µg/ 4.4 µl de Catalasa de *Aspergillus niger* y 300 ng/ 5µl de suero de cerdo, posteriormente se transfirieron a nitrocelulosa (NC) (POTRAN BA83, 0.2µm) por el procedimiento de Towbin y cols. (1984) (anexo 6). Posteriormente la NC se dejó secar a temperatura ambiente y se marcó con tinta indeleble el límite entre el gel concentrador y el de separación. Se cortaron tiras verticales de 3 mm de ancho en las zonas donde se transfirieron las proteínas. Las tiras se fijaron con cinta adhesiva a un soporte de acetato y la cara expuesta se protegió con papel celofán. La NC y sus cubiertas se embebieron de PBS y se depositaron en el interior de una bolsa de hule con cierre hermético almacenándose a -20°C hasta su utilización.

7.10. Análisis de los anticuerpos de conejo anti GSH-Px.

Para la evaluación de los anticuerpos de conejo se descongelaron las tiras y se realizó el ensayo con el suero del animal (anexo 7). Las diluciones del primer anticuerpo que se probaron en las membranas de las fracciones con AE de Fenilsefarosa (Sn4) y Sefadex G-200 (Sn5), fueron 1:50, 1:250 y 1:500; las del 2° Ac 1:500 y 1:1000. Las diluciones para la membrana con Catalasa fueron ambos 1:1000; para GSH-Px de eritrocitos bovinos se probaron 1:500 1er Ac y 1:1000 para el 2° Ac y para albúmina de cerdo 1:1000 y 1:5000 el 1er Ac y 1:1000 el 2° Ac.

7.11. Purificación de huevos de *T. taeniaeformis*.

Se colectaron los proglótidos de *T. taeniaeformis* de las heces de gatos infectados experimentalmente. Se lavaron exhaustivamente con PBS y con la ayuda de un pistilo se maceraron sobre una malla del número 100 (SANPO).

Los huevos se recuperaron en un vaso, se lavaron con PBS y se colocaron en tubos de ensayo de 50 ml, se centrifugaron por 5 min. a 3000 r.p.m. a 4°C, el sobrenadante se desechó y el precipitado con los huevos se resuspendió en 15 ml de PBS, se adicionaron 30 ml de Percoll, se homogeneizó y se volvió a centrifugar a 3000 r.p.m. a 4 °C por 60 min., se decantó el sobrenadante y los huevos se lavaron con 45 ml de PBS centrifugando por 5 min. Con las mismas condiciones, los lavados se realizaron tres veces. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 5 ml de PBS y se procedió a contabilizar los huevos mediante microscopía de luz a 10x.

7.12. Ensayo de la capacidad protectora de GSH-Px de *T. solium*.

Para evaluar la capacidad protectora de GSH-Px de *T. solium* en ratas de la cepa Wistar, se formaron grupos controles y experimentales, cada uno contó con 7 ratas hembras de 5 semanas de edad; todas las ratas fueron sangradas antes y después de la inmunización por punción cardiaca para obtener suero.

El protocolo de inmunización consistió en inyectar en el cuello vía subcutánea 350µg de GSH-Px de *T. solium* en ACF (1:2) en los animales experimentales o la misma cantidad de BSA/ACF (1:2) en los controles; el desafío se realizó oralmente con ayuda de una sonda, cada rata recibió 240 huevos de *Taenia taeniaeformis* en 200 µl de PBS. Al sacrificio se realizó un tercer sangrado y se diseccionaron los hígados para cuantificar los cisticercos presentes en ellos.

1er. Sangrado	1ª inmunización.	2º inmunización	2º sangrado.
Día cero.	Día cero.	Día 15.	Día 16.
Desafío.	3er sangrado.	Sacrificio.	Conteo de cisticercos en hígado.
Día 45.	Día 75.	Día 75.	Día 75.

8. RESULTADOS.

8.1. Solubilización de las proteínas de los cisticercos.

En la purificación de GSH-Px se implementaron algunas modificaciones al procedimiento de Leid y cols. (en prensa), dicho procedimiento se realizó utilizando dos lotes de cisticercos (A y B), en la tabla 4 se muestran los gramos de parásitos que se emplearon, así como la concentración proteica y proteína total del Sn2.

LOTE	MASA DE CISTICERCOS (g)	CONC. DE PROTEINAS DEL Sn2 (mg/ml)	PROTEÍNA TOTAL DEL Sn2 (mg)
A	45	10.06	1006
B	161.5	15	4350

Tabla 4. Cantidad de cisticercos empleados durante el proceso de solubilización de las proteínas y proteína total de los diferentes sobrenadantes (Sn2).

8.2. Purificación de GSH-Px por cromatografías líquidas.

8.2.1. Purificación de GSH-Px de cisticercos del lote A.

Una vez obtenido el sobrenadante 2 se procedió a utilizar diversas columnas cromatográficas para la purificación de la enzima, la figura 11 muestra el resultado de la cromatografía de QAE-Cellex corrida con 1,006 mg de proteína del Sn 2 del lote A. El análisis a 280 nm indicó que las diversas fracciones formaron solamente dos picos, el

primero al saturarse la resina y otro debido a la elución de la muestra por efecto del gradiente salino; el comportamiento lineal del gradiente se comprobó al medir en mS la conductancia de las fracciones de la 46 a la 115. La actividad enzimática se detectó a 366 nm sólo en las fracciones 80-118 que corresponden al segundo pico (Sn3). En ésta gráfica se observan los dos picos de proteína muy cercanos entre si porque el gradiente salino comenzó a pasar cuando los valores de absorción a 280 nm del 1er pico no habían alcanzado el cero; sin embargo las fracciones con actividad enzimática se encontraron exclusivamente dentro del segundo pico de proteína. Como siempre se usó la misma columna sin modificarla, es común que su resina al paso de subsecuentes cromatografías se siga empacando, por lo que para evitar una sobreposición de los dos picos de proteínas, en las siguientes corridas se decidió colocar el gradiente salino hasta que los valores protéicos del primer pico fueran prácticamente de cero.

La figura 12 presenta el resultado de la cromatografía en Fenilsefarsa de 330 mg del Sn3 del lote A. Las fracciones de la 5 a la 45 leídas a 280 nm fluctuaron sus valores de absorbancia de 0.2 a 1.0, posteriormente al cambio de molaridad del amortiguador se formaron dos picos de tamaños diferentes, en el segundo y más grande se encontró la actividad enzimática entre las fracciones 30 a 43 que se concentraron para formar el Sn 4

La figura 13 corresponde al resultado del corrimiento cromatográfico de 120 mg del Sn 4 en la columna de Sefadex G-200; en ella se observa una sola curva ancha cuyo valor máximo de absorbancia fue de 0.9 a 280 nm en la parte central de la misma donde se situó la principal actividad enzimática.

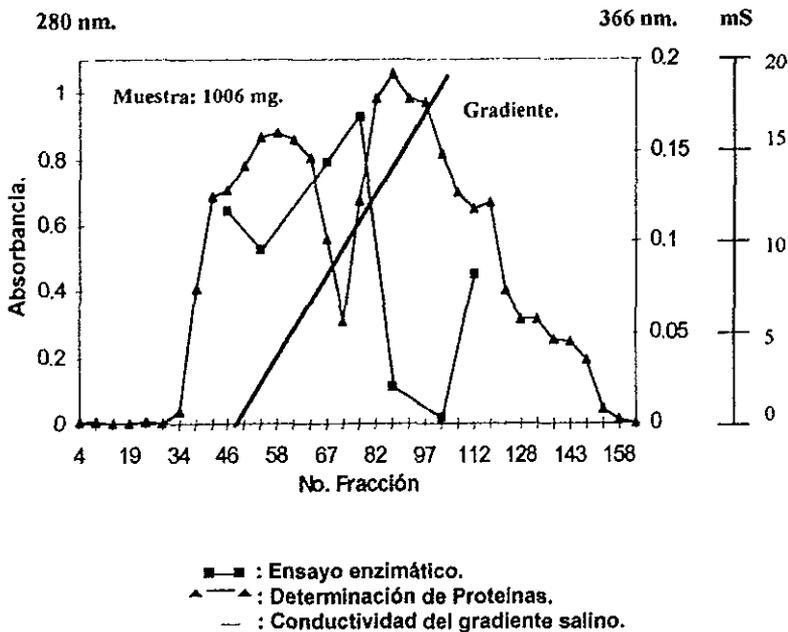


Figura 11. Columna de QAE-Cellex.

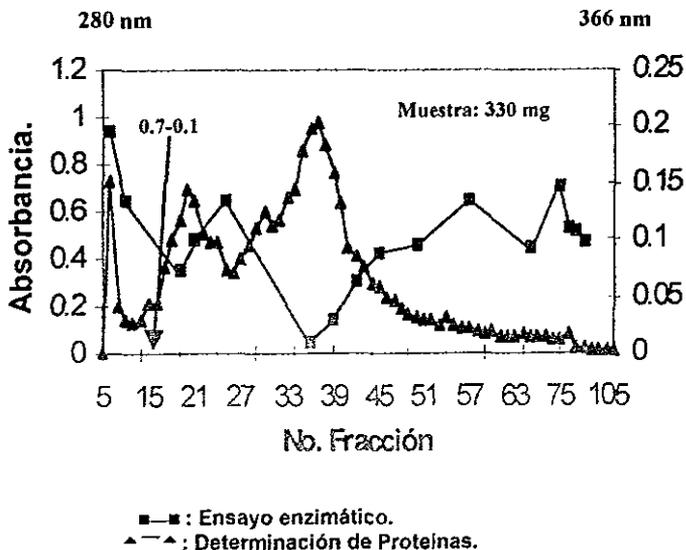


Figura 12. Columna de Fenilsefarsa.

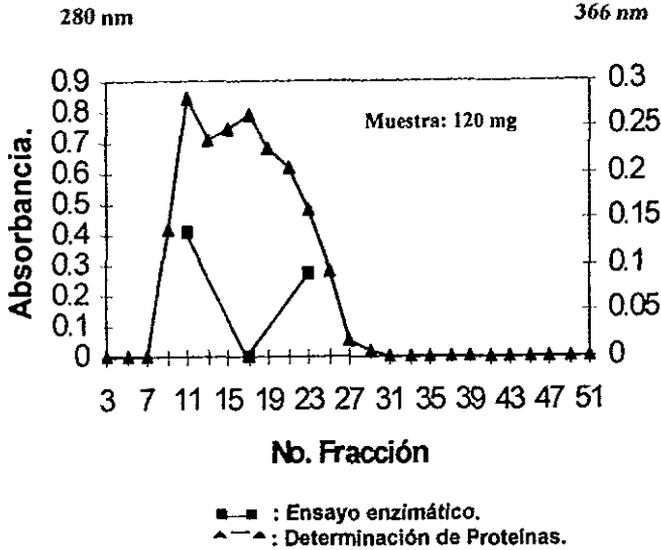


Figura 13. Columna de Sefadex G-200.

8.2.2. Purificación de GSH-Px de cisticercos del lote B.

Debido a que en este lote de cisticercos se obtuvieron 300 ml de Sn2 con 4.5g de proteína fue necesario fraccionarlo en 4 partes, por lo que se corrieron 4 columnas de QAE-Cellex, 4 de Fenilsefariosa y 2 de Sefadex G-200. En las figuras 14 a 17 se muestran los datos de los corrimientos de 1.500, 1.050 y dos veces 900 mg del Sn 2 en la misma columna de QAE-Cellex.

El comportamiento de las proteínas a lo largo de este tipo de cromatografía fue en general similar entre si y con la equivalente para el lote A. Es decir, las fracciones leídas a 280 nm formaron dos picos, el primero de saturación y el segundo de elución. Las variaciones que se presentaron estuvieron dadas en parte por las diferencias en

cantidad de proteína del Sn 2 empleado por columna, así donde mayor cantidad de muestra se usó se registraron los valores de absorbancia más altos (fig 14); las demás tuvieron valores muy cercanos entre si. En todas las cromatografías se conservó la linealidad del gradiente; también fue constante encontrar la actividad enzimática solamente en el pico de elución, aunque en la cromatografía con mayor cantidad total de proteína empleada (fig.14), la proporción del número de fracciones con actividad enzimática no aumentó comparándola con las otras 3 cromatografías (fig 15-17). El comportamiento del primer pico entre las 5 diferentes columnas de QAE indicó, que la cantidad de proteína óptima para recuperar el mayor número de fracciones con actividad enzimática fue 900 mg (fig.17) porque el valor máximo de absorbancia no rebasó 0.8 (280 nm) y el del segundo fue entre 1.0 y 1.2, similar al resto de las cromatografías que usaron más proteína.

