



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRÉS OXIDATIVO EN CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: B I Ó L O G A P R E S E N T A : MAYRA GISELA MELÉNDEZ HERNÁNDEZ

DR. JUAN PEDRO LACLETTE



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



290638

FACULTAD DE CIENCIAS Abril del 2004



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" *Estrés oxidativo en cisticercos de Taenia crassiceps* "

realizado por *Mayra Gisela Meléndez Hernández.*

con número de cuenta *9550376 -7* , pasante de la carrera de *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Juan Pedro Laclette San Román.

Propietario

M. en IBB. Laura del Carmen Vargas Parada.

Propietario

Dr. Abraham Landa Piedra.

Suplente

Dr. Guillermo Salgado Maldonado.

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

ESCUELA DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de la carrera de *Biología*.
Dr. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A la UNAM, por darme la oportunidad de ingresar y acceder a sus actividades multidisciplinarias que le dan prestigio y nos forman como profesionistas y mejores personas.

A la Fac. de Ciencias, a mis profesores y compañeros: ustedes tienen la culpa de lo que soy. Gracias por regalarme un cachito de sus conocimientos, experiencias y peripecias. Como imaginar mi facultad sin las aulas, sin pulpo, sin cinito, sin cubículo (auch, si se puede!), sin pasto, sin prometeo, sin amoxcalli, y lo mas importante, sin todas las personas que estuvieron presentes en mi carrera.



A mi mamá por traerme al planeta azul y mostrarme el camino para hacer realidad mis sueños. Por tu esfuerzo inigualable, tu ejemplo y amor a la vida he llegado hasta aquí. Paciencia y fuerza ama' que se va a poner bueno.

A mi familia y amigos de corazón, por disfrutar de la vida y motivarme a continuar.

Agradecimientos

Es difícil mencionar a todas las personas que de alguna manera han influido en mi formación universitaria, disculpen si en las siguientes líneas se me vuelan sus nombres, pero para ustedes también va dirigida.

A mi jurado formado por el Dr. Juan Pedro Laclette, a la M. en IBB. Laura Vargas-Parada, al Dr. Abraham Landa, al Dr. Guillermo Salgado y al Dr. Luis Felipe Jiménez que con su revisión a este escrito han mejorado de gran manera su comprensión, gracias por sus comentarios.

A Laura Vargas, por confiar en mi capacidad (jaja) y ofrecerme trabajar con ella. Este manuscrito es el resultado de laborar en equipo durante dos años, juntas descubrimos la interacción maestro – aprendiz ☺. Gracias por ser mi maestra, por enseñarme las bases de la parasitología molecular, por ayudarme a aterrizar las ideas, por enseñarme varias técnicas en el laboratorio, por permitirme jugar con estas, por tenerme paciencia, por escucharme, por su amistad y por su ejemplo de que un científico no sólo es un ratoncito de laboratorio, sino más ☺ !!

A Juan Pedro Laclette por creer en mí y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias por el interés, consejos y tiempo que nunca han faltado para mi formación como científica, estudiante y mujer. Entre sus múltiples charlas me ha mostrado el papel que desempeña la comunidad científica en el desarrollo de la universidad y de la sociedad, el amor a la ciencia, el cariño a la UNAM y al trabajo de calidad. Nunca olvidaré su ayuda para la participación en congresos y cursos, además de ofrecerme la maravillosa experiencia de aventurarme en otro país (y laboratorio). Nuevamente mil gracias por enseñarme a afrontar los cambios, los retos y por perder el miedo a la gran aventura de vivir!!!

A los que se encuentran enfrente de las PC's, llámese mis compañeros del laboratorio: Anita, Carlos, Celia (arriba Ciencias!!), Dayanita (por fungir cuasi chaperona en el orden del lab y por ayudarme en todo, hasta en la corrección de mi tesis), Haydée (arriba Ciencias!!), Julio Cesar (gracias por tus consejos y echarme la mano), Maru (no importa que no estés, me ayudaste en la masacre murina), Paty, Pavel (por emerger de tu laboratorio en las noches que salía tarde), Pedro, Pepe (por retornar del mas allá y dejar plasmada una parte de tu ser en internet), Rimma; y de la Mac a Martincillo (por dejarme usar la compu, por sus consejos y futuras ayudantías). Gracias por ser como mi familia académica, por su alegría en el lab y por ayudarme en todo.

A mis papás por mantenerme durante dos décadas (y más), por alumbrar mi camino en la vida, por permitirme crecer, por mantener en mi cara una sonrisa y por absolutamente todo.

Para mis amigos biólogos por el amor a la naturaleza; a los rayas: ustedes saben muy bien lo que esto significa, por las alegrías (un motivo más para decir salud), desveladas, paseos (razones sobran), enojos, charlas (sin objetivo previsible), festejos (sin motivo aparente), llantos, bautizos, travesuras (quién, yo?) y demás (ejem...). A los bicigodos por compartir la adicción al ciclismo y demás (ejem...). A mis amigas de la prepa: Julia, Ale, Erika y Cozu, el camino es largo y todavía lo que nos falta!, por su amistad sin igual. Va para todos ustedes. Hasta que el destino nos alcance!

A todas las personas que me facilitaron la obtención de material bibliográfico, de laboratorio y papeleo: Mary, Lic. Brito. Sra. Prima, Violeta, Eva y a los vigilantes!

Soy muy feliz,

Gracias a aquel instante que me permito vivir !!!,
pero bueno: yo no lo se de cierto sólo lo supongo...

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	2
A. EL PARÁSITO.....	2
1. <i>Ciclo de vida</i>	2
2. <i>El cisticerco</i>	4
B. RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO	5
C. RESPUESTA AL ESTRÉS.....	7
<i>La respuesta de estrés en los parásitos</i>	7
D. ESTRÉS OXIDATIVO.....	8
1. <i>Especies reactivas de oxígeno</i>	8
a. Superóxido.....	9
b. Peróxido	10
2. <i>Enzimas antioxidantes</i>	10
a. Superóxido dismutasa.....	10
b. Catalasa	11
c. Glutatión peroxidasa.....	11
d. Peroxiredoxinas.....	12
E. ESTRÉS OXIDATIVO, <i>Taenia</i> Y OTROS HELMINTOS	13
F. LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA REACCIÓN INFLAMATORIA	14
II. OBJETIVO	16
METAS	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
A. CISTICERCOS	16
B. RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO.....	17
C. MARCAJE METABÓLICO	17
D. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS	17
E. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD E INFECTIVIDAD DE LOS CISTICERCOS	18
F. INMUNOTRANSFERENCIA EN PAPEL DE NITROCELULOSA.....	18
G. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	19
IV. RESULTADOS	20
DAÑO A LOS CISTICERCOS POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	20
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	21
ENSAYO DE VIABILIDAD	22
ENSAYO DE INFECTIVIDAD.....	23
V. DISCUSIÓN.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	32
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	32

RESUMEN

La cisticercosis es endémica de México y de otros países de América Latina, Asia y África. La forma más frecuente de la enfermedad es causada por la infección del sistema nervioso central con la larva (cisticerco) de *Taenia solium*, padecimiento conocido como neurocisticercosis.

El cisticerco puede sobrevivir en el sistema nervioso durante varios años, lo que sugiere que existe un equilibrio en la interacción huésped-parásito. Alrededor de los cisticercos, el huésped desarrolla una reacción inflamatoria de variable intensidad que puede ir desde escasa, con poco infiltrado celular alrededor de parásitos viables, hasta muy intensa alrededor de parásitos semidestruidos.

Entre los mecanismos de defensa que tiene el huésped contra los organismos patógenos, está la liberación de agentes oxidantes (H_2O_2 , O_2^*) producidos por algunas células del sistema inmune como eosinófilos y fagocitos, lo que sugiere que los cisticercos son expuestos a estrés oxidativo.

Con base a estos antecedentes, en este trabajo se investigó el efecto de la exposición a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el cisticerco. Como modelo de laboratorio se utilizó a *Taenia crassiceps*. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de H_2O_2 en la movilidad, síntesis proteica, viabilidad e infectividad de los cisticercos. Mediante experimentos de marcaje metabólico se analizó la síntesis proteica, la viabilidad por medio de un ensayo enzimático y la infectividad se determinó por la capacidad reproductiva del parásito en ratones.

Los resultados obtenidos muestran que el cisticerco de *T. crassiceps* es muy sensible al H_2O_2 . Concentraciones mayores a $1.4 \mu M$ son letales, a diferencia de lo reportado para el céstodo *Echinococcus granulosus* el cual resiste concentraciones de $20 \mu M$ de H_2O_2 . A concentraciones mayores de $1 \mu M$ ya no son infectivos aunque conservan la integridad de la pared vesicular y muestran actividad en el ensayo enzimático. A diferencia de otros parásitos, no se encontró una respuesta al estrés oxidativo, caracterizada por la síntesis de proteínas específicas, lo que podría explicar la extrema sensibilidad de este parásito al H_2O_2 .

I. INTRODUCCIÓN

A. EL PARÁSITO

Se estima que 4 millones de personas en el mundo son portadoras del céstodo adulto de *Taenia solium*, y la prevalencia parece ir en aumento. Por cada paciente con un céstodo adulto, existen 10 o más personas infectadas con la forma larvaria del parásito¹. A la infección por el adulto se le conoce como teniosis mientras que la ocasionada por la forma larvaria se le denomina cisticercosis. En 1993, se reportó que anualmente mueren en el mundo 50 mil personas por infección con la forma larvaria², sin embargo, estudios más recientes sugieren que quizá se ha subestimado la prevalencia³.

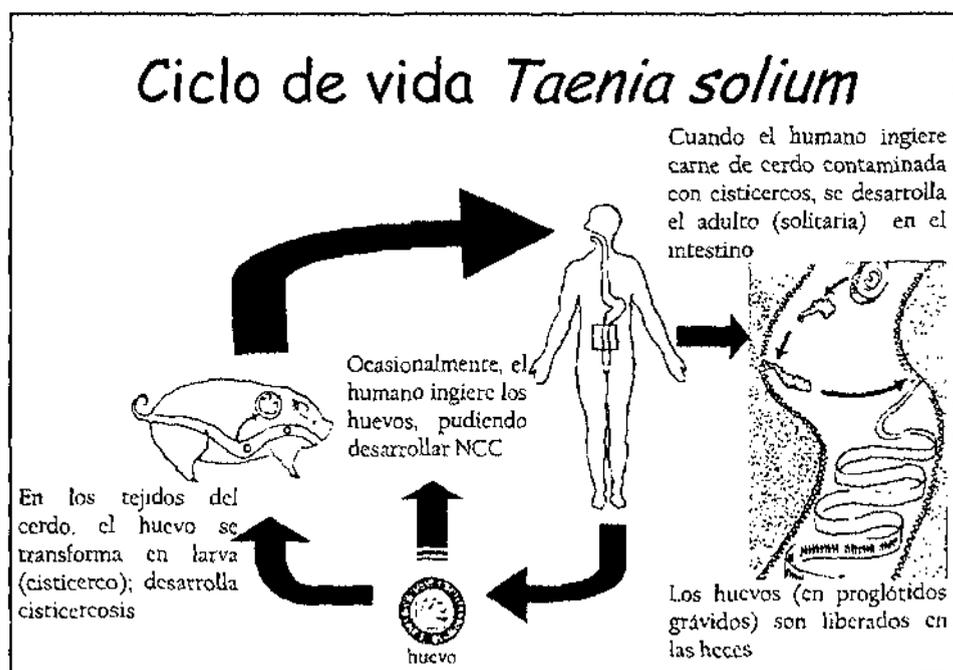
La cisticercosis humana es endémica en México, Guatemala, Ecuador, Colombia, Perú, Brasil, India, China, Corea, Zimbabwe, Sudáfrica y Madagascar⁴. De acuerdo a estudios en autopsias, la prevalencia de la cisticercosis en el sistema nervioso central (neurocisticercosis) va de 0.4 % a 3.6% en varios países de América Latina, Asia y África⁵. En México, estudios en hospitales neurológicos revelan que el 11% de los casos se deben a neurocisticercosis, siendo ésta la causa de muerte en 13% de las necropsias⁴.