En las cromatografías de Fenilsefaroza se corrieron de 250 a 330 mg del Sn 3 (figs. 18-21). En ellas se puede apreciar que las curvas de las proteínas resultaron diferentes entre si, estas variaciones consistieron principalmente en presentar un número diferente de picos, desde el inicio de la cromatografía hasta el cambio de molaridad del amortiguador; los valores de absorbancia en esta región fluctuaron de 0.2 a 0.8, sin embargo, en las 4 cromatografías, al cambio de molaridad del amortiguador se obtuvo un sólo pico que siempre fue el de mayor absorbancia y en el cual se encontró la actividad enzimática, coincidiendo entre si los valores más altos tanto para la enzima como para las proteínas. También es notorio que los picos con actividad enzimática que mejor se definieron correspondieron a las cromatografías que se realizaron con menor cantidad de proteínas. Las fracciones con actividad enzimática que se colectaron de estas columnas se concentraron y formaron el Sn 4.

La última etapa cromatográfica se desarrolló en columnas de Sefadex G-200, con la finalidad de eliminar de la fracción Sn 4 contaminantes protéicos con pesos moleculares de 70 kDa o mayores. En las figuras 22 y 23 se muestran los datos de estas cromatografías con 313 mg (fig. 20) y 300 mg (fig. 21) del Sn 4. La forma de las curvas de estas dos gráficas fueron muy similares a la fig. 13 (lote A), presentando varios picos, uno principal al centro con valores máximos de absorción de 0.9, y otros dos de menor tamaño a cada lado. La actividad enzimática apareció sólo en el pico central correlacionando la mayor actividad con la mayor cantidad de proteína.

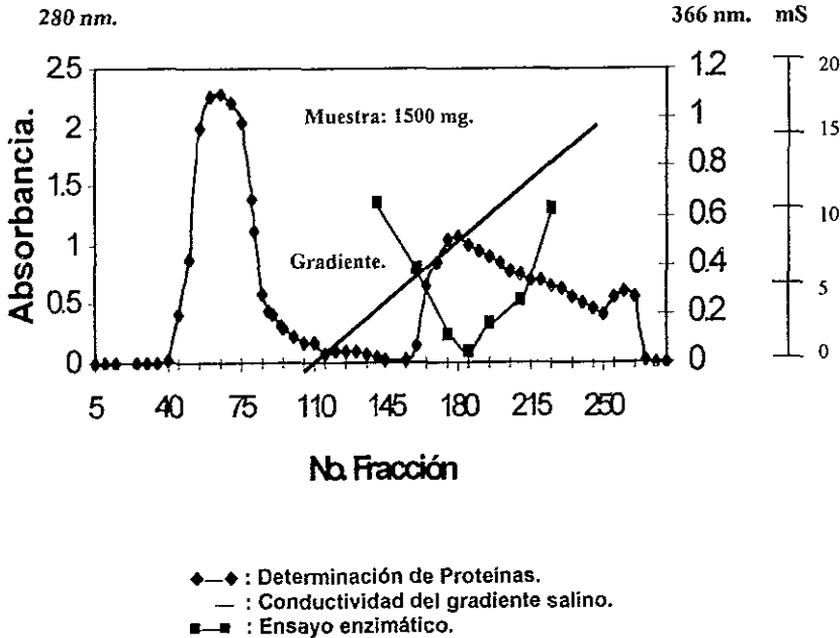
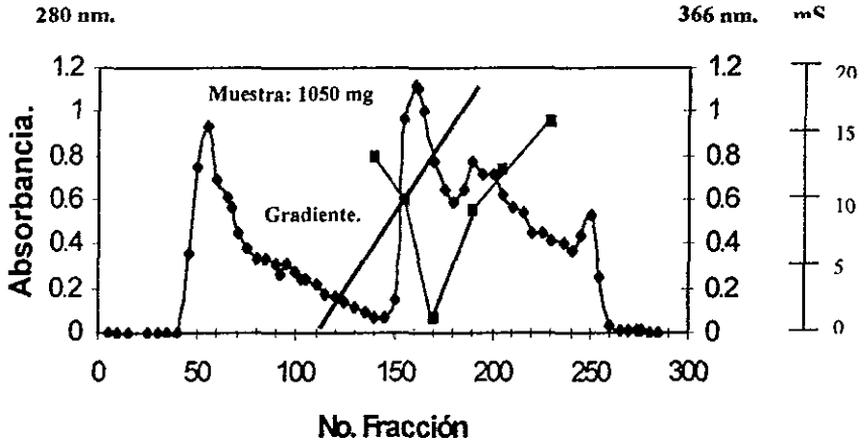
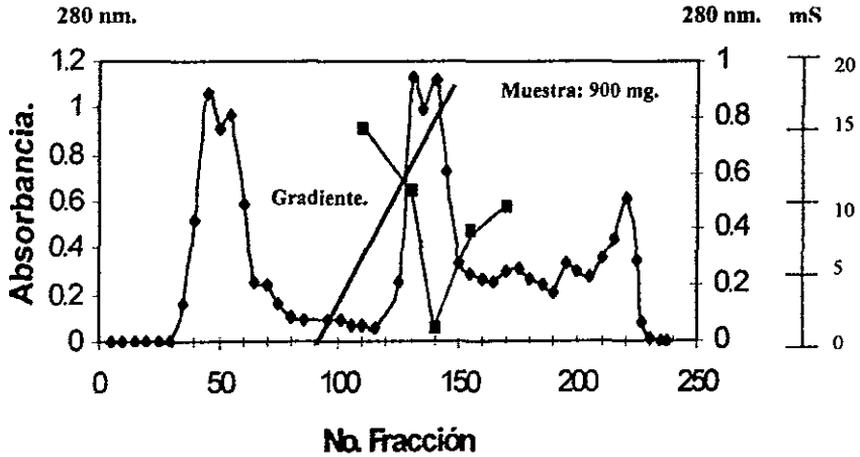


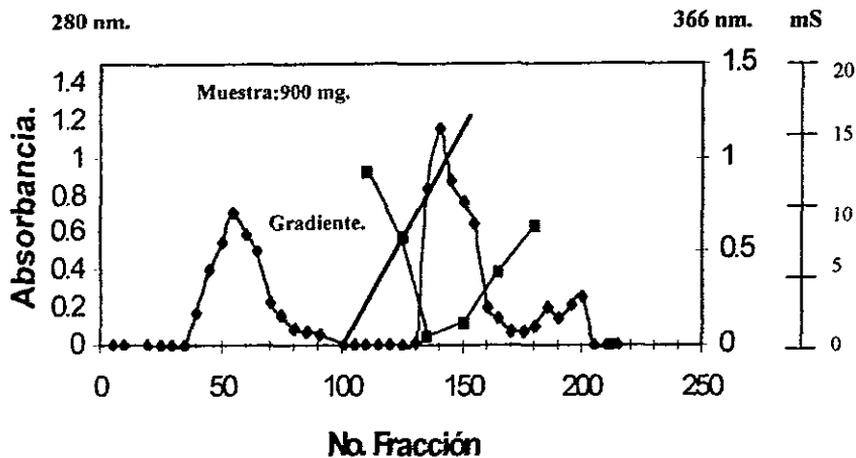
Figura 14. Columna de QAE-Cellex I.



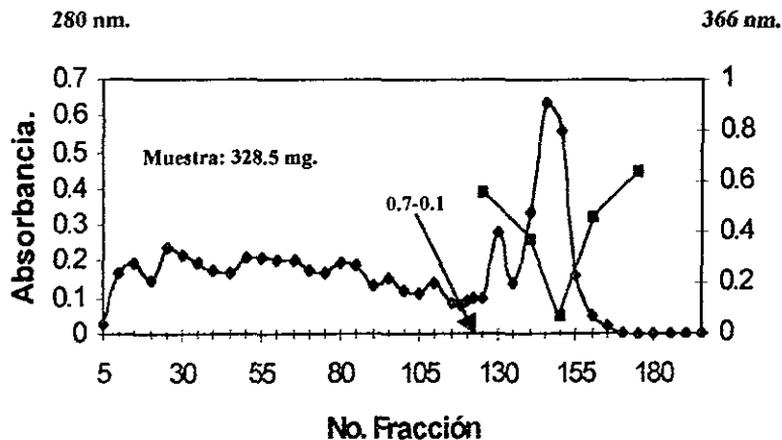
◆◆ : Determinación de Proteínas.
 — : Conductividad del gradiente salino.
 ■■ : Ensayo enzimático.
 Figura 15. Columna de QAE-Cellex II.



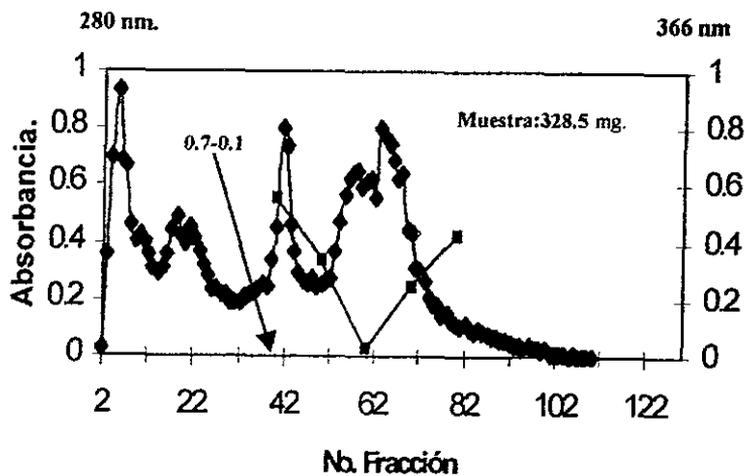
◆◆ : Determinación de Proteínas.
 — : Conductividad del gradiente salino.
 ■■ : Ensayo enzimático.
 Figura 16. Columna de QAE-Cellex III.



◆◆ : Determinación de Proteínas.
 — : Conductividad del gradiente salino.
 ■■ : Ensayo enzimático.
 Figura 17. Columna de QAE-Cellex IV.

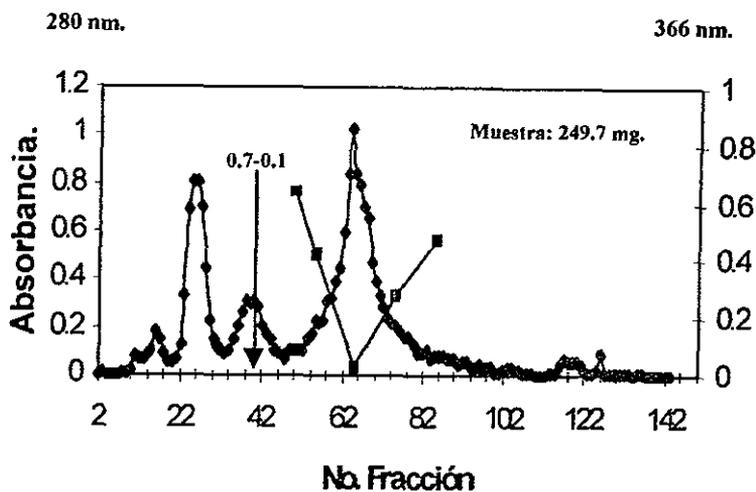


◆◆ : Determinación de Proteínas.
 ■■ : Ensayo enzimático.
 Figura 18. Columna de Fenilsefarsa I.



- ◆—◆ : Determinación de Proteínas.
- : Ensayo enzimático.

Figura 19. Columna de Fenilsefaroza II.



- ◆—◆ : Determinación de Proteínas.
- : Ensayo enzimático.

Figura 20. Columna de Fenilsefaroza III.

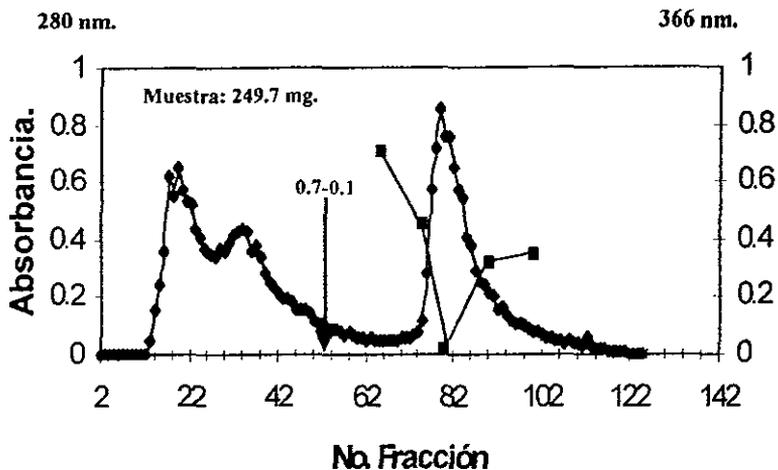


Figura 21. Columna de Fenilsefaroza IV.

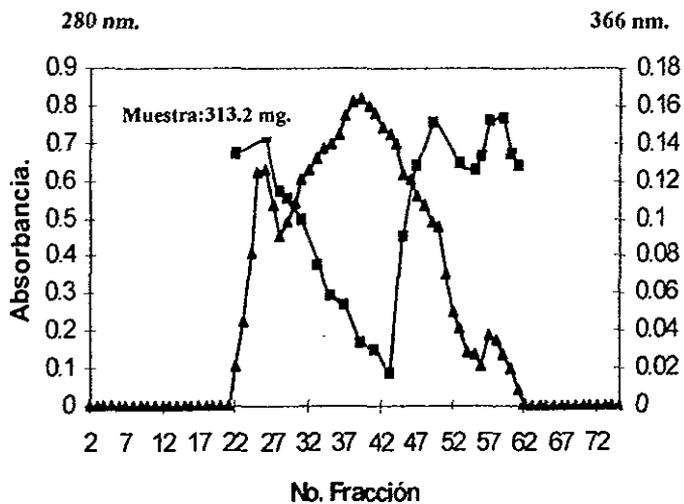


Figura 22. Columna de Sefadex G-200 I.

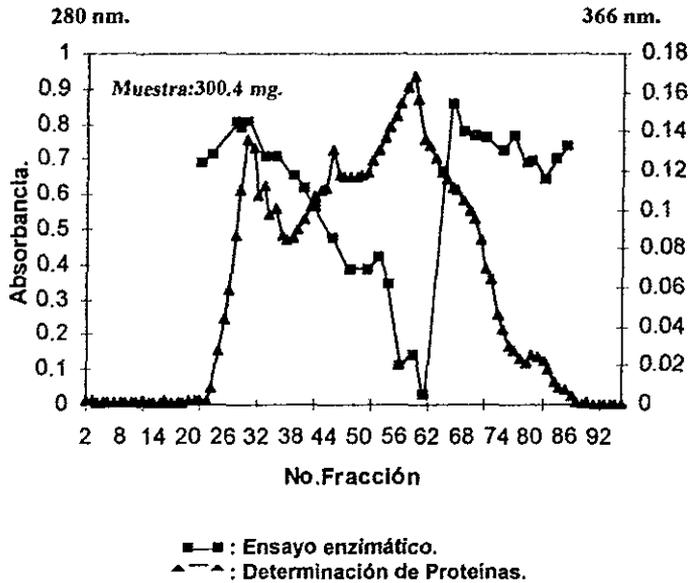


Figura 23. Columna de Sefadex G-200 II.

Las concentraciones de las diferentes fracciones obtenidas de las distintas columnas se muestran en las tablas 5 y 6.

QAE-CELLEX (Sn3).		FENILSEFAROSA (Sn4).		SEFADEX G-200 (Sn5).	
Conc. (mg/ml)	Vol. Total (ml)	Conc. (mg/ml)	Vol. Total (ml)	Conc. (mg/ml)	Vol. Total (ml)
33	10	78	1.54	1) 23.7	0.2
				2) 17.47	0.2
				3) 17.16	0.2
				4) 25	0.2
				5) 5.5	0.2

Tabla 5. Concentraciones de proteínas de las fracciones obtenidas de las tres diferentes columnas cromatográficas correspondientes al lote A de cisticercos. En Sefadex G-200: 1) fracciones 8-16, 2) fracción 17, 3) fracción 18, 4) fracciones 19-23, 5) fracciones 24-30.

QAE-CELLEX (Sn3).		FENILSEFAROSA (Sn4).		SEFADEX G-200 (Sn5).	
Conc. (mg/ml)	Vol. Total (ml)	Conc. (mg/ml)	Vol.Total (ml)	Conc. (mg/ml)	Vol. Total (ml)
43.8	26.4	58	10,82	96.8	1.35

Tabla 6. Concentraciones de proteínas de las fracciones obtenidas de las tres diferentes columnas cromatográficas correspondientes al lote B de cisticercos.

8.3. Rendimiento de la purificación por columnas cromatográficas.

La eficacia de la purificación fue estimada por medio del rendimiento en las distintas etapas de la purificación por columnas cromatográficas, realizando la determinación de la concentración total de proteínas por el método de Lowry de las diferentes fracciones (tablas 7 y 8): encontrándose que los rendimientos son muy semejantes en los dos lotes de cisticercos, a excepción del rendimiento del Sn5 que es mayor en el lote B (0.08% en comparación con 0.015% del lote A), es decir, que la columna por haber sido de un tamaño mayor que la utilizada para el primer lote favoreció la purificación de la enzima, ya que como se observa en la figura 13 la mayor absorbancia se obtuvo en el primer pico mientras que en las figuras 22 y 23 (sefadex G-200, lote B) apareció en el segundo pico que es justamente donde se encuentra la actividad enzimática.

MUESTRA	MASA (mg)	%
Cisticercos	45000	100
Sn2	1006	2.23
Sn3	330	0.73
Sn4	120	0.27
Sn5	6.92	0.015

Tabla 7. Rendimiento obtenido en las diferentes etapas de la purificación de GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* del lote A.

MUESTRA	MASA (mg)	%
Cisticercos	161000	100
Sn2	4350	2.7
Sn3	1156.3	0.72
Sn4	627.5	0.39
Sn5	130.68	0.08

Tabla 8. Rendimiento obtenido en las diferentes etapas de la purificación de GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* del lote B.

En la electroelución de GSH-Px se partió de 33.88 mg de muestra que fueron colocados en los geles de PAGE-nativa, de la electroelución de la banda con actividad enzimática se obtuvieron 0.13 mg, cuyo rendimiento es del 0.38%.

8.4. Ensayo enzimático de Catalasa.

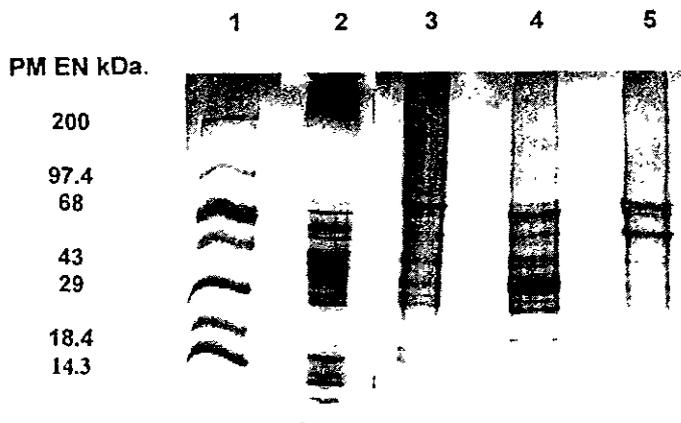
Debido a que Catalasa es una enzima que al igual que GSH-Px es capaz de eliminar H_2O_2 , fue necesario desechar la posibilidad de que en el ensayo se estuviera detectando su actividad y no la de GSH-Px, por ello se realizó el mismo ensayo enzimático que para GSH-Px en medio líquido (Paglia y col. 1967), pero en lugar de GSH-Px se colocaron unidades crecientes de Catalasa (tabla 9) y además en los reactivos utilizados para el ensayo se eliminó el uso de Azida de sodio, ya que se sabe que es un inhibidor de la actividad de Catalasa, de esa manera se descartó que una posible ausencia de actividad se debiera a dicho reactivo, sin embargo los valores obtenidos fueron semejantes al control negativo.

ENZIMA.	UNIDADES DE ENZIMA.	ABSORBANCIA.
Control negativo	0	0.13
Control negativo	0	0.13
Control positivo (GSH-Px)	1	0
Control positivo (GSH-Px)	1	0
Catalasa	0.009	0.133
Catalasa	0.09	0.134
Catalasa	1.08	0.121
Catalasa	10.08	0.122

Tabla 9. Ensayo enzimático de Catalasa de *A. Niger* y Glutatión peroxidasa de eritrocitos bovinos.

8.5. Análisis por PAGE-SDS de las fracciones obtenidas en las diferentes columnas cromatográficas (lote A).

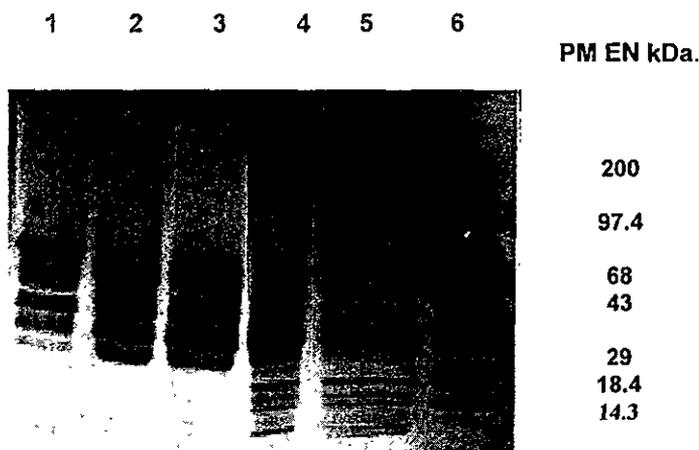
El análisis en PAGE-SDS se realizó utilizando una alícuota de las fracciones con actividad enzimática de cada columna cromatográfica (fig. 24). El carril 1 corresponde al control de pesos moleculares y en el carril 2 se observa el Sn1; esta fracción está compuesta de diversas bandas con pesos moleculares de más de 10,000 a 100,000 Da. El carril 3 presenta el Sn 2 obtenido de la columna de QAE-Cellex, su número de bandas fue menor que la muestra anterior pero no así el rango de sus pesos moleculares, además de la intensidad de diversas bandas. El carril 4 corresponde a la muestra del Sn 3 en la cromatografía de Fenilsefaroza, esta columna permitió una concentración de bandas en un rango de peso molecular de 30-70 kDa, aunque también hubo bandas de alto peso molecular éstas fueron muy tenues, y las de bajo peso molecular desaparecieron. En el carril 5 se corrió una alícuota sin actividad enzimática, proveniente de la columna de Fenilsefaroza; el patrón de bandeado resultó diferente a la fracción que sí presenta actividad enzimática, destacando principalmente la concentración de la banda de peso molecular de 30,000 Da, la aparición de dos bandas muy tenues de 40 y 50, kDa respectivamente y la moderada concentración de otras dos de 25 y 20 kDa.



- 1: Marcadores de Peso molecular.
- 2: Muestra de 51 μg de Sn 1.
- 3: Muestra de 165 μg de la fracción con actividad enzimática (AE) de la columna de QAE-Cellex.
- 4: Muestra de 156 μg de la fracción con AE de la columna de Fenilsefarsa.
- 5: Muestra de 140 μg de la fracción sin AE de la columna de Fenilsefarsa.

Figura 24. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas de las columnas de QAE-Cellex y Fenilsefarsa de la purificación de GSH-Px del lote A.