1. Ciclo de vida

El ser humano que es el único huésped definitivo de *T. solium*, adquiere la infección por el gusano adulto al ingerir carne de cerdo cruda o mal cocida infectada con cisticercos vivos. En el intestino, el escólex del cisticerco evagina estimulado por las sales biliares y las enzimas digestivas, anclándose en la pared intestinal por medio de ventosas y ganchos, donde madura a la forma adulta. El parásito adulto tiene apariencia de listón, formado por un enorme número de segmentos (proglótidos) que se desarrollan a partir del cuello, a este conjunto de segmentos se le denomina estróbilo (o cuerpo) y puede medir de 2-7 m de largo. El escólex (o cabeza) está formado por cuatro ventosas y un rostelo que posee una doble corona de ganchos. Los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros por no tener aún desarrollados los órganos sexuales, mientras que los segmentos terminales son maduros. La fertilización se lleva a cabo dentro del mismo proglótido y los huevos fertilizados, se almacenan en el útero de los proglótidos llamados grávidos. La tenia adulta comienza a liberar de 2-5 proglótidos 2 ó 3 veces por semana⁴, a partir de las doce semanas después de la infección. Cada proglótido grávido contiene aproximadamente 40.000 huevos que son transportados al medio ambiente en la materia fecal.

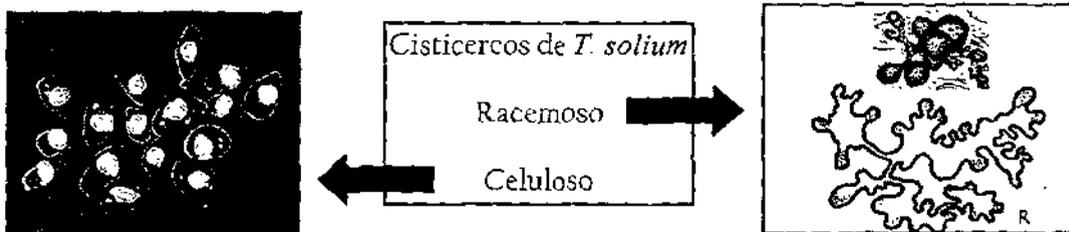
Los huevos son dispersados en el medio ambiente en aguas negras que contaminan frutas, verduras y quizá también por acción de algunos insectos. El huésped intermediario, normalmente el cerdo (ocasionalmente el jabalí, perro, mono, conejo, etc.), se infecta al ingerir huevos que en contacto con enzimas proteolíticas gástricas e intestinales, pierden sus envolturas protectoras y liberan los embriones hexacanto. El embrión liberado, también llamado oncosfera, atraviesa la pared intestinal y alcanza algún capilar sanguíneo o linfático que los distribuyen a una variedad de tejidos. No se sabe si las oncosferas migran activamente hacia tejidos específicos o si esto ocurre de manera pasiva, alojándose en los tejidos con alto flujo de sangre (músculo, cerebro) ¹. En un periodo de 3 semanas a 2 meses, las oncosferas crecen y se diferencian a la forma de cisticerco, el cual persiste en los tejidos del huésped intermediario durante meses ó años. El ciclo de vida se completa cuando el humano consume carne de cerdo infectada con cisticercos viables, desarrollando una tenia adulta, conocida como solitaria. Desafortunadamente, los humanos también pueden actuar como huésped intermediario si ingieren los huevos a través de agua o alimentos contaminados, desarrollando los cisticercos en diferentes tejidos (cerebro, músculo esquelético, tejido subcutáneo, ojo, entre otros).

Sin duda alguna, la neurocisticercosis (NCC) es la forma más preocupante de la enfermedad porque resulta en una enfermedad debilitante que incluso puede ocasionar la muerte.

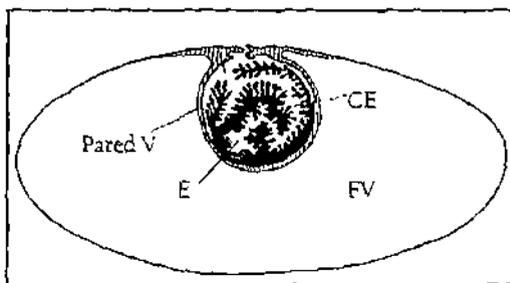


2. El cisticerco

Los cisticercos localizados en el cerebro humano muestran dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. El tipo celuloso es pequeño, tiene una vesícula llena de líquido esférica u ovalada (de 0.5 a 2 cm), blanca o amarillenta, con una pared translúcida a través de la cual se puede observar el escólex. Las características morfológicas de los cisticercos celulosos alojados en los humanos y cerdos son similares. En ambos casos, los cisticercos frecuentemente están aislados del tejido del huésped por una cápsula de tejido conectivo. El cisticerco racemoso es una vesícula grande (hasta 10-20 cm), redondeada o lobulada, circunscrita por una pared delicada y puede contener hasta 60 ml de fluido; en algunos casos carece de escólex. El tipo celuloso es el más frecuente en la neurocisticercosis humana.



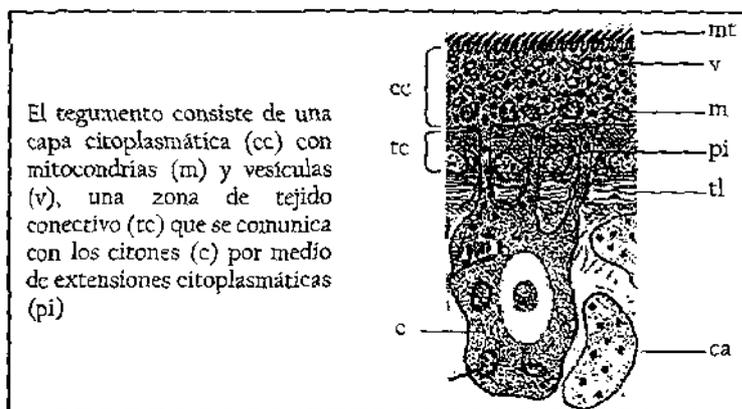
Dentro de la vesícula se encuentra el escólex (E) invaginado (formando el canal espiral, CE), semejante al del gusano adulto. La vesícula muestra al tegumento en su superficie externa y está llena de un fluido transparente llamado fluido vesicular (FV), que contiene proteínas del parásito y del huésped.



El tegumento es una estructura activa de tipo epitelial, que posee una membrana plasmática cuya superficie externa es aumentada por microtricas (mt), recubiertas por abundante glicocálix. Debajo de la membrana plasmática aparecen numerosas vesículas (v) de diferentes tamaños de tipo endocítico o de secreción. Las mitocondrias (m) se encuentran generalmente en la región basal del tegumento delimitado por una membrana basal de tejido conectivo (tc), que se interrumpe por pliegues llamados procesos internunciales (pi). Estos procesos conectan al tegumento anuclear con los citones

tegumentales (cuerpos celulares nucleados (c)) localizados más internamente. El citoplasma de los citones contiene un gran número de vesículas de secreción, aparato de Golgi y retículo endoplásmico bien desarrollado, ribosomas y mitocondrias.

Por debajo del tejido conectivo, se encuentran varias capas de tejido muscular liso (tl) o mioцитones; debajo de ellas, se observan células de almacenamiento (ca) con depósitos de glucógeno y lípidos. Finalmente, existe una capa fibrilar desordenada que contiene gran parte del sistema excretor, constituido por una red de conductos que terminan en células de flama.



B. RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO

La interfase huésped-parásito se define como la región física de contacto entre ambos organismos y es a través de este se desarrolla una comunicación molecular entre el huésped y su parásito. En el caso del cisticerco, el contacto con su huésped ocurre a través de la superficie tegumental. Puesto que los cestodos carecen de aparato digestivo, es a través del tegumento que el cisticerco realiza funciones de nutrición, secreción y defensa en contra del huésped. El cisticerco puede permanecer en los tejidos del huésped durante años manteniendo un fino equilibrio entre ambos organismos.

Alrededor de los cisticercos, el huésped desarrolla una reacción inflamatoria de variable intensidad que puede ir desde escasa, con poco infiltrado celular alrededor de parásitos viables, hasta muy intensa alrededor de parásitos semidestruídos⁶.

Los eosinófilos son uno de los principales tipos celulares que rodea los cisticercos intactos y que invade los dañados, aunque también se encuentran cúmulos de linfocitos y macrófagos⁷. Se desconoce el mecanismo empleado por los eosinófilos para atacar, y la función de las subpoblaciones de linfocitos

en el infiltrado inflamatorio. A medida que la membrana vesicular sufre daño y comienza a ser invadida por células del huésped, el infiltrado se extiende al interior del parásito penetrando por la apertura del canal espiral. El infiltrado inflamatorio, al mismo tiempo que penetra al interior del parásito, se extiende y lo rodea. Se desarrolla una reacción granulomatosa de variable intensidad alrededor de la larva, que produce cambios degenerativos en la superficie del tegumento. Al aumentar la cantidad de macrófagos se observa la formación de agregados de linfocitos y eosinófilos degranulados. En un grado de daño más severo, la reacción inflamatoria es más intensa, observándose degeneración en el tegumento y cambios necróticos en los citones tegumentales. Los agregados de linfocitos son de mayor tamaño y se observan células gigantes y numerosos fibroblastos. El número de eosinófilos disminuye, aunque algunos aparecen dañados o muertos. En la etapa final, el parásito está completamente infiltrado y degenerado. El número de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos disminuye notablemente en la zona granulomatosa; en cambio, se observa gran cantidad de fibroblastos y células gigantes. Posteriormente, el lugar que ocupaba el parásito es invadido por tejido fibroso y las células inflamatorias son muy escasas.

Puesto que el cisticercos sobrevive en los tejidos del huésped en presencia de una respuesta inmune activa, esto significa que es capaz de evadir el ataque inmune. Al respecto, en *T. solium* se han descrito varios mecanismos:

1) Supervivencia de los parásitos por estar alojados en "sitios inmunológicamente privilegiados": los cisticercos se pueden establecer y desarrollar en regiones consideradas como "inmunológicamente privilegiadas" (ej. ojo y cerebro).

2) Enmascaramiento con las inmunoglobulinas del huésped: el cisticercos posiblemente a través de receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, impide la llegada de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos parasitarios presentes en la superficie. En cortes de cisticercos frescos (de ojo, cerebro y músculo) se encontró IgG, IgM, IgA e IgE en la superficie de los cisticercos. Parece ser que el cisticercos es capaz de transportar inmunoglobulinas no específicas y almacenarlas en el fluido vesicular. Estos resultados sugieren que los parásitos vivos se enmascaran cubriéndose con inmunoglobulinas del huésped⁸.

3) Supresión de la respuesta inmune: un ejemplo es el antígeno B, antígeno inmunodominante (paramiosina), que *in vitro* puede unirse a C1 (primer componente de la vía clásica del complemento) inhibiendo su función. Esto sugiere que el antígeno B podría modular la respuesta humoral del huésped antes de entrar en contacto con el parásito⁹. Otro ejemplo es la producción de un factor del metacéstono (MF) que presenta actividad inhibitoria *in vitro* sobre la proliferación de linfocitos¹⁰.

4) Mimetismo molecular¹¹: presupone la capacidad genética del parásito para sintetizar moléculas idénticas a las del huésped. Se ha mencionado como ejemplo de este mecanismo, que la membrana externa del cisticerco contiene entre sus componentes una proteína similar a la inmunoglobulina de cerdo (IgG)¹², sin embargo estudios más recientes muestran que estas proteínas pertenecen al huésped¹³.

5) Secreción o excreción de proteasas: los extractos del metacestodo presentan actividad de proteasa de cisteína, metaloproteasa y proteasa de aspártico¹⁴. Esas enzimas pueden hidrolizar inmunoglobulinas y otras proteínas del huésped.

Otro ejemplo es el descrito en el metacestodo de *T. taeniaeformis* que secreta una proteasa, la taeniaestatina, que actúa inhibiendo la quimiotaxis del neutrófilo y la vía clásica y alterna del complemento¹⁵.

C. RESPUESTA AL ESTRÉS

La respuesta a estrés es un mecanismo general homeostático que protege a las células y al organismo entero del efecto dañino causado por el estrés ambiental. Se caracteriza por la activación transcripcional de un grupo específico de genes. Es una respuesta muy conservada desde bacterias hasta el hombre, incluyendo a las plantas. Existe una amplia variedad de factores que producen estrés e inducen una respuesta muy similar a nivel celular, como el calor, el etanol, inhibidores de componentes del transporte de electrones, ósmosis, hormonas esteroideas, radicales libres de oxígeno, fármacos y prostaglandinas, entre otros.