Con la finalidad de localizar a la banda específica de GSH-Px en cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía de Sefadex G-200 con actividad enzimática (fig. 13), se decidió no mezclarlas y realizar su análisis en PAGE-SDS. Tanto en la fracción 17 carril 2, y fracción 18 carril 3 (fig. 25) se obtuvo la mayor actividad enzimática. En el resto de las fracciones no se demostró la presencia de la enzima (carriles 1, 4 y 5). También se observa que con esta cromatografía se logró eliminar componentes moleculares de 200 - 80 kDa y de 25 - 8 kDa.



- 1: Muestra de 115 μg de las fracciones 8-16.
- 2: Muestra de 170 μg de la fracción 17.
- 3: Muestra de 170 μg de la fracción 18.
- 4: Muestra de 125 μg de las fracciones 19-23.
- 5: Muestra de 125 μg de las fracciones 24-30.
- 6: Marcadores de peso molecular.

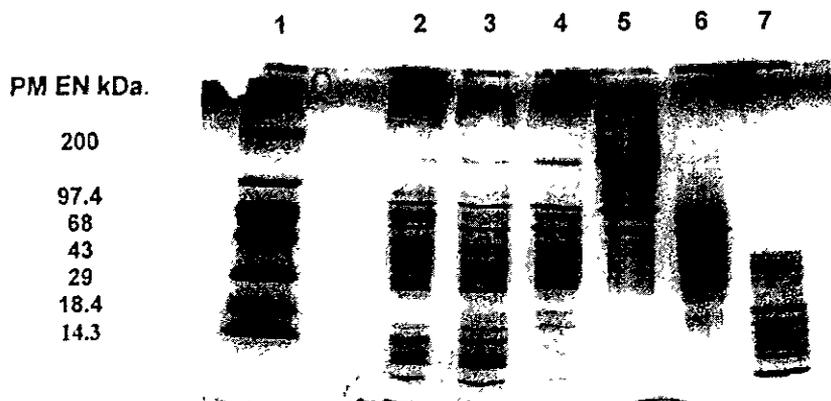
Figura 25. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas en la cromatografía de Sefadex G-200 del lote A.

8.6. Análisis por PAGE-SDS de las fracciones obtenidas en las diferentes columnas cromatográficas (lote B).

Al igual que para el análisis del lote A se utilizó una alícuota de las fracciones con actividad enzimática de cada columna cromatográfica (fig. 26). El carril 1 corresponde al control de pesos moleculares y en el carril 2 se observa el Sn1.

En el carril 3, el Sn 2 presenta la misma distribución de bandas que el lote A, pero definidas con mayor claridad. En el carril 4, se observa también concentrada la banda de 30kDa, como en el lote A, aunque en menor proporción.

En el carril 5 se incluye la *región ascendente* de la curva cromatográfica de la columna de Sefadex G-200, sin actividad enzimática (fig. 22 y 23), en el carril 6 el pico central, donde se detectó la mayor actividad enzimática, y en el carril 7, la *región descendente* también sin actividad enzimática.



- 1: Marcadores de peso molecular.
- 2: Muestra de 51 μg de Sn 1.
- 3: Muestra de 53 μg de la fracción con AE de la columna de QAE Cellex.
- 4: Muestra de 58 μg de la fracción con AE de la columna de Fenilsefarosa.
- 5: Muestra de 50 μg de la fracción sin AE de la columna de Sefadex G-200.
- 6: Muestra de 48 μg de la fracción con AE de la columna de Sefadex G-200.
- 7: Muestra de 50 μg de la fracción sin AE de la columna de Sefadex G-200.

Figura 26. PAGE-SDS de las fracciones con actividad enzimática obtenidas de las columnas de QAE-Cellex , Fenilsefarosa Y Sefadex G-200 de la purificación de GSH-Px del lote B.

8.7. Detección de la actividad enzimática en PAGE-nativa.

8.7.1 PAGE-nativa con GSH-Px de eritrocitos bovinos.

El resultado de la estandarización de la técnica de PAGE-nativa con 176 unidades enzimáticas (176 μg) de GSH-Px de eritrocitos bovinos (carril 1) e igual cantidad proteica de albúmina sérica bovina (carril 2) se muestra en la fig. 27. En todo el gel nativo sólo se detectó una región trasparente (amarilla, en fotografías a color) sobre todo el fondo negro (azul, en fotografía a color) en el carril donde corrió la enzima.

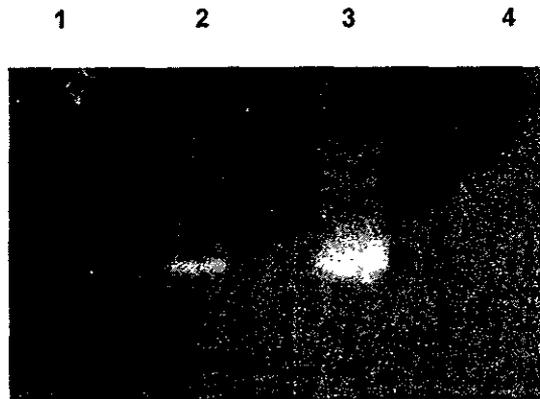


1: Muestra de 176 μg (17.6 U) de GSH-Px de eritrocitos bovinos.
2: Muestra de 176 μg de albúmina sérica bovina.

Figura 27. PAGE-nativa de GSH-Px de eritrocitos bovinos.

8.7.2. PAGE-nativa con GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium*.

Después de haber comprobado que la técnica de PAGE-nativa funcionaba para detectar GSH-Px directamente en los geles, se evaluaron cuatro distintas concentraciones de GSH-Px *T.s.* (96.8, 968, 1936 y 3872 μ g) para determinar la sensibilidad de la técnica. Como lo revela la figura 28, la concentración idónea para realizar el ensayo es de 968 μ g, ya que la anterior a ésta no se puede observar y en los carriles 3 y 4 se aprecian bandas difusas.

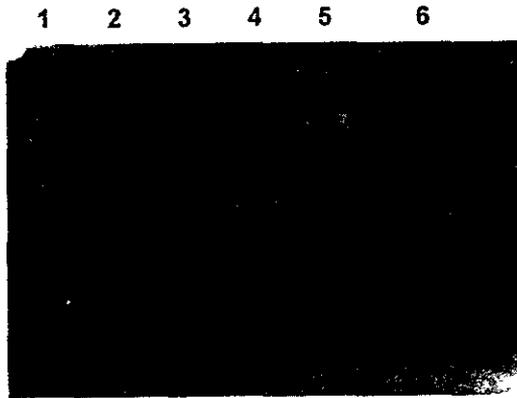


- 1: Muestra de 96.8 μ g.
- 2: Muestra de 968 μ g.
- 3: Muestra de 1936 μ g
- 4: Muestra de 3872 μ g.

Figura 28. PAGE-nativa con cuatro diferentes concentraciones de la fracción con Actividad enzimática obtenida de la columna de Sefadex G-200 del lote B.

8.7.3. PAGE-nativa de las diferentes etapas de la purificación de GSH-Px de cisticercos de *T. solium* del lote B.

Una vez que se determinó la cantidad mínima detectable por la técnica de PAGE-nativa, se observó la actividad enzimática en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de la enzima por medio de cromatografías líquidas, como control positivo se utilizó GSH-Px de eritrocitos bovinos y como negativo albúmina sérica bovina (fig. 29), encontrándose una diferencia en las posiciones de GSH-Px de eritrocitos bovinos y GSH-Px de *T. solium*, lo cual sugiere que tienen diferente peso molecular. En las fracciones pre-QAE-Cellex, QAE-Cellex y Fenilsefarosa se observa una coloración difusa, porque la cantidad colocada en cada carril corresponde a una serie de proteínas, mientras que en la fracción se Sefadex G-200 se logró observar una banda definida debido a que ésta se encuentra más enriquecida de GSH-Px.

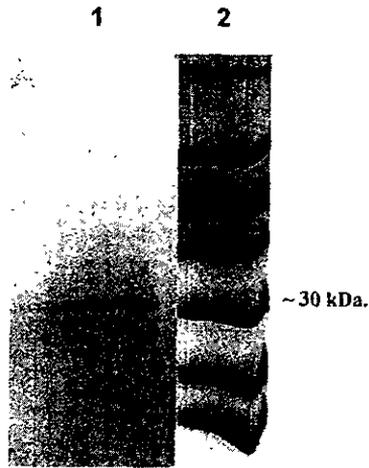


- 1: Muestra de 967 μ g de pre-QAE-Cellex.
- 2: Muestra de 964 μ g de la fracción con AE de QAE-Cellex.
- 3: Muestra de 957 μ g de la fracción con AE de Fenilsefarosa.
- 4: Muestra de 968 μ g de la fracción con AE de Sefadex G-200.
- 5: Control positivo de Glutatión peroxidasa de eritrocitos bovinos (176 μ g).
- 6: Control negativo de albúmina sérica bovina (960 μ g).

Figura 29. Detección de la actividad de GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* en PAGE-nativa en las diferentes etapas de la purificación del lote B.

8.7. Análisis de GSH-Px de cisticercos de *T. solium* electroeluída de PAGE-nativa.

Debido a que no fue posible correlacionar en PAGE-SDS la banda que correspondía a la enzima que en PAGE-nativa presentaba la actividad, se procedió a realizar cuatro geles en PAGE-nativa a los cuales se les cortaron los extremos y se tiñeron con Cloruro férrico-Ferricianuro de potasio y una vez detectada la actividad enzimática se rearmaron y se cortó la banda correspondiente a la enzima, se llevó a cabo su electroelución y su posterior análisis en PAGE-SDS (fig. 30), la comparación con pesos moleculares preteñidos, mostró que la banda observada presenta un peso de ~30 kDa.



1: 42.1 µg de GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* electroeluida.
2: Marcadores de Peso molecular.

Figura 30. Análisis en PAGE-SDS de la electroelución de GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* del lote B.

8.7. Evaluación de los anticuerpos de conejo contra GSH-Px de cisticercos de *T. solium*.

La evaluación de los anticuerpos del conejo inmunizado con la GSH-Px purificada se realizó por medio de inmunoblot, utilizando las fracciones con actividad enzimática de las columnas de Fenilsefaraosa y Sefadex G-200, en este ensayo se probaron distintas diluciones de primero y segundo anticuerpo, para determinar la dilución óptima (fig. 31 y 32)

A B C D E F G H I J K L M



A: Tinción con Auro-Dye.
B,D,F,H,J,L: Sueros normales.
C,E,G,I,K,M: Suero de conejo hiperinmune.
B y C: 1er Ac: dil. 1:50, 2° Ac: dil. 1:500.
D y E: 1er Ac: dil. 1:250, 2° Ac: dil. 1:500.
F y G: 1er Ac: dil. 1:500, 2° Ac: dil. 1:500.
H e I: 1er Ac: dil. 1:50, 2° Ac: dil. 1:1000.
J y K: 1er Ac: dil. 1:250, 2° Ac: dil. 1:1000.
L Y M: 1er Ac: dil. 1:500, 2° Ac: dil. 1:1000.

Figura 31. Inmunoblot de los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de cisticercos de *T.solium* frente a la fracción con AE de la columna de Fenilsefaroza.

A B C D E F G H I J K L M



A: Tinción con Auro-Dye.
B,D,F,H,J,L: Suero normal.
C,E,G,I,K,M: Suero de conejo hiperinmune.
B y C: 1er Ac: dil. 1:50, 2° Ac: dil. 1:500.
D y E: 1er Ac: dil. 1:250, 2° Ac: dil. 1:500.
F y G: 1er Ac: dil. 1:500, 2° Ac: dil. 1:500.
H e I: 1er Ac: dil. 1:50, 2° Ac: dil. 1:1000.
J y K: 1er Ac: dil. 1:250, 2° Ac: dil. 1:1000.
L y M: 1er Ac: dil. 1:500, 2° Ac: dil. 1:1000.

Figura 32. Inmunoblot de los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de cisticercos de *T.solium* frente a la fracción con AE de la columna de Sefadex G-200.

Para descartar que los anticuerpos estuvieran reconociendo a Catalasa en lugar de GSH-Px, se realizó un inmunoblot con Catalasa de *A. niger* (fig. 33), además de GSH-Px de eritrocitos bovinos, también se aprovechó el ensayo para observar la respuesta de los anticuerpos anti GSH-Px de *T.solium* frente a albúmina de cerdo (fig. 34), ya que en las tiras de inmunoblot de las figuras 31 y 32 aparecen 2 bandas de aprox. 60kDa, aparte de la banda de ~30kDa.

En la fig. 33 se observa que no hay reacción cruzada con Catalasa de *A. niger*, pero si con GSH-Px de eritrocitos bovinos.

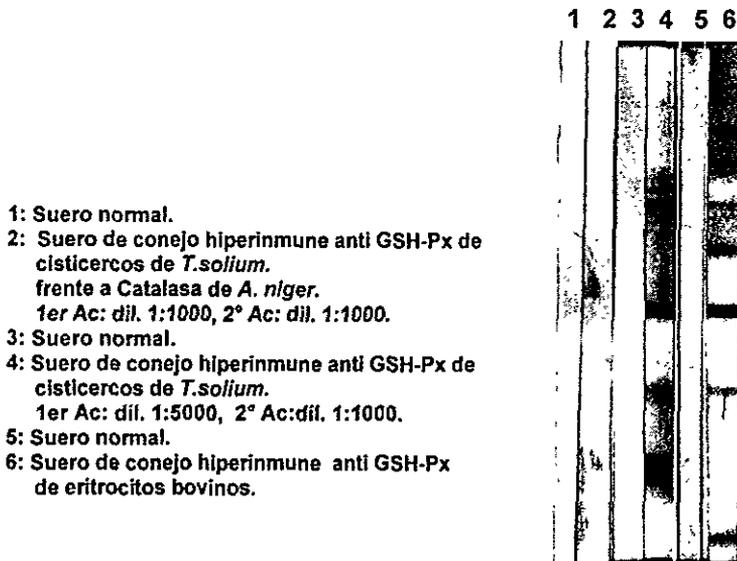


Figura 33. Inmunoblot de los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de cisticercos de *T. solium* frente a Catalasa y antiGSH-Px de eritrocitos bovinos frente a la fracción con AE de la columna de Safadex G-200.

El ensayo de inmunoblot con albúmina de cerdo reveló la presencia de dos bandas de aprox. 60kDa, que también aparecen en el inmunoblot del suero del conejo inmunizado con GSH-Px de cisticercos de *T.solium* (fig. 34).



- 1 y 3: Suero normal.
- 2: Suero de conejo hiperinmune, 1er Ac:dil.1:1000, 2° Ac: dil1:1000.
- 4: Suero de conejo hiperinmune, 1er Ac: dil.1:5000, 2° Ac: dil. 1:1000.

Figura 34. Inmunoblot de los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de cisticercos de *T. solium* frente a Albúmina de cerdo.

8.10. Evaluación de la actividad protectora de GSH-Px de *T.solium*.

Una vez que se pudo detectar la actividad enzimática directamente en los geles nativos y que se observó que era capaz de producir una respuesta inmune humoral en conejo, se procedió a evaluar su capacidad de protección cruzada contra la cisticercosis producida por *Taenia taeniaeformis* en ratas inmunizadas. Para ello fue necesario extirpar los hígados de las ratas después de haber sido inmunizadas con la GSH-Px de *T.solium* y desafiadas con los huevos de *T. taeniaeformis*. Los datos obtenidos del número de cisticercos en hígado fueron analizados por medio de la prueba estadística de Mann-Whitney ($p= 0.0007$), encontrándose protecciones de 65 y 72%, que son estadísticamente significativas, las gráficas correspondientes a estos datos se muestran en las figuras 35 y 36.

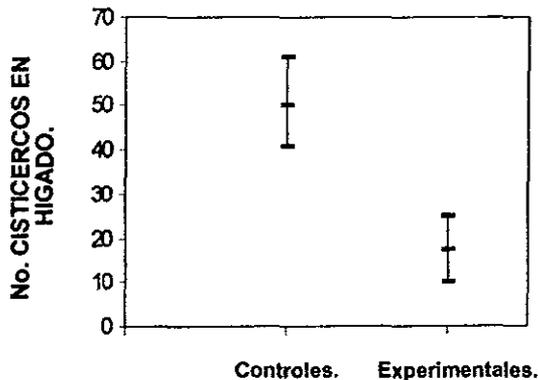


Figura 35. Primer ensayo de protección de GSH-Px frente a cisticercosis por *T. taeniaeformis*, mostrando un 65% de protección.

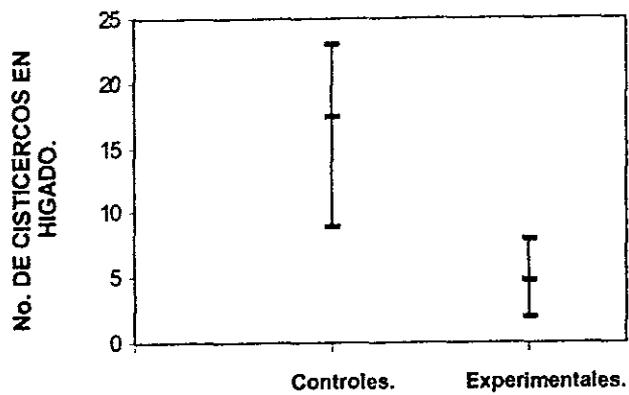


Figura 36. Segundo ensayo de protección de GSH-Px frente a cisticercosis por *T. taeniaeformis*, mostrando un 72% de protección.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como una medida adaptativa para sobrevivir en huéspedes inmunológicamente competentes los parásitos han desarrollado mecanismos de evasión inmune (Clinton y cols,1997), entre ellos se encuentran los relacionados a la capacidad de inactivar a diversas moléculas tóxicas producidas por las células de la respuesta inflamatoria. Enzimas antioxidantes como Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación-S-transferasa y Glutación peroxidasa han sido descritas en diversos protozoarios y metazoarios parasitarios (Callahan y cols. 1988, Vibanco y cols. 1999).

En *T. solium* existen evidencias sugerentes sobre la evasión inmune ejercida por sus cisticercos, mediante el antígeno B (paramioisina) (Plancarte y cols. 1982; Lacleite y cols. 1989), y el factor de metacestodo (FM) (Arechavaleta y cols. 1998) pero no se tienen datos referentes a GSH-Px. Sin embargo en *Schistosoma mansoni* además de haberse demostrado la actividad de GSH-Px, su presencia se correlacionó con una mayor protección al ataque inmunológico en los adultos que en las larvas, las cuales casi no presentaron actividad (Haiping y cols. 1997).

En el presente trabajo, se logró purificar parcialmente a la GSH-Px de los cisticercos de *Taenia solium* y evaluar su capacidad protectora, por la dificultad de conseguir cisticercos, solamente se pudo realizar todo el procedimiento en dos ocasiones.

Las referencias bibliográficas de los últimos diez años sobre purificación de esta enzima refieren, que los métodos bioquímicos más utilizados para purificarla en forma nativa son las cromatografías por columnas líquidas (Toribio y cols. 1996), por lo que la purificación se realizó utilizando como primer paso la columna de QAE-Cellex, en el ensayo realizado en las diferentes fracciones de la columna se detectó siempre la actividad enzimática en el segundo pico, es decir que la enzima es eluída con el gradiente salino, lo cual sugiere que la enzima tiene una carga global negativa.

Con respecto a la siguiente etapa cromatográfica, se eligió la resina de Fenilsefarosa-C1 4B, ya que por tener un grupo polar fenilo, es la recomendada para trabajar con moléculas no caracterizadas, en todas las columnas realizadas con esta resina también se detectó la actividad enzimática en el segundo pico prominente, es decir, el eluído al cambio de molaridad del buffer, lo cual indica que la enzima está en el grupo de las proteínas hidrofóbicas; es necesario mencionar que en ésta cromatografía aparecen pequeños picos de proteína, lo cual es debido a la diversidad hidrofóbica de las moléculas que se encuentran en el Sn3 y a que las moléculas con una baja fuerza de unión con los grupos fenilo que ya hallan interaccionado, podrían ser desplazadas posteriormente por competencia con moléculas con mayor afección para el mismo grupo y repetirse este fenómeno múltiples veces.

La última etapa cromatográfica se desarrolló en columnas de Sefadex G-200, en las tres cromatografías, que se realizaron, no obstante la diferencia de tamaño de las columnas utilizadas, se obtuvo un patrón protéico y enzimático semejante, debido a que la cantidad de proteína se mantuvo entre 2-3 mg/ ml de gel.

En la purificación de GSH-Px del lote B se utilizó una mayor cantidad de cisticercos (161.5g) en comparación con el lote A (45g), sin embargo se observó un

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

rendimiento bastante semejante para ambos, a excepción del rendimiento del Sn 5 que es mayor en el lote B, es decir, que la columna por haber sido de un tamaño mayor que la utilizada para el primer lote, favoreció la purificación de la enzima.

Con el ensayo de Paglia y Valentine (1967), realizado con unidades crecientes de Catalasa en múltiplos de 10, se descartó la posibilidad de que la actividad detectada en las columnas fuera debida a esta enzima, ya que los valores resultantes fueron parecidos a los del control negativo del ensayo; esta observación fue apoyada después con el uso de anticuerpos, ya que los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* no presentaron reacción cruzada con Catalasa de *Aspergillus niger*.

Para observar la capacidad de purificación de las columnas se requirió del uso de PAGE-SDS, las imágenes obtenidas sugirieron que la enzima presentaba un peso molecular de ~30 kDa, ya que en las fracciones sin AE de la columna de Sefadex G-200 del lote A, las cuales fueron analizadas como fracciones, no se encuentran bandas en ese peso a diferencia de las que si presentaron actividad, sin embargo debido a que esto sólo era una suposición, se recurrió al uso de geles de poliacrílamida nativos que revelaran la actividad de la enzima, esta técnica de tinción enzimática es la unión de las técnicas de Paglia y Valentine (1967) y Sun (1988) con algunas modificaciones. Después de haber determinado la cantidad idónea de muestra que es detectada por la técnica, se evaluaron las diferentes fracciones de las cromatografías, observándose en la de Sefadex G-200 una banda definida debido a que esta columna se encuentra más enriquecida de GSH-Px; el peso molecular que se observó para GSH-Px de *Taenia solium* es más bajo que el de GSH-Px de eritrocitos bovinos (84kDa), esto conllevó a la duda de si se trataba de GST y no de GSH-Px, pero esta idea se desechó debido a que GST no utiliza como sustrato al peróxido de hidrógeno presente en el ensayo

enzimático en PAGE-nativa, por lo que si se tratara de GST no se hubiera registrado ninguna actividad; sin embargo es necesario realizar estudios con inhibidores de GST para descartar absolutamente esta posibilidad. Los geles nativos también ayudaron a dilucidar el peso molecular de la enzima, ya que después de haber cortado las bandas con actividad y de electroeluir se obtuvo una banda prominente de ~30kDa.

El análisis de los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de *Taenia solium* frente a las fracciones de Fenilsefarosa y Sefadex G-200, permitieron observar una banda de aprox. 30 kDa y dos de alrededor de 60 kDa, que después fueron descartadas como albúmina de cerdo que debió haberse copurificado debido a que en los geles nativos sólo se separan las proteínas por su carga neta. La banda de menor peso molecular coincide con el peso establecido por Leid (en prensa) para GSH-Px de *T. taeniaeformis*, que es de 24.9 kDa en condiciones reductoras y 26 kDa cuando no se reduce.

Un hallazgo interesante fue el cruce inmunológico con GSH-Px de eritrocitos bovinos, lo que permite pensar que ambas enzimas son muy parecidas y que por lo tanto pueden ser reconocidas por los mismos anticuerpos, lo que permite afirmar la existencia de esta enzima en el parásito.