El estrés por calor es por mucho el más estudiado. La respuesta al estrés por calor (heat shock, HS) fue descrita en 1962 por Ritossa como parte del estudio del efecto de las temperaturas elevadas sobre los cromosomas de la larva *Drosophila*. Las proteínas sintetizadas durante el estrés por calor (proteínas de heat-shock, HSPs), juegan un papel importante en varios procesos celulares. Cuando existe desdoblamiento de proteínas, como puede ocurrir por estrés calórico o por exposición a radicales libres, las HSPs son inducidas y se unen a las proteínas dañadas protegiéndolas del daño¹⁶.

La respuesta de estrés en los parásitos.

Como parte de su ciclo de vida, muchos parásitos experimentan cambios drásticos en la temperatura de su medio ambiente. Se ha propuesto que la respuesta al estrés calórico juega un papel fundamental en parásitos durante la invasión al huésped. Se han detectado HSPs en varios parásitos (ej.

Leishmania, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia* y *Schistosoma*) y hongos patógenos (ej. *Histoplasma* y *Candida*). Los parásitos se deben adaptar no sólo al cambio de temperatura, sino a diferentes condiciones oxido-reductoras, ausencia de nutrientes y hormonas, respuesta inmune, etc¹⁷.

La síntesis de HSPs también es estimulada por radicales libres derivados del oxígeno, generados durante la defensa antiparasitaria. Las HSPs (principalmente HSP70) están entre los antígenos más reconocidos por el sistema inmune en varios parásitos. Por lo tanto además de ser importantes en la interacción huésped-parásito, las proteínas de estrés tienen importancia inmunológica.

Entre los antígenos inmunodominantes de *Schistosoma mansoni* se encuentran una enzima glutatión transferasa¹⁶ (GST), descendiente de la familia de las α -cristalinas, y una HSP70^{18,19}. La GST actúa como enzima antioxidante, participando en el estrés oxidativo y en contra del ataque inmune, además de inhibir la peroxidación lipídica. La HSP70 ha sido utilizada como candidato a vacuna en la esquistosomiasis²⁰. Estos anticuerpos también presentan reacción cruzada con las HSP70 de personas infectadas con *P. falciparum*, *Brugia malayi* y *S. mansoni*²¹.

D. ESTRÉS OXIDATIVO

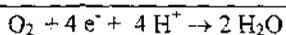
En los años recientes se ha visto un crecimiento exponencial en el número de publicaciones sobre mecanismos de defensa en contra del estrés oxidativo. Lo anterior es el resultado del incremento en conocimiento del estrés oxidativo *per se*, y del aislamiento de genes en parásitos los cuales codifican para enzimas cuya principal función es detoxificar los productos intermediarios que resultan de la reducción de oxígeno molecular.

1. Especies reactivas de oxígeno.

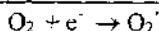
Durante la respiración celular se producen en la célula varias especies reactivas de oxígeno, como los radicales superóxido (O_2^*), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (*OH), los cuales son altamente inestables y reactivos. Estas especies reactivas de oxígeno reaccionan con la mayoría de las macromoléculas biológicas, oxidando proteínas, peroxidando lípidos y modificando bases del DNA. La degradación de lípidos en las membranas, es una consecuencia primaria de la generación de oxidantes. La peroxidación de lípidos causa destrucción de membranas biológicas y la liberación de compuestos dañinos para otras moléculas²².

La reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua es la principal fuente de energía en

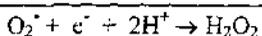
los sistemas biológicos aerobios. Esta reducción requiere 4 electrones²³:



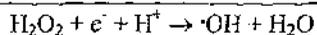
Si esos electrones son cedidos al oxígeno uno a la vez, se generan una serie de productos intermediarios. El primero de ellos es el superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$):



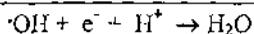
La reducción del $\text{O}_2^{\cdot -}$ por el segundo electrón produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2):



Cuando el tercer electrón es cedido al peróxido, se forma el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y la primera molécula de agua (H_2O):

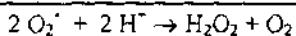


El $\cdot\text{OH}$ es un agente oxidante altamente reactivo con una vida media muy breve de 10^{-9} seg. Además, puede reaccionar con carbohidratos, proteínas o lípidos para producir radicales peróxilos²⁴. Finalmente, el cuarto electrón reacciona con el hidroxilo, produciendo la segunda molécula de H_2O :



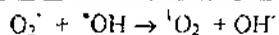
a. Superóxido

A diferencia de la mayoría de las moléculas con electrones desapareados, el superóxido es sorprendentemente inerte. En sistemas acuosos, su principal reacción es consigo mismo, generando una molécula de H_2O_2 y una molécula de oxígeno, en una reacción de dismutación:



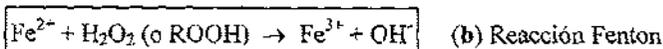
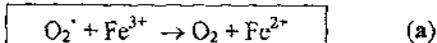
La tasa constante para ésta reacción es aproximadamente $7\text{-}10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7, por lo que la formación del superóxido siempre es acompañada con la formación significativa de peróxido²⁴.

El superóxido puede reaccionar con el radical hidroxilo formando oxígeno singlete:



b. Peróxido

El peróxido no posee electrones desapareados y por lo tanto no es un radical libre. Es un oxidante estable que puede reaccionar con muchas moléculas biológicas. Se forma por la reducción del oxígeno por dos electrones en presencia de protones, o por la dismutación del superóxido. Es lipofílico, lo cual facilita su tránsito a través de las membranas lipídicas. Ya dentro de la célula puede reaccionar con ciertos metales de transición como el hierro (Fe) y el cobre (Cu) para dar lugar a radicales libres como el hidroxilo (b).



En esta reacción el metal es reducido por el superóxido (a) y después oxidado por el peróxido (b). A este ciclo se le conoce como la reacción Haber-Weiss (c):



El peróxido es utilizado por células fagocíticas para oxidar iones hálidos (Br^- , Cl^-) y dar lugar a ácidos hipohalosos (ej. HOCl), un grupo de compuestos muy reactivos que reaccionan con aminas para producir halamínas (ej. NH_2Cl), algunas incluso más reactivas que los ácidos hipohalosos.

En los organismos aerobios el estrés oxidativo es un resultado inevitable puesto que continuamente se generan especies reactivas de oxígeno a partir del metabolismo celular. Para contener con las especies reactivas de oxígeno, los organismos aerobios poseen enzimas antioxidantes.

2. Enzimas antioxidantes

a. Superóxido dismutasa.

Las superóxido dismutasas, son una familia de proteínas cuya función es eliminar aniones superóxido, catalizando su dismutación a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

Existen cuatro formas genéticamente distintas de SOD que difieren en el ión del grupo prostético y/o localización celular. Las células eucariotas poseen una superóxido dismutasa cobre-zinc (SOD-CuZn) citoplásmica, una SOD-CuZn glicosilada y una SOD-Mn mitocondrial. La mayoría de los procariontes tienen dos SOD (SOD-Mn y SOD-Fe) que son similares en su secuencia de aminoácidos y estructura.

La expresión de SOD-Mn es usualmente inducible en células procariontes y eucariontes. Bajo condiciones de elevado estrés oxidativo, sus niveles se incrementan en el medio circundante²⁵.

En mamíferos se han descrito tres isoenzimas²⁶

1) Una SOD-CuZn intracelular, fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich²⁷, se localiza en citoplasma, núcleo y un poco menos en peroxisomas de células de mamíferos. Los peroxisomas juegan un papel importante como depósitos de superóxido producido en el citoplasma y núcleo. La SODCuZn contiene dos moléculas de Cu y Zn por proteína dimérica, cada subunidad pesa 16 kDa. Se encuentra en un amplio rango de organismos, incluyendo a los helmintos. La tasa de dismutación por la enzima es significativamente mayor a la reacción espontánea ($1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), aproximadamente 4 veces en orden de magnitud, y es activa en un rango de pH entre 5.3 - 9.5. Esto garantiza que los niveles de superóxido *in vivo* se aproximen a cero (10^{-11} M). Aunque la enzima produzca peróxido, este es utilizado por la catalasa y glutatión peroxidasa²⁴.

2) La segunda isoenzima, también contiene cobre y zinc en su sitio activo, pero es extracelular. Esta enzima, llamada EC-SOD se une a un dominio heparin cargado positivamente que le permite localizarse específicamente en la matriz extracelular de los tejidos. Es una molécula tetramérica con subunidades monoméricas de 30 kDa.

3) La tercera isoenzima, una SOD-Mn, es sintetizada en citoplasma y dirigida a la mitocondria por un péptido señal. En las mitocondrias juega un papel crítico como un antioxidante ya que remueve el superóxido generado por la falta de electrones en la cadena respiratoria.

b. Catalasa

Esta enzima reduce el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. La catalasa es una molécula tetramérica compuesta de subunidades con peso aproximado de 60 kDa, cada una conteniendo como grupo prostético al Fe^{3+} (ferritoporfirina)²⁸. La catalasa no es homogénea en estructura y quizá presenta conformación variable según el número de grupos sulfhidrilos libres (SH), grupos siálicos, sus características de elusión y su punto isoelectrico.

c. Glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GSH-px) es un tetrámero de 75-100 kDa compuesto de subunidades idénticas cada una con un átomo de selenio unido covalentemente a la cisteína de su sitio activo. Es la responsable de la descomposición de peróxidos, incluyendo el de hidrógeno, utilizando glutatión reducido (GSH) como donador de hidrógenos. La enzima se localiza en el citosol y en la matriz mitocondrial y su actividad se ha detectado en todos los tejidos de mamíferos estudiados. La cinética

consiste en un ciclo de tres reacciones rédox las cuales actúan sobre el peróxido de hidrógeno. Su especificidad para el peróxido es menos selectiva que la catalasa, pudiendo utilizar como substratos una amplia gama de diferentes peróxidos, entre ellos el peróxido de hidrógeno. La enzima usa glutatión (GSH) como sustrato que es reducido (GSSG) durante la conversión de H_2O_2 a H_2O . El glutatión reducido (GSSG) es convertido otra vez a GSH por la enzima glutatión reductasa (GSH-red). El GSH es considerado como una de las proteínas de menor tamaño de la célula. Como la catalasa, la glutatión peroxidasa es una enzima extremadamente eficiente, capaz de degradar 42,000 moléculas de H_2O_2 por segundo a 0°C. GSH-px ha sido reportada en helmintos²⁸, pero siempre en bajas concentraciones y al igual que la catalasa, no ha podido aislarse o caracterizarse. Existen glutatión peroxidases dependientes o independientes de selenio. La glutatión-S-transferasa (GST) pertenece al grupo carente de selenio; su sustrato preferido es con peróxidos orgánicos y no es capaz de reaccionar con H_2O_2 .

d. Peroxiredoxinas

Esta familia de proteínas con clara actividad enzimática antioxidante, fue descrita recientemente por Chae *et al*²⁹. A los integrantes de esta familia se les han dado varios nombres. La primera peroxidoxina reportada fue la Tioeredoxin peroxidasa (TPx) (antes llamada antioxidante tiol-específica, TSA) de *Saccharomyces cerevisiae* cuya expresión es inducida específicamente bajo estrés oxidativo³⁰.

Las peroxiredoxinas (Prx) se encuentran en todo tipo de organismos. Varios genes de peroxidoxinas en los procariontes se localizan muy próximos a genes codificadores de proteínas con actividades rédox. En eucariontes se han encontrado también varias peroxidoxinas y al menos cinco se han identificado en el humano.

Las peroxidoxinas no están unidas a iones metálicos. Su actividad antioxidante se debe en parte a su habilidad para descomponer alquil hidroperóxidos y H_2O_2 , para así prevenir la formación del radical hidroxilo. Una cisteína (Cys47) altamente conservada está involucrada en el mecanismo catalítico de estas enzimas. Existen dos grupos de peroxidoxinas basados en la presencia de uno o ambos residuos de cisteínas correspondientes a Cys47 y Cys170. Las peroxidoxinas 2-cys contienen ambos residuos conservados, mientras que los miembros del grupo 1-cys pierden el residuo Cys170. Además los grupos 1-cys y 2-cys difieren en la región conservada alrededor de Cys47. Las TPx utilizan a la Tioeredoxina (Trx) como donador inmediato de hidrógenos derivados de NAD(P)H. Así, el puente disulfuro de la TPx es específicamente reducido por una Trx, aunque también puede ser reducida (aunque de manera menos efectiva) por un pequeño grupo tiol.

En eritrocitos las peroxidoxinas son la segunda proteína soluble más abundante después de la hemoglobina. En levaduras constituye el 0.7% de proteína soluble. Por lo que quizá tengan una función fundamental y esencial en la homeostasis oxidativa en los organismos vivos.