En cuanto a la evaluación de la capacidad protectora de GSH-Px de cisticercos de *T.solium* frente a la cisticercosis producida por *T. taeniaeformis* se encontró que los datos obtenidos en los ensayos de protección (65 y 72%), son estadísticamente significativos, ya que la prueba estadística aplicada (Mann-Whitney con $p=0.0007$) así lo reveló. La eficacia de protección sugiere que ambos parásitos por ser del género taenidae comparten la expresión de algunos epítomos capaces de despertar respuestas inmunes semejantes, por lo que al ser inmunizadas las ratas con la GSH-Px de cisticercos de *T.solium*, producen una respuesta humoral que evitará que las ratas desarrollen la subsecuente infección, tal vez no totalmente pero si en un porcentaje elevado.

10. CONCLUSIONES.

Se demostró la presencia de la enzima GSH-Px en los cisticercos de *Taenia solium*.

El peso molecular determinado que presentó la GSH-Px de *T.solium* en condiciones no reductoras fue de alrededor de 30 kDa, el cual es semejante al establecido por Leid y cols. para *Taenia taeniaeformis*.

Se evidenció la reacción cruzada entre los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de eritrocitos bovinos y la GSH-Px de *T. solium*.

GSH-Px de *T.solium* es bastante estable, ya que transcurrió un año desde que se obtuvieron los cisticercos hasta que se terminó su purificación parcial y la actividad de la enzima no se perdió.

GSH-Px de *T. solium* es un buen candidato para ser utilizado como vacuna, como se demostró en el modelo de *T. taeniaeformis*, sin embargo es necesario realizar ensayos de protección contra la cisticercosis por *T. solium*.

No existe reacción cruzada entre los anticuerpos de conejo anti GSH-Px de cisticercos de *Taenia solium* y Catalasa de *A. niger*.

11. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.

El hecho de que se halla encontrado GSH-Px en los cisticercos de *Taenia solium* y que en otros parásitos ésta enzima forme parte de un conjunto de moléculas capaces de ser utilizadas para evadir al sistema inmune del huésped, abre un camino de investigación sobre ella en esta parasitosis del hombre y del cerdo.

Inicialmente es necesario lograr su purificación total, después caracterizarla exhaustivamente por procedimientos bioquímicos, localizarla inmunohistoquímicamente en los tejidos de los diversos estadios del parásito, con esto último se podrá conocer en que momento y durante cuanto tiempo se expresa en este cestodo. Por otro lado, sería conveniente identificar por procedimientos de Biología Molecular al gen involucrado en su expresión. Si se logra clonar y expresar artificialmente dicho gen se podrán eficientizar diversas tareas de investigación sobre esta enzima, por ejemplo en los procedimientos de purificación, comparar su secuencia de nucleótidos con la de otros organismos e inclusive obtener material puro, específico y en cantidades suficientes para emplearlo en ensayos de vacunación.

12. ANEXOS.

ANEXO 1.

Equipo utilizado.

Balanza analítica Bosch Mod. S200.

Balanza semianalítica Sartorius Basic.

Baño *maria* Brinkmann, Mod. RMT Lauda.

Cámara para electroforesis Hoefer, HSI SE640.

Cámara para transferencia Trans-Blot Cell, Bio-Rad.

Centrífuga Beckman mod.J2-21.

Colector LKB- Bromma ,Mod. 2112 Redirac.

Espectrofotómetro Spectronic 21D.

Fuente de poder Hoefer, HSI PS250.

Negatoscopio.

Placa de agitación y calentamiento Corning, Mod.PC351.

Polytron (kinematon GmbH)

Potenciómetro Hanna Instruments Mod. HI 8521.

Sistema concentrador Amicon, Mod. 8200.

Ultracentrífuga Beckman I8-60 M.

Material.

Membrana de Nitrocelulosa, POTRAN BA83# 19840, 0.2 μ m.

Membranas para ultrafiltración AMICON, YM 10, 62mm.

Micropipetas.

Peines de 0.75 mm x 14 cm, Hoefer Scientific Instruments.

Pipetas serológicas graduadas.

Probetas.

Separadores para electroforesis 2cm X 8cm X 0.75mm, Pharmacia biotech.

Vasos de precipitados de diferentes capacidades.

Vidrios para electroforesis 18 x 8 cm, Pharmacia biotech.

Resinas cromatográficas.

QAE-cellex , 748-0430 Bio-Rad

Fenilsefarosa CL-4B, 17-0810-01 Pharmacia Biotech.

Sefadex G-200, SIGMA.

Material biológico.

Cisticercos de *Taenia solium*.

Anticuerpos de conejo anti-GSH-Px *Taenia solium*.

Anticuerpos conjugados HPR-Goat anti-rabbit IgG (H + L), Zymed.

Adyuvante Completo de Freund, SIGMA.

Enzimas.

Catalasa de *Aspergillus niger* , C-3515 SIGMA.

Glutación peroxidasa bovina, G-6137 SIGMA.

Glutación reductasa, G-4751 SIGMA.

Reactivos.

Acido acético Glacial, 121-2 Baker.

Acido bórico, 0084-20 Baker.

Acrilamida 161-0107 Bio-Rad.

Azida de sodio S-2002 SIGMA.

Azul de bromofenol, 161-0404 Bio-Rad.

Azul de Coomassie, 161-0400 Bio-Rad.

Bis-acrilamida 1685 830 Boehringer-Mannheim.

Cloruro férrico, F2877 SIGMA.

Cloruro de potasio, 3040-01 J.T.Baker.

Diaminobencidina, D-5637, SIGMA.

DTT , 197777 Boehringer-Mannheim.

EDTA, ED455 SIGMA.

Ferricianuro de potasio, P3667 SIGMA.

Reactivo de Fenol (Folin & Ciocalteu's) ,F-9252 SIGMA.

Fosfato de Potasio dibásico, 3252-01 J.T. Baker.

Fosfato de potasio monobásico, 3246 J.T. Baker.

Glicerol, 0854 AMRESCO.

Glicina, 161-0718, Bio-Rad.

Glutación reducido, G-4251 SIGMA.

Hidroperóxido de cumeno, C-0524 SIGMA.

Leche descremada Svelty.

Metanol, 9070-18 Baker.

NADPH, N-6505 SIGMA.

Peróxido de Hidrógeno al 30%, 7210 Merck.

Persulfato de Amonio, 161-0700, Bio-Rad.

Pesos moleculares preteñidos GIBCO-BRL 26041-020.

SDS, 161-0301 BIO-RAD.

TEMED 161-0800 Bio-Rad.

TRIS-HCl, 708976 Boehringer-Mannheim.

ANEXO 2. HOMOGENEIZACIÓN DE CISTICERCOS Y CROMATOGRAFÍAS.

Preparación de soluciones.

Cloruro de potasio 3M.

Cloruro de potasio (KCl) 11.84g

Disolver y aforar a 500 ml con agua destilada.

TRIS-HCl 0.1M pH 8.0.

TRIS base 12.1 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH con HCl, después aforar a 100 ml.

TRIS- HCl 0.01M pH 8.0.

Tomar 100 ml de TRIS-HCl 0.1M pH 8.0 y llevar a 1000 ml con agua destilada.

Fosfato de potasio dibásico 0.7 M pH 8.0.

Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) 172.4 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1000 ml.

Fosfato de potasio dibásico 0.1 M pH 8.0.

Tomar 143 ml de K₂HPO₄ 0.7M en 1000 ml de agua destilada.

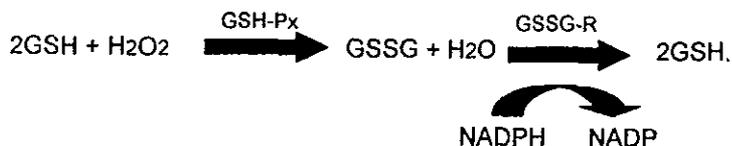
TRIS-HCl - Cloruro de sodio 0.5M.

Cloruro de sodio (NaCl) 4.38g

TRIS-HCl 0.01M pH8.0 150 ml

ANEXO 3. ENSAYO ENZIMÁTICO.

El ensayo enzimático es utilizado para establecer las fracciones en las cuales está presente la enzima, esta es detectada a través de una reacción acoplada a NADPH que es determinado por su absorbancia a 366 nm, así entre mayor sea la absorbancia, la actividad enzimática presente será menor y viceversa. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Preparación de soluciones

Fosfato de potasio monobásico 0.25M pH 7.

Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	8.5g
Etilendiamino tetraacetato disódico (EDTA)	232.5 mg
Azida de sodio	40.6 mg

Disolver en 100 ml de agua destilada y ajustar el pH con HCl antes de aforar a 250 ml.

Fosfato de potasio monobásico 0.25M pH 7.0 con DTT.

Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄ 0.25M pH 7.	100 ml
Ditiotreitol (DTT)	15.43 mg.

Glutación peroxidasa comercial.

Glutación peroxidasa (GSH-Px) de eritrocitos bovinos	2mg
Amortiguador de KH_2PO_4 sin DTT	5ml

Disolver y almacenar en alicuotas de 100 μ l a -70°C hasta su uso.

Control positivo de GSH-Px de eritrocitos bovinos.

Glutación peroxidasa	100 μ l
Fosfato de potasio KH_2PO_4 con DTT	1900 μ l

Mezclar.

Glutación reducido 1mM.

Glutación reducido (GSH)	3.07 mg
Agua destilada	10 ml

Preparar fresco para cada ensayo.

Nicotin adenín dinucleótido fosfato reducido 1mM.

Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH)	8.33 mg
Agua destilada	10 ml

Preparar fresco para cada ensayo.

Amortiguador de ensayo.

GSH 1mM	5 ml
NADPH 1mM	5 ml
Amortiguador de KH ₂ PO ₄ sin DTT	5 ml
Glutación reductasa	70 U

Ajustar con agua destilada a 20 ml y mezclar.

Hidroperóxido de Cumeno.

Hidroperóxido de cumeno	42.5 µl
Agua destilada	25 ml

Preparar justo antes de ser utilizado.

Metodología.

- Colocar en tubos 200µl de cada fracción a evaluar y adicionar 400µl de la mezcla de ensayo.
- Para el control positivo adicionar 1U de Glutación peroxidasa (Sigma) a 500µl de amortiguador de fosfatos con DTT más 400µl de Mezcla de ensayo.
- Para el control negativo adicionar 400µl de mezcla de ensayo y 500µl de amortiguador de fosfatos con DTT.
- Incubar todos los tubos a 37°C durante 15 min.
- Adicionar a todos los tubos (experimentales y controles) 100µl de la solución de hidroperóxido de cumeno.
- Mantener los tubos a temperatura ambiente por 20 min. y leer inmediatamente su absorbancia a 366 nm, utilizando celdas de cuarzo.

ANEXO 4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.

Preparación de soluciones.

PBS pH 7.2.

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.69 g

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 0.71 g

Cloruro de sodio (NaCl) 4.25 g

Disolver en 300 ml de agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 500 ml.

Hidróxido de sodio 0.1N.

Hidróxido de sodio (NaOH) 0.4 g

Disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Carbonato de sodio anhidro al 2%.

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) 2 g

Disolver y aforar a 100 ml con NaOH 0.1N.

Tartrato de sodio y potasio al 2%.

Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2 g

Disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Sulfato cúprico al 1%.

Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 g

Disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución de Lowry.

Carbonato de sodio anhidro al 2% en NaOH 0.1N 9.8 ml

Tartrato de sodio y potasio al 2% 0.1 ml

Sulfato cúprico al 1% 0.1 ml

Agitar.

Solución de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:2).

Reactivo de Folin-Ciocalteu 2 ml

Agua destilada 2 ml

Preparar justo antes de ser utilizado.

Metodología.

- Para la curva patrón se manejan 8 tubos con 1 ml de PBS y se realizan diluciones sucesivas de albúmina sérica bovina (1mg/ml).
- El blanco únicamente contiene PBS.
- Se deben evaluar varios volúmenes de la muestra a analizar debido a que no se conoce la concentración.
- Todos los tubos deben de contener un volumen final de 1 ml.
- A todos los tubos (curva, blanco y experimental) se les adicionan 4 ml de la solución de Lowry, agitar e incubar por 10 min. a temperatura ambiente.
- Adicionar 0.4 ml de la solución del reactivo de Folin-Ciocalteu, agregar rápidamente y con agitación.
- Incubar a Temperatura ambiente por 30 min, leer absorbancia a 600 nm.
- Realizar la gráfica de la curva patrón (concentración vs absorbancia) e interpolar los valores de absorbancia de la muestra, expresar la concentración en gramos por mililitro.

ANEXO 5. ELECTROFORESIS.

Preparación de soluciones.

Acrilamida 40% / bis acrilamida 1%.

Acrilamida 40 g

Bisacrilamida 1 g

Disolver y aforar a 100 ml con agua destilada; almacenar protegida de la luz a 4°C.

Acrilamida 12% / bisacrilamida 1.2%.

Acrilamida 12 g

Bisacrilamida 1.2 g

Disolver y aforar a 100 ml con agua destilada; almacenar protegida de la luz a 4°C.

Amortiguador para preparar geles

TRIS-HCl 4X pH 9.18.

TRIS-base 205.6 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y ajustar el pH, posteriormente aforar a 1000 ml.

Amortiguador para corrida (1X).

500 ml de la solución TRIS-HCl 4X y aforar a 2 litros con agua destilada.

Amortiguador de TRIS-HCl y Acido bórico pH 8.64.

Acido bórico	2.47 g
TRIS-base	4.92 g

Ajustar el pH antes de aforar a 1000 ml con agua destilada ; para la corrida se adicionan 5 ml de SDS a 500 ml de amortiguador.

Solución de TEMED.

TEMED	250 μ l
Agua destilada	1.8 ml
Agitar.	

Persulfato de amonio.

Persulfato de amonio	25 mg
Agua destilada	3 ml

SDS al 10%.

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10 g
Disolver con agua destilada y aforar 100 ml.	

Amortiguador de TRIS-HCl 0.05M pH 6.8.

TRIS-base	121 mg
-----------	--------

Ajustar el pH antes de aforar a 20 ml con agua destilada.

Coktail para aplicar las muestras en el gel.

SDS	1 g
EDTA	7.4 mg
Glicerol	1 ml
Azul de bromofenol	20 mg

Mezclar todo perfectamente.

Amortiguador de TRIS-HCl pH 6.14.

TRIS-base	2.62 g
-----------	--------

Disolver en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH hasta 7 con una solución 2M de H₂SO₄; realizar una dilución 1:100 de la solución de H₂SO₄ y terminar de ajustar el pH hasta 6.14. Aforar a 100 ml con agua destilada.

Colorante de Coomassie.

Colorante de Coomassie	1.25 g
Metanol al 50%	454 ml
Acido acético al 7%	46 ml

Disolver y filtrar con vacío.

Acido acético al 10%.

Acido acético glacial	100 ml
-----------------------	--------

Adicionar 900 ml de agua destilada y mezclar.

Preparación de geles.

Se forman los geles con dimensiones de 0.75 X 8 X 16 cm, utilizando placas de vidrio de 18 x 8 cm con separadores de 0.75 cm colocados en una cámara para 10 geles (multicaster HSI, SE 600 SERIES). Se cierra la cámara y se le conecta en su base un sistema de vasos comunicantes de 150 ml cada uno (HSI,SG SERIES). Con la ayuda de una bomba peristáltica se hacen pasar 50 ml de una solución de etanol al 50% y azul de bromofenol al 1% y en forma continua las soluciones de acrilamida, mantenidas en agitación ligera y permitiendo la comunicación entre los vasos. Se dejan polimerizar los geles toda la noche a temperatura ambiente, se abre la cámara y se sacan los geles; se almacenan en un recipiente con agua destilada y se mantienen a 4°C por no más de tres semanas hasta su uso.

Las dos soluciones con diferente concentración de acrilamida para los geles se preparan de la siguiente manera:

	Concentración de acrilamida	
	5%	22.5%
Agua destilada	30.88 ml	8.44 ml
Amortiguador 4X	12.99	12.99 ml
Acrilamida	6.49 ml	29.24 ml
TEMED	0.810 ml	0.810 ml
Persulfato de Amonio.	0.8 ml	0.49 ml

A cada gel le queda un espacio en el extremo superior de aproximadamente 2 cm en donde se coloca el gel superior con el peine que formará los carriles para cada muestra, por lo tanto, la preparación de la solución de acrilamida se realiza de la siguiente manera:

Gel superior (concentrador).

Acrilamida 12%	2 ml
Amortiguador pH 6.14	2 ml
Agua destilada	4 ml
Persulfato de amonio	150 μ l
TEMED	6 μ l

Mezclar todo y vaciar sobre el gel inferior, colocar el peine para formar los carriles y esperar a que polimerice.

Metodología.

- Se coloca el amortiguador en la cámara inferior y se ensambla el gel en la cámara superior, se adiciona el amortiguador de TRIS-HCl y ácido bórico y se procede a colocar las muestras, previamente mezcladas con cocktail, se colocan también marcadores de peso molecular.
- Se coloca la tapa con los electrodos a la cámara superior y se aplican 40 MA.
- Una vez terminada la electroforesis se coloca el gel en una solución de colorante de Coomassie por 24 hrs y se destiñe con ácido acético al 10%, o si es necesario se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

Nota: Al manejar soluciones de acrilamida - bis-acrilamida deben utilizarse guantes debido a que son neurotóxicas.

ANEXO 6. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Transferencia de geles a Nitrocelulosa.

Preparación de soluciones.

Amortiguador de transferencia.

Amortiguador 4X (utilizado para la electroforesis) 2400 ml

Metanol absoluto 600 ml

Mezclar.

Metodología.

- Se prepara un "Sandwich" con el gel y la nitrocelulosa como a continuación se describe:
Rejilla blanca + esponja + papel filtro + Nitrocelulosa + Gel con proteínas + papel filtro + esponja + rejilla negra.
- Se aseguran las rejillas y se introducen en la cámara de transferencia, la rejilla negra debe quedar del lado del ánodo. Se adiciona el amortiguador de transferencia hasta cubrir el "Sandwich" y se coloca en agitación (agitador magnético). Se coloca la tapa con los electrodos y se aplica n 1.5 amperes por 1 hora.
- Al terminar la transferencia se marca el límite del gel en la nitrocelulosa y se procede a cortar tiras de 2 mm aprox.

ANEXO 7. EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS.

Preparación de soluciones.

PBS-Tween 20 al 0.3%.

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	0.69 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	0.71 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4.25 g
Tween 20	1.5 ml

Antes de adicionar el tween 20 ajustar el pH a 7.2 con HCl, adicionar el Tween 20 y aforar a 500 ml con agua destilada.

PBS.Tween 20 al 0.35 - leche descremada al 5%.

Leche descremada 5 g

Disolver y aforar a 100 ml con PBS-Tween 20 al 0.3%.

Conjugado anti conejo marcado con peroxidasa.

Dilución 1:500.

No. de tiras.	5	10	15
Conjugado anti conejo	5 μ l	10 μ l	15 μ l
PBS-Tween 20	2495 μ l	4990 μ l	7485 μ l

Dilución 1:1000.

No. de tiras.	5	10	15
Conjugado anti conejo	2.5µl	5µl	7.5µl
PBS-Tween 20	2497.5µl	4995µl	7492.5µ.

Nota: Es necesario realizar el ajuste para el número de tiras a evaluar.

Solución stock de diaminobencidina (50 mg/ml).

PBS 20 ml

Diaminobencidina 1 g

Agitar durante 30 mín. con agitador magnético, alicuotear y almacenar a -20°C protegida de la luz.

Sustrato de Diaminobencidina.

No. de tiras	5	10	15
PBS (ml)	2.5	5	7.5
Stock de DAB (µl)	25	50	75
H ₂ O ₂ al 3% (µl)	2.5	5	7.5

Nota: Es necesario realizar el ajuste para el número de tiras a evaluar.

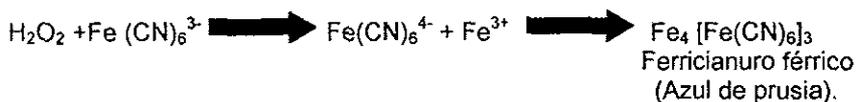
Metodología.

- Incubar las tiras de Nitrocelulosa con la muestra de suero más leche descremada en PBS-Tween 20, de acuerdo a la dilución a probar. Se incuba por 1 hora en agitador de columpio.
- Lavar las tiras con PBS-Tween 20, 3 veces de 5 min. cada una.
- Adicionar el conjugado de acuerdo a la dilución correspondiente. Incubar por 1 hora en movimiento.
- Lavar las tiras con con PBS-Tween 20, 3 veces de 5 min. cada una.
- Lavar las tiras con PBS sólo, 2 veces de 5 min. cada una.
- Adicionar el sustrato de DAB e incubar por 10 min. con movimiento.
- Detener la reacción con agua destilada.
- Realizar tres o cuatro lavados con agua destilada.
- Dejar secar las tiras y pegarlas entre dos acetatos para su conservación.
- En todos los pasos se maneja un volumen final de 500 μ l.

Nota: Al trabajar con Diaminobencidina deben utilizarse guantes debido a que es cancerígena, por lo que los desechos de DAB deben ser inactivados con Hipoclorito de sodio.

ANEXO 8. PAGE-NATIVA Y TINCION ENZIMATICA.

La técnica de tinción enzimática en geles nativos (Zimogramas) es de gran utilidad para detectar la posición de la enzima en él; sin embargo, debido a que es nativo, no es posible establecer con certeza su peso molecular. La reacción que se lleva a cabo en la tinción es la siguiente:



Preparación de soluciones.

Amortiguador de TRIS-Glicina 5x.

TRIS-base	12 g
Glicina	57.6 g

Adicionar 500 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.5 con HCl, aforar a 1000 ml.

Amortiguador de TRIS-Glicina 1x para las cámaras.

Amortiguador de TRIS-Glicina 5x	200 ml
Agua destilada	800 ml

Mezclar.

Solución de Cloruro férrico al 2%.

Cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2 g
---	-----

Disolver con agua destilada y aforar a 100 ml.

Solución de Ferricianuro de potasio al 2%.

Ferricianuro de potasio ($\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$) 2 g

Disolver con agua destilada y aforar a 100 ml

Metanol al 5%.

Metanol absoluto 5 ml

Agua destilada 95 ml

Mezclar.

Mezcla de Ensayo.

GSH reducido (12 mM) 55.3 mg

NADPH (600 μM) 7.5 mg

Glutación reductasa (GR) 2.07 U

Agua destilada 15 ml

Preparar justo antes de ser utilizada.

Solución de H_2O_2 1:1000.

H_2O_2 15 μl

Aforar a 15 ml con agua destilada, preparar justo antes de ser utilizada.

Preparación del gel inferior.

Acrilamida al 30%-bis-acrilamida 0.8%	3.6 ml
TRIS-base pH 8.8	3.0 ml
Agua destilada	5.8 ml
Persulfato de amonio (10 mg/ml)	250 μ l
TEMED	15 μ l

Preparación del gel superior.

Acrilamida al 30%-bis-acrilamida 0.8%	1.3 ml
TRIS-base pH 6.8	325 μ l
Agua destilada	5.8 ml
Persulfato de amonio (10 mg/ml)	100 μ l
TEMED	5 μ l

Metodología.

- Una vez polimerizado el gel inferior se coloca la mezcla del gel superior junto con el peine y se espera a que polimerice.
- Se coloca el gel en la cámara inferior ya montado en la cámara superior, ambas cámaras contienen el amortiguador de TRIS-Glicina 1x
- Para colocar las muestras dentro del gel únicamente se mezclan con glicerol.
- Se colocan los electrodos en la cámara superior y se aplican 40 MA .
- La electroforesis termina cuando el frente de colorante llega al límite del gel, éste se desprende de los vidrios y se coloca por 5 minutos en metanol al 5%.
- El gel se enjuaga con agua destilada.
- Decantar el agua y adicionar la mezcla de ensayo, mantener el gel por 5 minutos.
- Decantar la mezcla de ensayo y lavar con agua destilada.
- Adicionar la solución de Peróxido de hidrógeno 1:1000 y dejarla por 15 min.
- Lavar y adicionar la solución al 1% de Cloruro Férrico-Ferricianuro de potasio.
- Parar la reacción con agua destilada.