En parásitos protozoarios y helmintos se han encontrado una amplia variedad de TPx, algunas son secretadas, lo que sugiere un papel defensivo ante el ataque del huésped. La primera TPx identificada en helmintos es la 2-cys de *Fasciola hepatica*³¹. En *Fasciola* no se ha detectado catalasa y existe muy poca actividad de GSH-px. En extractos de *Ascaris suum* se ha encontrado una Prx con 22.6 kDa del tipo 2-cys³². En *Dirofilaria immitis* pesa 27 kDa y se localiza en extractos y productos de secreción/excreción³³. En *Echinococcus granulosus* no se ha encontrado catalasa ni GSH-Px; sin embargo, en el extracto de protoescólex existe actividad de Prx, su peso molecular es de 21.4 kDa y es del tipo 2-cys³⁴.

E. ESTRÉS OXIDATIVO, TAENIA Y OTROS HELMINTOS

La respuesta al estrés oxidativo en helmintos ha sido estudiada principalmente en nemátodos. Tanto en los compartimentos intracelulares como extracelulares se encuentran varios compuestos capaces de inactivar y limpiar el medio de oxidantes. También existen varias enzimas que pueden aceptar el electrón característico de los radicales libres y realizar un papel protector. Los oxidantes son producidos dentro de las mitocondrias, pero probablemente no se escapan al citosol y las enzimas antioxidantes asociadas a la mitocondria tampoco están involucradas en la defensa contra un ataque oxidativo mediado por el huésped. Por lo que las oxidasas, citocromo peroxidases y otras enzimas antioxidantes asociadas con la mitocondria de helmintos no serán consideradas en este proyecto.

Se ha descrito la presencia de superóxido dismutasa en *Dirofilaria immitis*³⁵, *Trichinella spiralis*, *Hymenolepis diminuta*, *Moniezia expansa*³⁶ y en el metacéstodo de *T. taeniaeformis*³⁷. La SOD del cisticerco de *T. taeniaeformis* pesa 64 kDa con subunidades de 16 kDa. Esta proteína se encontró en el fluido que rodea a los cisticercos en tejido hepático, lo que sugiere que protege al parásito del ataque del huésped³⁸. En el cisticerco de *T. crassiceps* se ha encontrado actividad de SOD³⁹. Existe un solo reporte de que en la pared vesicular del cisticerco de *Echinococcus granulosus* se detectó actividad de SOD y GST⁴⁰.

Se han aislado y caracterizado GST's de *D. immitis* (47 kDa) y de *Brugia pahangi*⁴¹, en la última especie se ha descrito una variedad de GSH-px que es secretada (gp29)⁴². En el adulto de *H. diminuta* se identificaron cuatro GST's dimericas con subunidades de 24 kDa⁴³, mientras que en *M. expansa* fue aislada una GSH-red dimerica con subunidades de 63 kDa⁴⁴. Las larvas de *E. granulosus*⁴⁵

y *T. taeniaeformis* (35 kDa) también poseen una GST, esta última especie también posee una GSH-red (75 kDa)³⁸. En el cisticerco de *T. solium* se ha localizado una GST dimerica con subunidades de 26 kDa y una GSH-px⁴⁶.

En el caso de las peroxidadas de helmintos, poco se conoce sobre sus características fisicoquímicas. *T. taeniaeformis*, *S. mansoni*, *H. diminuta*⁴⁷ y de *M. expansa*⁴⁷, tienen peroxidasa, pero en estas dos últimas especies no ha sido purificada³⁸.

Helmintos	SOD	Cat	Glutación	Prx
<i>Trichinella spiralis</i>	⊗		GSH-px, GST	
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	⊗	⊗	GSH-px	
<i>Nematospiroides dubius</i>	⊗	⊗	GSH-px	
<i>Onchocerca cervicalis</i>	⊗	⊗	GSH-px	
<i>Onchocerca volvulus</i>	⊗		GST	1/2-cys
<i>Dirofilaria immitis</i>	⊗		GSH-px, GST	1-cys
<i>Brugia malayi</i>	⊗			2-cys
<i>Ascaris suum</i>	⊗	⊗		2-cys
<i>Turbatrix aceti</i>	⊗	⊗	GSH-px	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	⊗	⊗	⊗	2-cys
<i>Fasciola hepatica</i>	⊗		GST	2-cys
<i>Schistosoma mansoni</i>	⊗		GSH-px, GST	2-cys
<i>Moniezia expansa</i>	⊗		GSH-red	
<i>Hymenolepis diminuta</i>	⊗		GST	
<i>Echinococcus granulosus</i>	⊗		GST	2-cys
<i>Taenia taeniaeformis</i>	⊗		GST, GSH-red	
<i>Taenia solium</i>			GSH-px, GST	

F. LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA REACCIÓN INFLAMATORIA

Las enzimas antioxidantes y el papel de oxidantes en procesos fisiológicos han recibido atención en varias áreas de investigación incluyendo la reacción inflamatoria. Además de la respuesta inmune del huésped, se producen oxidantes por la radiación ionizante y ciertas drogas antiparasitarias²³. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) representan un poderoso mecanismo efector en contra de los parásitos. En el caso de los parásitos protozoarios y helmintos, muestran tener al menos una de las

principales enzimas antioxidantes³⁸: superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); y glutatión peroxidasa (GSH-px). La SOD dismuta el O_2^- a H_2O_2 , mientras que la CAT, las GSH-px y las peroxiredoxinas (Prx) detienen las reacciones iniciales generadas por ROS; la segunda línea de defensa va dirigida hacia la detoxificación de hidroperóxidos y la lleva a cabo la GST.

Los parásitos tienen adaptaciones generales para evadir el sistema inmune del huésped. Entre las estrategias de defensa utilizadas por helmintos está la de inhabilitar las ROS del huésped al secretar o expresar enzimas antioxidantes en su superficie. El papel principal de estas enzimas es el proteger la superficie de las membranas contra la peroxidación, y así evitar que el rompimiento celular lleve a la muerte del parásito. Por ejemplo, la GST de *S. mansoni* aparentemente se encuentra localizada en la superficie del tegumento (es un candidato a vacuna), al igual que la GSH-px de *B. pahangi* que además es secretada y la SOD de *O. volvulus* que también es secretada⁴⁸. La SOD de *S. mansoni*⁴⁹ y *T. taeniaeformis*³⁷ es liberada en el medio de cultivo, lo que hace suponer que también sucede *in vivo*.

En el caso de la respuesta inflamatoria, eosinófilos y células fagocíticas parecen ser las más importantes efectoras en la muerte de parásitos helmintos⁵⁰. Los fagocitos matan parásitos *in vitro* al secretar proteínas tóxicas o por mecanismos mediados por radicales libres, usualmente en combinación con anticuerpos o el complemento. Los fagocitos utilizan el estallido respiratorio liberando H_2O_2 y O_2^- . A su vez, neutrófilos y eosinófilos secretan las enzimas mieloperoxidasas (MPO) y eosinófilo peroxidasa (EPO), respectivamente. Estas enzimas se unen iónicamente a las superficies cargadas negativamente del helminto catalizando la reacción del H_2O_2 con iones haluros para generar ácidos hipohaluros que son altamente oxidantes.

Se ha observado que aunque los eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y mastocitos se adhieren al tegumento de los helmintos, estas células causan poco o ningún daño a menos que su número sea muy grande³⁸, lo que no se ha mostrado que suceda *in vivo*.

En el caso de los céstodos se conoce muy poco acerca de su respuesta al estrés oxidativo y el papel que ésta tiene en la relación huésped-parásito y en contra de la respuesta inmune. *Taenia solium* es un parásito del humano que vive en estrecho contacto con las células del sistema inmune y que no es dañado por el huésped. Es crucial el conocimiento de los mecanismos empleados por el cisticerco que le permiten evadir los efectos de la respuesta inmune del huésped. Se ha sugerido que un aspecto de la defensa del parásito es la producción de enzimas que son capaces de responder o inactivar las moléculas citotóxicas del huésped. Entre los candidatos de esta defensa están las enzimas antioxidantes.

II. OBJETIVO

✧ Caracterizar la respuesta del cisticerco de *T. crassiceps* al estrés producido por el H₂O₂

METAS:

1. Determinar la dosis letal de H₂O₂ sobre los cisticercos
2. Determinar efecto del estrés oxidativo sobre:
 - 2.1. La síntesis de proteínas parasitaria
 - 2.2. La viabilidad de los cisticercos
 - 2.3. La infectividad en el modelo de ratón

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CISTICERCOS

Se mantuvieron cisticercos de la cepa ORF de *T. crassiceps*[⊙], en el laboratorio mediante infecciones consecutivas intraperitoneales en ratones hembra de la cepa BALB/c AnN de 4-6 semanas de edad; transcurridos 3 meses de infección se extrajeron los cisticercos lavando el peritoneo con amortiguador de fosfatos de sodio 10 mM pH 7.2 (PBS), suplementado con una solución 1% de antibiótico-antimicótico (10,000 U penicilina, 10 mg estreptomina y 25 µg anfotericina B / ml, Gibco BRL). Los cisticercos fueron lavados tres veces más en PBS, seleccionándose larvas de tamaño (4-5 mm de diámetro) y apariencia similar (vesícula traslúcida sin gemaciones).

[⊙] Se utilizó a *Taenia crassiceps*, cuyo adulto habita usualmente el intestino de zorros rojos en Europa y Norte América. Los roedores se infectan con el estado larvario (cisticerco) por ingestión de huevos provenientes de heces fecales. En el roedor, los huevos se desarrollan en cisticercos que se reproducen asexualmente por gemación. *T. crassiceps* ha sido utilizada como un modelo experimental para estudiar la cisticercosis ya que existe reactividad cruzada entre las larvas de *T. solium* y *T. crassiceps*. Entre sus ventajas se encuentran: la facilidad para obtener grandes cantidades de la forma larvaria; su no infectividad para el hombre y el hecho de que resulta mucho más económico mantener un modelo en ratones que en cerdos. Varias cepas de *T. crassiceps* se han aislado y mantenido en el laboratorio. La cepa ORF, que carece de escólex, ha sido la más usada por su capacidad de multiplicarse rápidamente en la cavidad peritoneal del ratón.

B. RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

Se colocaron grupos de cinco cisticercos por pozo, en cajas de cultivo Nunclon, con 1 ml del medio RPMI 1640 (Gibco Laboratories), suplementado con: piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM (Gibco BRL); aminoácidos no esenciales a una concentración final 0.1 mM (Gibco BRL); la mezcla de antibiótico-antimicótico descrita arriba; y según el ensayo, en presencia o ausencia de 10 % suero fetal bovino (FBS) (Gibco BRL). Los cisticercos se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (0.05 μ M hasta 1 mM), a 37°C (5% CO₂, humedad del 95%), durante 4 hrs.

C. MARCAJE METABÓLICO

Los cisticercos incubados en presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno, en las condiciones arriba mencionadas, fueron lavados dos veces, antes de ser nuevamente incubados en medio de cultivo al que se le había agregado 40 μ Ci de L-[³⁵S]-metionina (>1000 Ci/mmol, Amersham), durante 4 hrs.

D. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

Al terminar las incubaciones en presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno, con o sin marcaje metabólico, se cosecharon los cisticercos de las cajas de cultivo y se colocaron en tubos Eppendorf con 200 μ l de la solución de muestra para geles de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) (SDS-PAGE). Los extractos crudos se obtuvieron por sonicación de los cisticercos (2 periodos de 20 seg a 75 watts con pausas de 20 seg, a 4 °C, en un sonicador de vástago modelo 185, Branson). Para la electroforesis, los extractos crudos se hirvieron a 95 °C por 5-10 min. Se mantuvieron en hielo hasta su aplicación al gel. Los geles discontinuos de poliacrilamida se prepararon de acuerdo al método descrito por Laemmli⁵¹, con SDS al 10%, en cámaras de electroforesis de Hoeffer. El gel concentrador se preparó al 5% de acrilamida (Tris 0.5 M, pH 6.8), mientras que el separador (Tris 1.5 M, pH 8.8) se preparó al 10-12 %. Al terminar la corrida, la visualización de las bandas proteicas en los geles de extractos crudos fue con azul brillante de Coomassie R-250.

En el caso de las muestras provenientes de experimentos de marcaje metabólico, los geles se trataron para fluorografía⁵² con una solución de PPO (2, 5-Difeniloxazol, ICN) al 22% en DMSO (Dimetil sulfoxido, Research Organics) y se secaron al vacío en una secadora Bio-Rad. La autorradiografía se obtuvo al exponer una película fotográfica Kodak X-Omat, durante 1-15 días.

E. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD E INFECTIVIDAD DE LOS CISTICERCOS

Durante las exposiciones a peróxido de hidrógeno, la viabilidad de los cisticercos fue inicialmente monitoreada evaluando la movilidad de las larvas al microscopio estereoscópico. Alternativamente, transcurridas las 4 hrs del experimento, se determinó la viabilidad por el ensayo enzimático de MTT⁵³ (3-(4, 5-dimetiltiazol 2-il) 2, 5- bromuro de difeniltetrazolio; SIGMA) haciendo algunas modificaciones al propuesto por Comley⁵³. Los cisticercos se lavan 3 veces con PBS 1x, se incuban a 37 °C (5% CO₂, humedad del 95%) durante 90 min en una solución de MTT (0.5 mg/ml) en PBS 1x. Posteriormente se enjuagan 2 veces en PBS 1x. El formazán formado se disuelve en 800 ml de DMSO, en agitación constante durante 1 hr a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución del formazán se determina a 570 nm. Brevemente, este método se basa en la reducción del MTT, un compuesto amarillo soluble en agua, que al ser reducido por deshidrogenasas da lugar a una sal denominada formazán, que a su vez es hidrofóbico y de color azul. La conversión solo se da en células vivas, de esta manera, la actividad enzimática puede ser correlacionada con la viabilidad del cisticercos. El formazán puede ser solubilizado en DMSO, permitiendo su cuantificación en el espectrofotómetro a 570 nm.

La infectividad de los cisticercos se evaluó por la capacidad de reproducción de los grupos experimentales, transcurridas las 4 hrs de exposición al peróxido de hidrógeno, en la cavidad peritoneal del ratón. Después de 40 días de infección se realizó el sacrificio del ratón y conteo de cisticercos.

F. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA EN PAPEL DE NITROCELULOSA

Para la identificación de algunas proteínas en los extractos crudos se corrieron geles de SDS-PAGE (ver arriba). Posteriormente, las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa⁵⁴. Para la transferencia se utilizó un buffer de 20 mM Tris, 150 mM glicina y metanol al 20%, pH 8.3. El papel de nitrocelulosa se reveló con rojo de Ponceau al 0.1% durante 5 min y luego se enjuagó con agua destilada para comprobar la transferencia de proteínas.

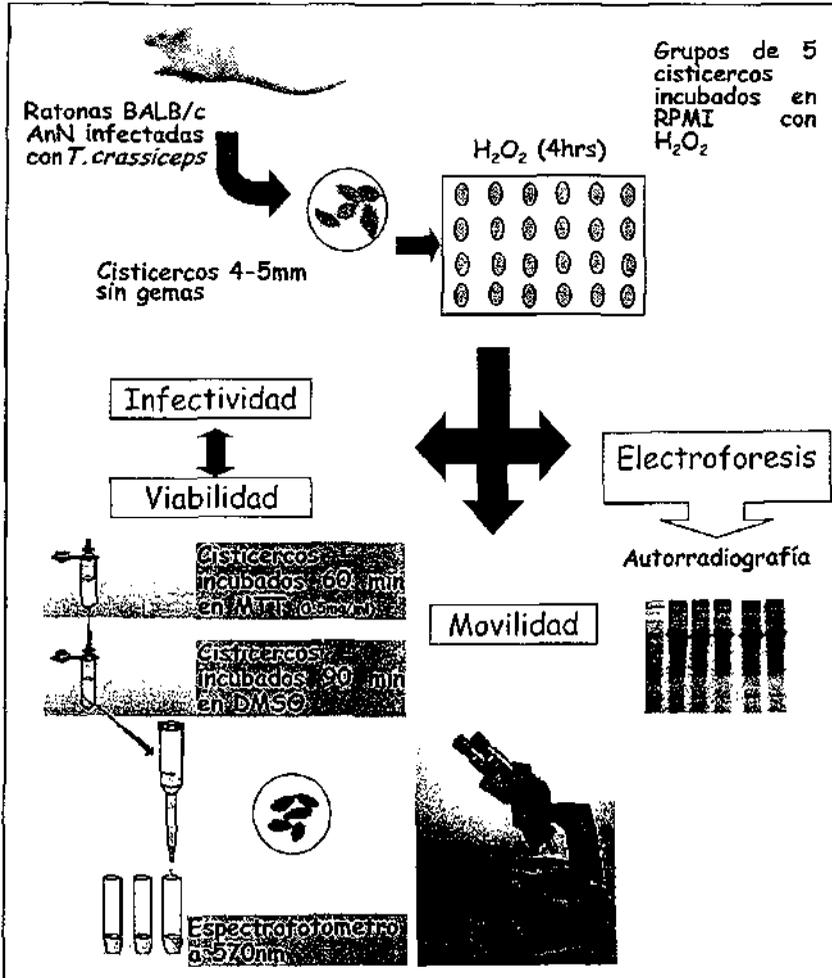
⁵³ El MTT es una sal tetrazolio soluble en agua. Se utiliza para medir viabilidad, proliferación o citotoxicidad en células y organismos. Las células son incubadas con el MTT y accede hasta las enzimas (deshidrogenasas) de la cadena respiratoria, las cuales reducen el MTT a su sal formazán, dando como resultado un producto insoluble. Después de la solubilización, se cuantifica el producto azul y se puede estimar la viabilidad y la actividad metabólica, las cuales se correlacionan con el crecimiento celular. La principal ventaja del método de MTT sobre los métodos de proliferación son que no se maneja radioactividad, fácil aplicación y análisis a través del espectrofotómetro. Una desventaja que presenta es que poblaciones heterogéneas de células son difíciles de analizar debido a la variabilidad considerable en reducir el MTT (tamaño variable y actividad metabólica).

Los pesos moleculares se marcan, se procesa la membrana completa. La membrana se bloqueó con leche descremada (Nestlé Omega) al 3% en PBS 1x. A esta solución bloqueadora se le agregó el primer anticuerpo a distintas diluciones y se incubó durante toda una noche a 4°C en agitación. Posteriormente se lavó en repetidas ocasiones con Tween 0.05% en PBS. El segundo anticuerpo se agregó también en solución bloqueadora y se dejó incubar durante una hora en agitación. La membrana se enjuagó tres veces en Tween al 0.05% en PBS y posteriormente en PBS. Finalmente, se reveló con una solución de diaminobenzidina al 10% en PBS y peróxido de hidrógeno al 3%. La reacción se detuvo agregando agua destilada cuando las bandas se ven nítidas. Como primer anticuerpo se utilizó uno de conejo anti-albúmina bovina (SIGMA B7276) en una dilución 1:500. Como segundo anticuerpo se utilizó anticuerpos anti IgG de conejo (H+L) dilución 1:1000 acoplados a peroxidasa (ZYMED 62-6120).

G. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína en las muestras se determinó por el método de Bradford⁵⁵ utilizando un kit comercial (Bio-Rad Protein Assay). Para elaborar una curva patrón se utilizó una solución estándar de albúmina bovina a una concentración de 1 mg/ml. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 595 nm.

Esquema de metodología



IV. RESULTADOS

DAÑO A LOS CISTICERCOS POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Para determinar el efecto del peróxido de hidrógeno en cisticercos de *Taenia crassiceps* inicialmente se incubaron las larvas en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂ (0.2-1 mM), durante 4 y 12 hrs a 37 °C. Esta serie de concentraciones y tiempos de exposición fueron seleccionados con base a la información publicada para otros helmintos, incluyendo a *Schistosoma mansoni*. La

movilidad de los cisticercos observada al microscopio estereoscópico al final de las incubaciones, fue continua en el grupo control (en ausencia de H_2O_2), mientras que en los grupos expuestos a H_2O_2 durante 4 y 12 hrs, no se observó movimiento alguno. El análisis de los extractos crudos en geles de SDS-PAGE, mostró una disminución considerable en la complejidad del patrón proteico de los cisticercos expuestos a todas las concentraciones de H_2O_2 , sugiriendo que el peróxido les produce daño. Solo una banda de aproximadamente 66 kDa mostró un incremento notable en todos los grupos de cisticercos expuestos al H_2O_2 . (FIG. 1).

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Mediante experimentos de marcaje metabólico se analizó el patrón de síntesis de proteínas, adicionando L-[^{35}S]-metionina al medio de cultivo e incubando los cisticercos en presencia y ausencia de H_2O_2 (grupo de control), durante 4 hrs. La autorradiografía del gel de SDS-PAGE en el que se corrieron los extractos crudos de cisticercos, mostró que no había ocurrido ninguna incorporación del isótopo en las proteínas de los cisticercos expuestos a H_2O_2 (resultados no mostrados). En contraste con el grupo control cuyas proteínas se marcaron ampliamente, incluyendo bandas con pesos moleculares aparentes de entre 14 hasta 200 kDa. Lo anterior mostró que aún la concentración más baja de H_2O_2 (200 μM), produce un daño grave en las capacidades biosintéticas de los cisticercos.

Para averiguar si una respuesta al estrés podía ser observada en concentraciones menores de peróxido, se disminuyó casi dos órdenes de magnitud su concentración hasta una mínima de 0.05 μM , manteniéndose las 4 hrs de exposición. Como lo muestra el gel en la FIGURA 2-A, el patrón proteico en los extractos crudos de cisticercos expuestos a concentraciones entre 0.05 hasta 1 μM de H_2O_2 , era similar al de los cisticercos control. Concentraciones mayores produjeron una reducción gradual en la complejidad del patrón proteico. En la misma figura también se aprecia que a partir de 2 μM aparece incrementada la proteína de 66 kDa mencionada anteriormente. El análisis del marcaje metabólico en las mismas concentraciones de H_2O_2 , mostró que la síntesis de proteínas se abate por completo cuando los cisticercos son incubados en presencia de concentraciones mayores o iguales a 2 μM de H_2O_2 (FIG. 2-B). Por lo tanto, el incremento de la proteína de 66 kDa coincide con la pérdida de síntesis proteica.

Se definió con mayor precisión la concentración de H_2O_2 en la cual se induce el incremento de la proteína de 66 kDa, explorando en detalle el rango entre 1 y 2 μM . El análisis de los geles de SDS-PAGE de los extractos mostró que el patrón proteico de los grupos experimentales es muy similar al control hasta la concentración de 1.4 μM (FIG. 3-A). En concordancia con lo observado en el

experimento anterior, las concentraciones mayores mostraron incrementada la proteína de 66 kDa y disminuidas algunas proteínas de pesos moleculares bajos.

La banda de 66 kDa incrementó su grosor conforme se incrementó la concentración del H_2O_2 por arriba de 1.6 μM , coincidiendo nuevamente con la pérdida de la capacidad del cisticerco para incorporar metionina radioactiva (FIG. 3-B). Similarmente, la movilidad observada de los cisticercos era nula a partir de los 30 min de exposición a concentraciones mayores a 1.6 μM de H_2O_2 . Ambos resultados sugirieron fuertemente que la aparición de la banda de 66 kDa coincidía con un daño grave de los cisticercos, manifestada como la detención de su capacidad biosintética. Adicionalmente, puesto que la banda de 66 kDa coincide con el peso molecular de la albúmina, que es la proteína más abundante del suero bovino fetal presente en el medio de cultivo, era posible que su aparición se debiera al daño producido por el H_2O_2 .

Se realizaron experimentos de exposición al H_2O_2 en ausencia de suero bovino fetal. Como lo muestra la FIGURA 4, el patrón proteico es muy similar en todos los carriles, sin embargo, aunque a partir de 1.6 μM desaparecen la(s) proteína(s) de bajo peso molecular, igual que en el experimento en presencia de suero bovino fetal, no se observó la aparición de la proteína de 66 kDa. Para comprobar la identidad de la proteína de 66 kDa, se realizó una IET de los extractos de cisticercos expuestos a H_2O_2 en presencia de suero bovino fetal, usando anticuerpos anti-albúmina sérica bovina, resultando la reacción positiva (FIG. 5). De esta manera, se demostró que la aparición de la banda de 66 kDa se debe a filtración de albúmina a través de la pared vesicular de los cisticercos dañados por el H_2O_2 .

Para determinar si la permeabilidad de la pared vesicular de los cisticercos expuestos a H_2O_2 , correlacionaba con la muerte del parásito, se emplearon dos procedimientos para evaluar el daño de los cisticercos al final de la exposición. Por un lado se utilizó el método enzimático del MTT para medir viabilidad celular y por el otro se realizó un ensayo de infectividad en ratones.