Nota: Es necesario utilizar guantes cuando se prepare y adicione la mezcla de Cloruro férrico-Ferricianuro de potasio, debido a su naturaleza oxidante.

13. BIBLIOGRAFIA.

Abbas KA. Inmunología. España: Interamericana-McGraw-Hill, 1995:369-376

Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annual Review Immunol* 1984; 2: 283-318.

Allan JC, García-Noval J, Torres AR, Yurita P, Fletes C, Mata F. Epidemiology intestinal taeniasis in four rural Guatemalan communities. *Annal Trop Med Parasitol* 1996; 90:157-165.

Aluja A, González D, Rodríguez CJ, Flisser A. *Histological description of tomographic images of Taenia solium cysticerci in pig brains.* *Clinical Imagin* 1989; 13: 292-298.

Ansari A, Williams JF. The eosinophilic response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. *J Parasitol* 1976;62: 737-744.

Arechavaleta F, Molinari JL, Tato PA. *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 1998; 84: 117-122.

Birnboim HC, Kanabus-Kaminska M. The production of DNA strand break in human leukocytes by superoxide anion may involve a metabolic process. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 82: 6820-6824.

Brophy PM, Pritchard DI. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance?. *Parasitol today* 1992; 8(12): 419-422.

Callahan HL, Crouch RK, James ER. *Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?* *Parasitol today* 1988; 4:218-225.

- Cañedo L, Lacleste JP, Morales E. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Cysticercosis: present stage of knowledge and perspectives. N.Y: Academic Press, 1982:363-373.
- Clarck IA, Hunt NH, Cowden WB. Oxygen-derived free radical in the pathogenesis of parasitic disease. *Adv Parasitol* 1986; 25:1-43.
- Clinton A, Robinson P, Kuhn R. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol Basel, Karger* 1997; 66:209-230.
- Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I. y cols. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J parasitol* 1985;71(5):535-541.
- Correa D, Tovar A, Espinoza B, Plancarte A. Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito. En: Flisser A, Malagón F. Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. México: Edit. Limusa, 1989:31-43.
- Chaudiere J, Tappel A. Purification and characterization of selenium-Glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch Biochem Biophys* 1983;226:448-457.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bull* 1993; 49 (3):481-493.
- Deutscher PM. Methods in enzymology, Guide to protein purification. Vol. 182. USA: Academic Press, 1990: 309-342.
- Díaz S, Candil A, Peraza V, Zazueta M, Medina M, Lozano R, Willms K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of México. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45(4):522-531.

Díaz ZJ, Hicks GJ. Bioquímica. 2ª ed. México: Edit. Interamericana - McGraw-Hill, 1995:715-723.

Dixon HBF, Lipscomb FM. Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. Privy Council Med Res. Special Rep. Serial No 229 1961;38-42.

Douglas K. Mechanism of action of Glutathione dependent enzymes. Adv Enzymol 1987; 59:143-146.

Eckert J. Interacciones between cestodes and their vertebrate host, en Toft C, Aeschlimann A, Bolis N. Parasite-Host Associations, coexistence or conflict?. London: Oxford University Press, 1991: 201-227.

Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am J Pathol 1982; 107: 396-418.

Fesht A. Enzyme structure and mechanism, 2ª. ed. N.Y. : W.H. Freeman and Company, 1985:115-116.

Flisser A. Cysticercosis. Parasitol 1990;12(3):50-54.

Flisser A. Relación huésped-parásito en la cisticercosis humana y porcina. Gaceta Médica Méx 1987; 123(7-8):157-162.

Flisser A, Espinoza B, Tovar A, Plancarte A, Correa D. Host-parasite relationship in cysticercosis. Immunologic study in different compartments of the host. Vet Parasitol 1986; 20:95-102.

Flisser A, Larralde C. Cysticercosis. En: Walls KW, Schnatz PM, Immunodiagnosis of parasitic diseases. NY: Academic Press, 1986: vol. 1:109-161.

- Flisser A, Madrazo I, Plancarte A, Schantz P, Allan J, Craig P, Sarti E. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniacidal dose of praziquantel. *Lancet* 1993; 342: 748.
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis Humana. México:Edit. El Manual Moderno,1997:1-65.
- Flisser A, Plancarte A, Correa D. *Taenia solium* cysticercosis: a review. *Res Rev Parasitol* 1991; 51(1-4):17-23.
- Flisser A, Plancarte A, Correa D. Diagnóstico, tratamiento y mecanismos de evasión inmune de la cisticercosis por larvas de *T. solium* en seres humanos y cerdos. En: Quiroz H. *Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre*. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Div. de sist. de universidad abierta S.U.A. 1991:383-411.
- Flohé L. The selenoprotein Glutathione peroxidase. En: Dolphin D, Poulson R, Avramovic O. *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. New York: John Wiley and sons., 1988 A; part A:644-708.
- Flohé L. Glutathione peroxidase. En : Simic MG, Taylor KA, Ward FJ, Somtag CV. *Oxygen radicals in biology and medicine*. Basic Life Sciences New York: Plenum press, 1988 B; vol. 49:663-668.
- Goldsmith R, Heyneman D. *Parasitología y Medicina tropical*. México: El Manual Moderno, 1995; 633.
- González A, Marquez-Monter H. Ultraestructura del cisticerco cellulosae y racemosus. Reunión conjunta de la Sociedad Mexicana de Neurología y Psiquiatría, A. C. Minnesota Psychiatric society y Minnesota society of Neurological Sciences. México, D. F. 1967

- Gregory EM, Fridovich I. Visualization of catalase on acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1974; 58: 57-62.
- Haiping M, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni*: The developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp parasitol* 1997; 86:68-79.
- Hammerberg B, Williams J. Interaction between *Taenia taeniaeformis* and the complement system. *J Immunol* 1978; 120: 1033-1038.
- Hyslop PA, Hinshaw DB, Hasley WA. Mechanism of oxidant mediated cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263: 1665-1675.
- Ito A, Bogh H, Lightowers MW, Mitchell GF, Takami T, Karniy M, Onitake K, Rickard MD. Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1991; 44: 43-52.
- Laclette JP, Rodríguez M, Landa A, Arcos L, De Alba P, Mancilla R, Willms K. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. *Acta Leiden* 1989; 57:115-122.
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol.* 1992; 148: 124-128.
- Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685.
- Leid W, en prensa.

- Lehninger A. Introducción a la bioquímica. México: Ciencias para una educación popular 1986: 1013.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265-275.
- McGonigle S, Dalton JP, James ER. Peroxidoxins: a new antioxidant family. Parasitol today 1998; 14(4):139-145.
- Moyao LH. Purificación y caracterización de la Glutación peroxidasa (GSH-Px) de cisticercos de *Taenia crassiceps*. Tesis de licenciatura, Fac. de ciencias, UNAM. México, 1991.
- Mills GC. The purification and properties of Glutathione peroxidase of Erythrocytes. J Biol Chem 1959; 234:502-506.
- Mkoji GM, Smith JM, Prichard RK. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of Hydrogen peroxide and oxygen free radicals. Int J Parasitol 1988; 18:661-666.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. México: Edit. El manual moderno, 1988: 50-60.
- Nare B, Smith JM, Prichard RK. *Schistosoma mansoni*: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development. Exp parasitol 1990; 70: 389-397.
- Nemeth Y, Juhasz S. Properties of a trypsin and chymotrypsin inhibitor secreted by larval *Taenia pisiformis*. Int J Parasitol 1981; 11: 137-144.

Nieto D. Historical notes on cysticercosis, en Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. NY:Academic press, 1982: 1-20.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte Glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169.

Piessens WF, Ratiwayanto S, Palmieri JR, Piessens PW, Koiman Y, Dennis DT. Antigen specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis with *Brugia malayi*. New Engl J Med 1980; 302: 833-837.

Plancarte A, Flisser A, Larralde C. Fibronectinlike properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium* en Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. NY:Academic press, 1982: 453-463.

Rabiela MT, Rivas HA, Rodríguez IJ. 1979. Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. Patología 1979; 17:119-136.

Rabiela MT, Rivas HA, Rodríguez IJ. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, en Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. NY:Academic press, 1982: 179-200.

Roche C, Liu JL, LePresle T, Capron A, Pierce RJ. Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 1996; 75:187-195.

Romero CR. Microbiología y parasitología humana. México:Edit. Médica panamericana, 1993: 574-582.

- Rubio RM. Estudio del metabolismo de radicales libres de *Taenia crassiceps*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.1997.
- Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulate granulocytes. An *in vitro* model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 1978;61, 1161-1167.
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K. Selenoprotein P in Human Plasma as an Extracellular Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase. *J Biol Chem* 1999; 274: 2866-2871.
- Sartí E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública Méx* 1997 A; 39(3): 225-231.
- Sartí E. Taeniosis y cisticercosis en México. Capítulo 2, en Arriagada C, Nogales J, Werner AB. *Neurocisticercosis; aspectos epidemiológicos, patológicos, inmunológicos clínicos, imagenológicos y terapéuticos*. Chile:Arrynog ediciones, 1997 B:5-21.
- Sartí E, Flisser A, Schantz P, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, y cols. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in México. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56(2):127-132.
- Sartí E, Gutierrez EI. La taeniasis y cisticercosis en México. *Salud Pub Mex* 1986; 28:556-563.
- Sartí E, Schantz P, Aguilera J, López A. Epidemiologic observations in a rural community of Michoacán state, México. *R Soc Trop Med Hyg* 1994; 68:49-52

- Sarti E, Schantz P, Gómez DH, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a mexican village. *Trop Med Parasitol* 1988; 39: 194-198.
- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, López A, Roberts J, y cols. Prevalence and risk factors for *T. solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, México. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 46(6): 677-685.
- Schantz PM, Moore A, Muñoz JL, Hartman B, Schoefer J, Aron A, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York city. *New Engl J Med* 1992; 327: 692-695.
- Seth RK, Saini AS, Jaswal TS. *Plasmodium berghei*: oxidant defense system. *Exp parasitol* 1985; 60:414-416.
- Smithers SR, Terry RJ. The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol* 1976;14: 399-422.
- Spallholz J. Selenium and Glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system, en Bendich A, Phillips M, Tengerdy RP. *Antyoxidant nutrients and immune functions. Advances in experimental medicine and biology. New York: Plenum press, 1990; 262:145-158.*
- Sun Y, Elwell JH, Oberley LW. A simultaneous visualization of the antioxidants enzymes Glutathione peroxidase and catalase on polyacrylamide gels. *Free Rad Res Commun* 1988; 5:67-75.
- Suquet C. Isolation and partial characterization of *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol* 1984; 14(2):165-172.
- Tappel A. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods in Enzimol* 1978; 53:506-513.

- Tappel ME, Chaudiere J, Tappel AL. Glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp Biochem Physiol* 1982; 73B:945-949.
- Toribio F, Martínez-Lara E, Pascual P, López-Barea J. Methods for purification of Glutathione peroxidase and related enzymes. *J Chromatograph B* 1996;684:77-97.
- Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984; 72:313-340.
- Tsang VC, Bers GE, Hancock. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB). En: Ngo TT, Lenhoff HM. Enzyme mediated immunoassay. USA:Plenum Publishing corp. 1985.
- Tsang VC, Peralta JM, Simons AR. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. En: Langone JJ, Vunakie HV. Methods in enzymology. Immunochemical techniques. N.Y. :Academic Press. 1983: 377-391.
- Ursini F, Maiorino R, Brigelius-Flohé K, Aumann D, Rover A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymol* 1995; 152:38-53.
- Vibanco N, Jiménez L, Merchant MT, Landa A. Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol* 1999; 85(3): 448-453.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymol* 1981;77:325-332.
- White CA. Neurocysticercosis: A major cause of neurological disease world wide. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 101-115
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann WA. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 1971; 44: 301-305.

Yoshino K. Studies on the postembryonal development of *Taenia solium*. Parte III. J Med
Ass Formosa 1933; 32:166-169.