ENSAYO DE VIABILIDAD

El MTT es un reactivo ampliamente utilizado para medir la actividad metabólica celular. Al igual que otras sales tetrazolio, al reducirse por actividad de deshidrogenasas celulares, se forma un precipitado de color azul que puede ser cuantificado fotométricamente después de solubilizar los cristales en solventes orgánicos.

Grupos de cisticercos fueron expuestos durante 4 hrs a concentraciones entre 0.2 y 200 μM de H_2O_2 . Después de la exposición, algunos cisticercos fueron utilizados en ensayos de VIABILIDAD por el

método del MIT, mientras que otros fueron inyectados intraperitonealmente a ratones hembras de seis semanas, BALB/c AnN, caracterizados como altamente susceptibles a la infección por cisticercos de *T. crassiceps*. Como lo muestra la FIGURA 6a, los cisticercos expuestos a concentraciones menores a 1.4 μM mostraron una absorbancia semejante a los controles sin peróxido (es decir, actividad enzimática similar), mientras que los cisticercos expuestos a concentraciones mayores a 1.4 μM mostraron un decaimiento considerable de la absorbancia.

ENSAYO DE INFECTIVIDAD

El ensayo de INFECTIVIDAD (FIG. 6b) se realizó en grupos de cinco ratones contando el número de cisticercos en la cavidad peritoneal transcurridos 40 días del reto con los cisticercos. En los ratones infectados con cisticercos sin exponer al peróxido (C+), el promedio de cisticercos encontrados fue similar a los ratones infectados con cisticercos expuestos a 0.2 μM de H_2O_2 (400 en promedio). En contraste, los ratones retados con cisticercos expuestos a 0.6 μM de H_2O_2 mostraron alrededor de un tercio del número de larvas, no existiendo infección en uno de los ratones. De los cinco ratones retados con cisticercos expuestos a 1 μM de H_2O_2 , solamente uno mostró infección con tres cisticercos, lo cual no es estadísticamente significativo. En concentraciones mayores a 1 μM de H_2O_2 no hubo infección.

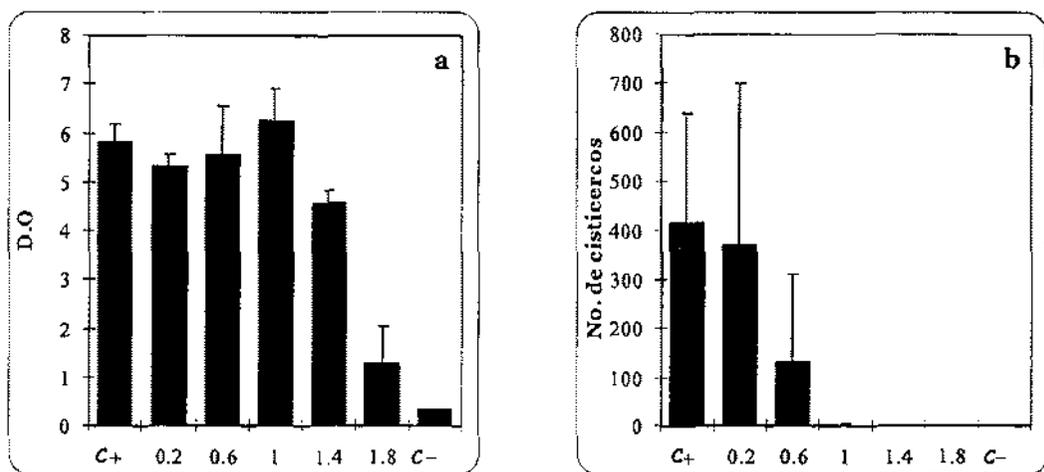


FIG 6. Gráficas de viabilidad(a) e infectividad(b). Transcurridas las 4 hrs de la incubación, se realizaron los ensayos. En a se grafica en las ordenadas las absorbancias obtenidas en cada grupo experimental, leídas a 570 nm. En b se grafica en las ordenadas el número de cisticercos obtenidos de la cavidad peritoneal de los ratones transcurridos 40 días de infección. C+ es el grupo control positivo (cisticercos incubados sin H_2O_2), C- es el grupo control negativo (cisticercos expuestos a 200 μM). Las concentraciones están en micromolar de H_2O_2 .

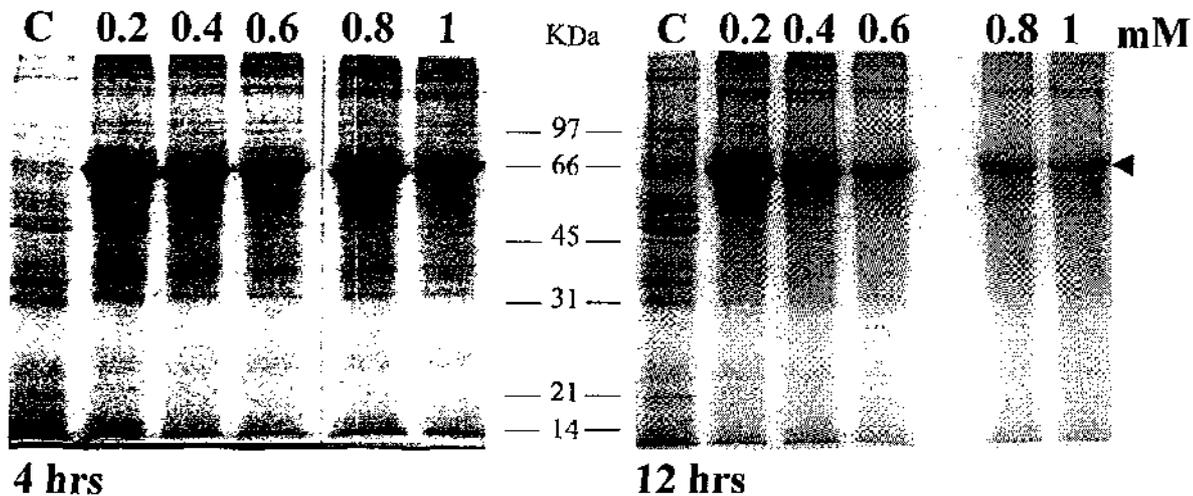


FIG 1. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre cisticercos de *T. crassiceps* mantenidos *in vitro* durante 4 y 12 hrs. Se muestran geles de SDS-PAGE al 10% con muestras de extractos crudos de cisticercos; el primer carril (C) son cisticercos incubados sólo con el medio de cultivo, los siguientes carriles son cisticercos incubados en presencia de concentraciones crecientes de H_2O_2 .

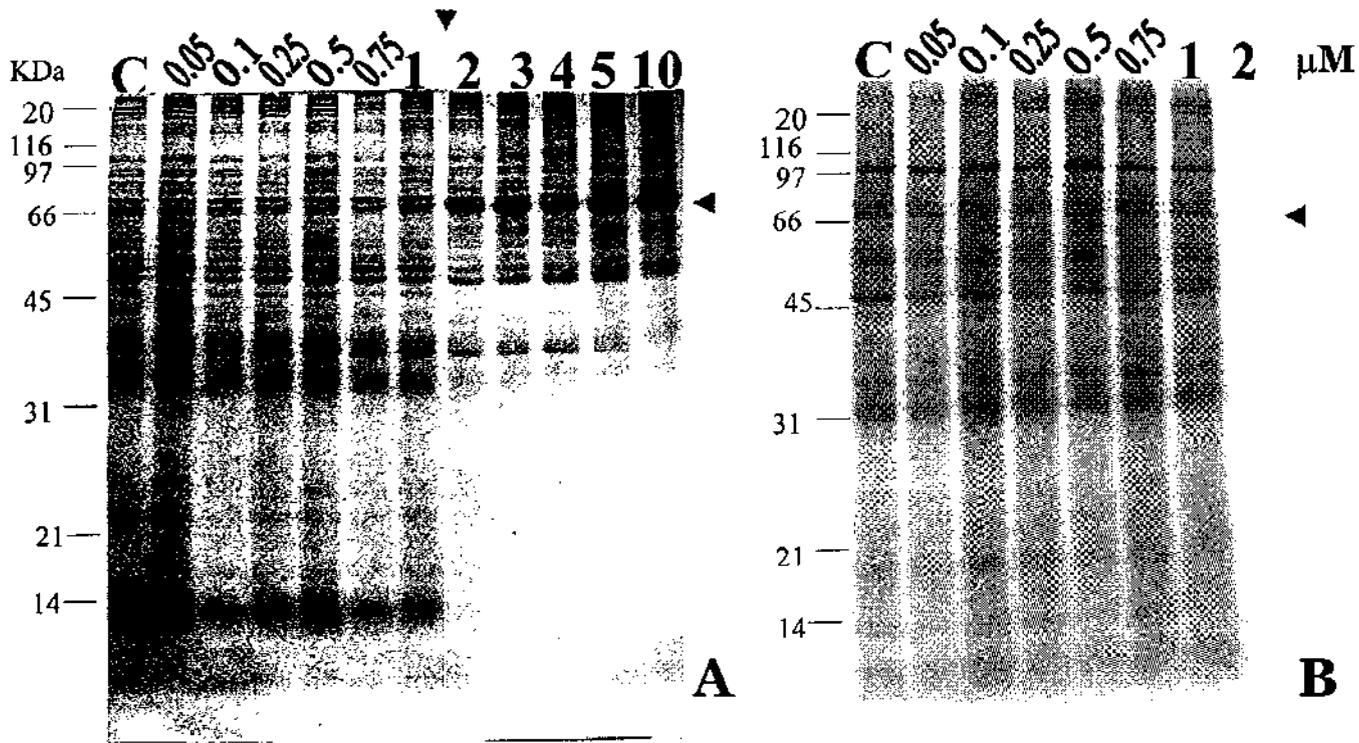


FIG 2. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre cisticercos de *T. crassiceps* mantenidos *in vitro* durante 4 hrs. El gel de SDS-PAGE (A) y su autorradiografía (B) muestran extractos crudos de cisticercos expuestos a concentraciones crecientes de H_2O_2 ; el primer carril (C, grupo control) son cisticercos incubados sólo con el medio de cultivo.

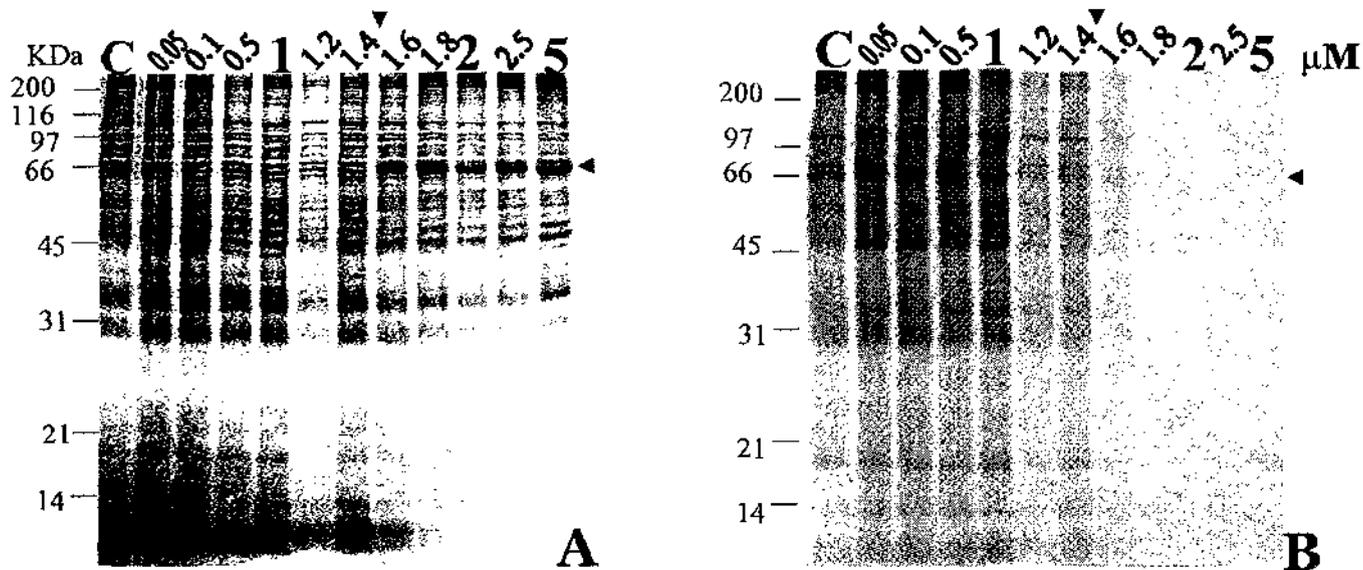


FIG 3. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre cisticercos de *T. crassiceps* mantenidos *in vitro* durante 4 hrs. El gel de SDS-PAGE (A) y su autorradiografía (B) muestran extractos crudos de cisticercos expuestos a concentraciones crecientes de H_2O_2 ; el primer carril (C, grupo control) son cisticercos incubados sólo con el medio de cultivo. Las flechas indican la concentración en que induce la fuga de la albúmina del medio de cultivo (ver texto).

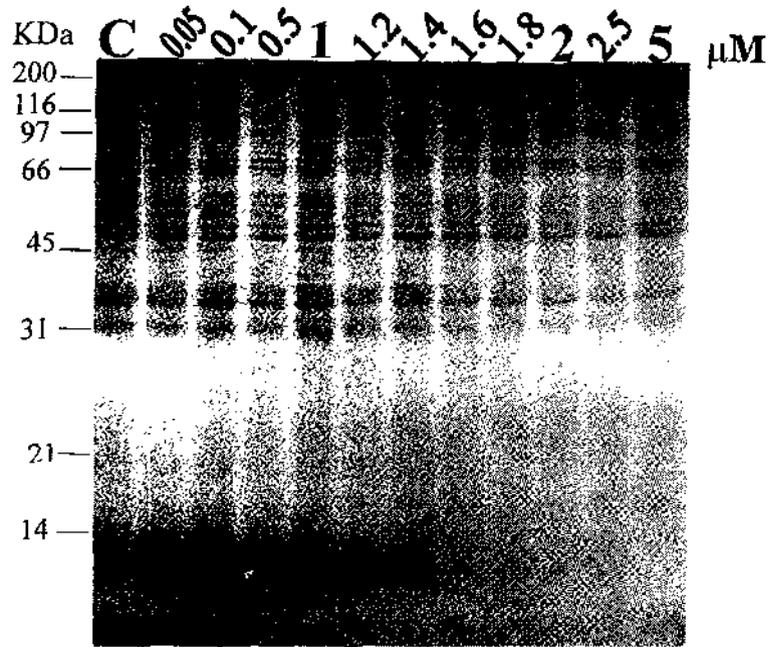


FIG 4. Efecto del H_2O_2 sobre cisticercos de *T. crassiceps* mantenidos *in vitro* durante 4 hrs en medio sin FBS. El gel SDS-PAGE muestra extractos crudos de cisticercos de expuestos a concentraciones crecientes del oxidante; el grupo control (C) son cisticercos incubados sólo en el medio de cultivo.

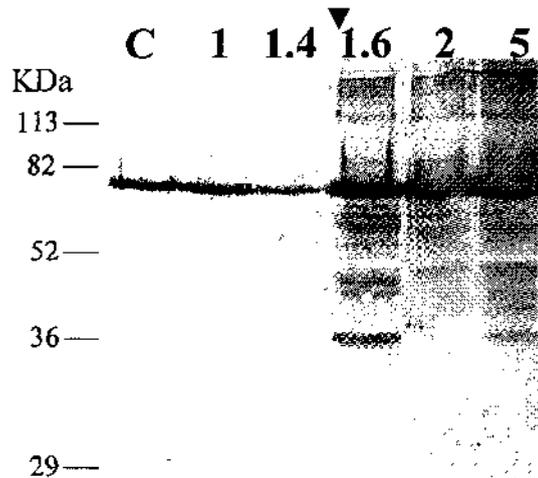


FIG 5. Presencia de albúmina en cisticercos de *T. crassiceps*. Los cisticercos se incubaron en medio RPMI con FBS 10% a diferentes concentraciones micromolares de H_2O_2 durante 4 hrs; posteriormente, se realizó una IET del extracto crudo con

V. DISCUSIÓN

La actividad de los fagocitos en contra de los parásitos, incluyendo a los eosinófilos y neutrófilos, se basa al menos parcialmente en mecanismos generadores de ROS. Los fagocitos liberan varios tipos de moléculas citotóxicas y de enzimas sobre la superficie de las larvas de helmintos, que pueden ocasionar su muerte y desintegración. El peróxido de hidrógeno está involucrado en la muerte de las larvas de helmintos mediada por eosinófilos *in vitro*, por ejemplo, en el caso del *Schistosoma mansoni*, de *Trichinella spiralis* y de *Fasciola hepatica*. La reacción inflamatoria que se da alrededor de los cisticercos en el músculo del cerdo, muestra varios tipos celulares incluyendo a los eosinófilos y a los macrófagos⁵⁶. Sin embargo, aún se desconoce el papel de los fagocitos en contra de los cisticercos, pero se ha sugerido que los cisticercos en los tejidos del huésped intermediario pueden ser sometidos a etapas de estrés oxidativo.

Antes de realizar el primer experimento, se hizo una búsqueda en la literatura para investigar las concentraciones de H_2O_2 que toleran otros helmintos. En *Brugia malayi* se ha reportado que la microfilaria resiste concentraciones entre 50 y 100 μM de H_2O_2 , y el adulto hasta 200 μM durante una hora⁵⁷. A su vez, las microfilarias de *Onchocerca cervicalis* son letalmente dañadas por concentraciones de 10 μM de H_2O_2 durante 4 hrs, así como por 100 μM en la mitad del tiempo anterior⁵⁸. En el caso del *S. mansoni*, se requieren concentraciones mayores a 500 μM de H_2O_2 durante 18 hrs para matar a todos los estadios del parásito, mientras que las esquistosómulas de 4 semanas de edad resisten 125 μM de H_2O_2 durante 18 hrs, aunque a las de 2 semanas mueren⁵⁹. Finalmente, los protoescolices del céstodo *Echinococcus granulosus* resisten hasta 20 μM de H_2O_2 durante 1 hr⁶⁰.

De esta manera en el primer ensayo se probaron concentraciones entre 0.2 y 1 mM de H_2O_2 durante 4 hrs, encontrándose que los cisticercos morían aún a la concentración menor. El daño producido por el peróxido es observable por la ausencia de síntesis proteica (autorradiografía no mostrada), por la ligera degradación del patrón proteico en los geles así como por la inmovilidad. La pérdida de movilidad es otro parámetro utilizado para determinar viabilidad en algunas filarias y en *T. crassiceps*⁶¹.

Se exploró el efecto de H_2O_2 en concentraciones de entre 0.05 μM y 5 μM de H_2O_2 , resultando que la concentración de 2 μM es letal para los cisticercos transcurridas las 4 hrs de incubación. Esto sugiere que los cisticercos de *T. crassiceps* son más susceptibles al peróxido de hidrógeno que las

microfilarias de *B. malayi* y de *O. cervicalis*, que los esquistosómulas de 4 semanas de edad, y que los protoescolices de *E. granulosus*. Parecen ser igualmente susceptibles a las microfilarias de *Dirofilaria immitis*⁶². Se ha reportado que 1×10^6 macrófagos y que 3×10^5 neutrófilos estimulados *in vitro* producen hasta 1mM y 12 μ M de H₂O₂ respectivamente^{63,64}. Sin embargo, es difícil establecer las concentraciones de H₂O₂ que se alcanzan *in vivo*.

En *E. granulosus*, los protoescolices parecen jugar un papel protector en contra de la oxidación por H₂O₂ mediada por una peroxiredoxina, ya que no muestran actividad detectable de catalasa o glutatión peroxidasa. Puesto que la cepa ORF utilizada en este proyecto carece de escólex es posible que la susceptibilidad incrementada al H₂O₂, en comparación a *E. granulosus*, se deba a la ausencia de este órgano. Sin embargo, algunos experimentos preliminares utilizando la cepa HYG (si tiene escólex), no muestran diferencias significativas en su susceptibilidad al H₂O₂.

Como se mencionó en los resultados, la presencia de albúmina en el extracto crudo de cisticercos es indicador de daño a la pared vesicular producido por el oxidante. Se han identificado proteínas del huésped en el fluido vesicular de las larvas de céstodos⁶⁵ lo que indica que son capaces de tomarlas de su entorno. También, *in vitro*, los cisticercos internalizan proteínas del medio como la albúmina e inmunoglobulinas⁶⁶, sin embargo, no se ha observado degradación de la albúmina en el cisticerco.

Una de las propiedades de la albúmina es la de antioxidante^{67,68}. Es posible que la presencia de esta proteína en los tejidos del cisticerco de *T. crassiceps* incubados en concentraciones menores a 1.6 μ M de H₂O₂, tenga un efecto protector, sin embargo, la filtración de albúmina al interior del cisticerco sin duda es un indicador de daño de la pared vesicular. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual el H₂O₂ produce daño membranar es la lipoperoxidación. Las membranas peroxidadas se vuelven más rígidas y pierden su integridad, afectando los compartimentos subcelulares, por lo que se vuelve vital para la célula viva eliminar los hidroperóxidos. Es claro que en el caso de los cisticercos ni la entrada de la albúmina del medio de cultivo ni otros mecanismos protectores bastan para evitar el daño a la pared vesicular.

Algunos helmintos muestran actividades considerables de enzimas antioxidantes (catalasa, peroxidasa, peroxiredoxinas, glutatión peroxidasa) durante el estrés por H₂O₂.

El primer mecanismo efector contra los peróxidos orgánicos es el sistema enzimático del glutatión. Se ha reportado glutatión reductasa en *Moniezia expansa* y el metacéstodo *T. taeniaeformis*^{44,38} y GST en el adulto de *Hymenolepis diminuta*⁴³ y las larvas de *E. granulosus*⁴⁵, *T. solium* y *T. taeniaeformis*^{46,38}.

Existe otro sistema generalizado de protección conocido como HSP, que también actúa durante el estrés oxidativo, aunque la información referente a los helmintos es escasa. Por ejemplo, las larvas de *T. spiralis* a las 2 hrs de exposición a 20 μ M de H_2O_2 expresan HSP60 y HSP90⁶⁹. Los cisticercos de *T. crassiceps* no producen HSP en respuesta al estrés oxidativo, en contraste con una clara respuesta al estrés calórico recientemente descrita para *T. solium* y *T. crassiceps*, incluyendo la expresión de HSP60 y HSP70⁷⁰.

La extrema susceptibilidad de los cisticercos de *T. crassiceps* a la exposición al peróxido pareciera indicar una ausencia de catalasas y peroxidasas en los tejidos. Sin embargo, la reciente clonación de GST a partir de una biblioteca de *T. solium* sugiere que pudieran poseer las enzimas del sistema de glutatión. Por ende, se requieren ensayos más detallados para definir el potencial protector en contra del estrés oxidativo, que de cualquier modo parece muy reducido.

Es difícil determinar si los cisticercos están vivos o muertos valorando solo la movilidad o la disminución gradual en la síntesis proteica. Existen varios ensayos de viabilidad que han sido empleados en helmintos, que generalmente utilizan principios colorimétricos, incorporación de radioisótopos o enzimas. En el caso de las filarias, se ha sugerido que para determinar su viabilidad se deben emplear métodos bioquímicos junto con los histológicos⁵³. De este modo se ha determinado la susceptibilidad al H_2O_2 en las microfilarias de *B. malayi* y *O. linealis*⁷¹. En la larva del equinococo se utiliza la pérdida de turgencia como una valoración de la pérdida de viabilidad y en *E. multilocularis* se ha ensayado también el método de MTT⁷² con resultados positivos. Para definir la viabilidad de cisticercos de *T. solium* lo más confiable que se ha utilizado es la evaginación del cisticerco⁷³.

Puesto que la cepa de *T. crassiceps* utilizada en este proyecto carece de escólex no se pudo realizar el último método por lo que se recurrió al método enzimático del MTT. Los ensayos de infectividad realizados por inoculación intraperitoneal de los cisticercos en ratones muestran que su confiabilidad es parcial, ya que la correlación entre el ensayo de infectividad y el método enzimático es baja. Sin embargo, el método enzimático permitió identificar la concentración en la cual el cisticerco sufre daño en su maquinaria biosintética.

VI. CONCLUSIONES

☼ El cisticerco de *T. crassiceps* tolera concentraciones de hasta 1.4 μM de H_2O_2 durante 4 hrs de exposición, y por lo tanto es menos tolerante al H_2O_2 que el metacéstodo de *Echinococcus granulosus*.

☼ El cisticerco no es infectivo cuando se expone a concentraciones mayores o iguales a 1 μM de H_2O_2 .

☼ En los cisticercos de *T. crassiceps*, existe poca correlación entre el ensayo enzimático de viabilidad y la infectividad. Esto puede deberse al hecho de que el método del MTT determina viabilidad celular, y su extrapolación a un sistema multicelular no necesariamente permite determinar la viabilidad del organismo completo.

☼ Los resultados mostrados en este proyecto, muestran que los cisticercos de *T. crassiceps* carecen de alguna maquinaria proteica en defensa o protección al H_2O_2 .

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Clinton, WA., Prema, R and Kuhn, R. 1997. *Taenia solium* Cysticercosis: Host-Parasite Interactions and the Immune Response. In: Immunopathogenetic aspects of disease induced by helminth parasites. Freedman, DO(ed): Chem Immunol. Basel, Karger. 66. pp: 209-230
- ² Morbidity and Mortality Weekly Report. 1993. Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. Dec 42 (RR16): 1-25
- ³ Tsang, VC. and Wilson, M. 1995. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. Parasitol Today. 11: 124-126
- ⁴ Flisser, A., Madrazo, I. y Delgado, H. 1997. Cisticercosis humana. Manual Moderno. México. 176 pp
- ⁵ Flisser, A. 1988. Neurocysticercosis in Mexico. Parasitol Today. 4: 131-137.
- ⁶ Willms, K. and Merchant, MT. 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol. 2: 261-275
- ⁷ Aluja, A. and Vargas, G. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. Vet Parasitol. 28: 65-77

- ⁸ Hustead, ST. and Williams, JF. 1977. Permeability studies on taeniid metacestodes: I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaeformis*, *Taenia crassiceps* and *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol.* 63: 314-321
- ⁹ Lacleste, JP., Rodriguez, M. and Landa, A *et al.* 1989. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leiden.* 57(2):115-122
- ¹⁰ Arechavaleta, F., Molinari, JL. and Tato, P. 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res.* 84: 117-122
- ¹¹ Damian, RT. 1964. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *American Naturalist.* 98: 129
- ¹² Díaz de León, L., Arcos, L. and Willms, K. 1982. The use of cell-free systems for the characterization of *Cysticercus cellulosae* antigens. *In: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Lacleste, JP. and Larralde, C(eds). Academic Press. USA. pp: 465-476
- ¹³ McManus, DP. and Lamsam, S. 1990. *Taenia crassiceps* surface immunoglobulins: parasite- or host-derived?. *Parasitol.* Aug 101(Pt 1): 127-137
- ¹⁴ White, AC., Molinari, JL. and Pillai, A *et al.* 1992. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J Parasitol.* 78(2): 281-287
- ¹⁵ Leid, RW., Grant, RF. and Suquet, CM. 1987. Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a of *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin. *Parasite Immunol.* 9: 195-204
- ¹⁶ Polla, B. 1991. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Parasitol Today.* A38-A41
- ¹⁷ Maresca, B. and Carratù, L. 1992. The Biology of the Heat Shock Response in Parasites. *Parasitol Today.* 8(8): 260-265
- ¹⁸ Newport, G., Culpepper, J. and Agabian, N. 1988. Parasite Heat-shock Proteins. *Parasitol Today.* 4(11): 306-312
- ¹⁹ Hedstrom, R., Culpepper, P.I. and Harrison, RA *et al.* 1987. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein hsp70. *J Exp Med.* 165: 1430-35
- ²⁰ Richter, D., Reynolds, SR. and Harn, DA. 1993. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* Jul. 151(1):256-265

- ²¹ Selkirk, ME., Denham, F. and Partono, F *et al.* 1989. Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in Brugian filariasis. *J Immunol.* 143: 299-308
- ²² Selkirk, ME., Smith, VP. and Thomas, GR *et al.* 1998. Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Int J Parasitol.* 28: 1315-1332
- ²³ Babior, BM. 1997. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res.* 30: 141-155
- ²⁴ Grisham, M. 1994. Medical Intelligence unit: Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen in Biology and Medicine. Landes Company. USA. 104 pp
- ²⁵ Hunter, T and Bannister, WH. 1997. Cloning, Expression, and Characterization of Two Manganese SOD from *Caenorhabditis*. *J Biol Chem.* 272(45): 28652-59
- ²⁶ Oury, TD., Day, BR. and Crapo, JD. 1996. Extracellular Superoxide Dismutase: a Regulator of Nitric Oxide Bioavailability. *Lab Invest.* Nov. 75(5): 617-632
- ²⁷ McCord, JM. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* Nov. 244(22): 6049-55
- ²⁸ Docampo, R. 1995. Antioxidant mechanism. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites.* Muller, M (ed). Academic Press. USA. pp: 147-155
- ²⁹ Chae, HZ., Robison, K. and Poole, LB *et al.* 1994. Cloning and Sequencing of thiol-specific antioxidants from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 : 7017-21
- ³⁰ McGonigle, S., Dalton, JP. and James, ER. 1998. Peroxiredoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today.* 14(4): 139-145
- ³¹ McGonigle, S., Curley, GP. and Dalton, JP. 1997. Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* Jul. 115 (Pt 1):101-104.
- ³² Tsuji, N., Kasuga-Aoki, H. and Isobe, T *et al.* 2000. Cloning and characterization of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int J Parasitol.* Feb. 30(2):125-128.
- ³³ Chandrashekar, R., Tsuji, N. and Morales, TH *et al.* 2000. Removal of hydrogen peroxide by a 1-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitol Res.* Mar. 86(3): 200-206.
- ³⁴ Salinas, G., Fernandez, V. and Fernandez, C *et al.* 1998. *Echinococcus granulosus*: cloning of a thioredoxin peroxidase. *Exp Parasitol.* Nov. 90(3): 298-301
- ³⁵ Callahan, HL., Crouch, RK. and James, ER. 1991. *Dirofilaria immitis* superoxide dismutase: purification and characterization. *Mol Biochem Parasitol.* Dec. 49(2): 245-251

- ³⁶ Sanchez-Moreno, M., Ortega, JE. and Sanchez-Navas, A *et al.* 1989. Cu-Zn-superoxide dismutase activity in *Moniezia expansa*: inhibition by pyrimidine derivatives. *Int J Parasitol.* Nov.19(7): 743-748
- ³⁷ Leid, RW. and Suquet, CM. 1986. A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. *Mol Biochem Parasitol.* Mar 18: 301-311
- ³⁸ Leid, RW., Suquet, CM. and Tanigoshi, L. 1989. Oxygen Detoxifying Enzymes in Parasites: a Review. *Acta Leiden.* 57(2): 107-114
- ³⁹ Vicsai, M. 1994. A study on the excretory/secretory products of the metacestode, *Taenia crassiceps*. Tesis para Maestría en Ciencias Médicas, recuperado el 28 de Feb 2001 de la Universidad de Queensland en el World Wide Web: <http://www.sph.uq.edu.au/acithn/thesis/VICSAI.html>
- ⁴⁰ Feng, JJ., Guo, HF. and Yao, M *et al.* 1995. Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on glutathione S-transferase and superoxide dismutase of *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice. *Acta Pharm Sinica.* 16(4): 297-300
- ⁴¹ Jaffe, JJ. and Lambert, RA. 1986. Glutathione S-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol Biochem. Parasitol.* 20: 199-206
- ⁴² Tripp, C., Frank, RS. and Selkirk, M *et al.* *Dirofilaria immitis*: molecular cloning and expression of a cDNA encoding a selenium-independent secreted glutathione peroxidase. 88: 43-50
- ⁴³ Brophy, PM. and Barrett, J. 1990. Blocking factors and the isolation of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae). *Parasitol.* 100: 137-141
- ⁴⁴ McCallum, MJ. and Barrett, J. 1995. The purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int J Biochem Cell Biol.* Apr. 27(4): 393-401
- ⁴⁵ Morello, A., Repetto, Y. and Atias, A. 1982. Characterization of Glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Comp Biochem Physiol.* 72B: 449-452
- ⁴⁶ Vibanco-Perez, N., Jimenez, L. and Merchant, MT *et al.* 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol.* Jun. 85(3): 448-453
- ⁴⁷ Paul, JM. and Barrett, J. 1980. Peroxide metabolism in the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. *Int J Parasitol.* 10: 121-124
- ⁴⁸ Maizels, R., Bundy, D. and Selkirk, M *et al.* 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature.* 365. Oct: 797-805

- ⁴⁹ Simurda, MC., Van Keulen, H. and Rekosh, DM *et al.* 1988. *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp Parasitol.* 67: 73-84
- ⁵⁰ Callahan, HL., Crouch, RK. and James, ER. 1988. Helminth Anti-oxidant Enzymes: a Protective mechanism against Host Oxidants ?. *Parasitol.* 4 (8): 218-225
- ⁵¹ Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259): 680-685.
- ⁵² Bonner, WM. and Laskey, RA. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem.* 46: 83-88
- ⁵³ Comley, JC., Rees MJ., Turner CH. and Jenkins, DC. 1989. Colorimetric quantitation of filarial viability. *Int J Parasitol.* 19(1): 77-83
- ⁵⁴ Towbin, H., Staehelin T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76: 4350-54
- ⁵⁵ Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54
- ⁵⁶ Aluja, A. and Vargas, G. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol.* 28: 65-77
- ⁵⁷ Ou, X., Thomas, RT. and Chacón, MR *et al.* 1995. *Brugia malayi*: Differential susceptibility to and metabolism of hydrogen peroxide in adults and microfilariae. *Exp Parasitol.* 80: 530-540
- ⁵⁸ Callahan, HL. and Crouch, RK. and James, ER. 1990. Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for *Onchocerca cervicalis* microfilariae. *Parasitol.* 100: 407-415
- ⁵⁹ Nare, B., Smith, JM. and Prichard, RK. 1990. *Schistosoma mansoni*: Levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development. *Exp Parasitol.* May. 70(4): 389-397
- ⁶⁰ Salinas, G., Fernández, V. and Fernández, C *et al.* 1998. *Echinococcus granulosus*: Cloning of a thioredoxin peroxidase. *Exp Parasitol.* 90: 298-301
- ⁶¹ Taylor, AE. 1963. Maintenance of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda: Cyclophyllidae) in a chemically defined medium. *Exp Parasitol.* 14: 304-310
- ⁶² Rzepezyk, CM. and Bishop, CJ. 1984. Immunological and ultrastructural aspects of the cell-mediated killing of *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Parasite Immunol.* 6: 443-457
- ⁶³ Martínez, J. and Moreno, JJ. 1996. Influence of superoxide radical and hydrogen peroxide on arachidonic acid mobilization. *Arch Biochem Biophys.* 191-198

-
- ⁶⁴ Test, ST. and Weiss, S. 1984. Quantitative and temporal characterization of the extracellular H₂O₂ pool generated by human neutrophils. *J Biol Chem.* 259 (1): 399-405
- ⁶⁵ Pappas, PW. 1983. Host-Parasite interface. *In: Biology of the Eucestoda.* Vol 2. Arme, C. and Pappas, PW (eds). Academic Press. London. Pag 310
- ⁶⁶ Ambrosio, J., Landa, A. and Laclette, JP. 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*: kinetics of internalization. *Arch Med Res.* 25: 325-330
- ⁶⁷ Kouoh, F., Gressier, B. and Luyckx, M *et al.* 1999. Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Farmaco.* Oct. 54 (10): 695-699
- ⁶⁸ Halliwell, B and Gutteridge, MC. 1990. The Antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1): 1-8
- ⁶⁹ Martínez, J., Pérez-Serrano, J. and Bernadina, WE *et al.* 1999. In vitro stress response to elevated temperature, hydrogen peroxide and mebendazole in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Int J Parasitol.* 29: 1457-1464
- ⁷⁰ Vargas-Parada, L., Solís, CF. and Laclette, JP. 2001. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitol.* 122. En prensa
- ⁷¹ Taylor, MJ., Cross, HF. and Mohammed, AA *et al.* 1996. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Onchocerca lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN gamma-activated macrophages. *Parasitol.* 112(Pt 3): 315-22.
- ⁷² Emerly, I., Bories, C. and Liance, M *et al.* 1995. In vitro quantitative assessment of *Echinococcus multilocularis* metacestode viability after *in vivo* and *in vitro* maintenace. *Int J Parasitol.* 25(3): 275-278
- ⁷³ Cañedo, L., Laclette, JP. and Morales, E. 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. *In: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Laclette, JP. and Larralde, C(eds). Academic Press. USA. pp: 363-373