



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PARA
LA SUPERÓXIDO DISMUTASA CU/ZN DE *TAENIA*
CRASSICEPS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS
OXIDATIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

JESUS RICARDO PARRA UNDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*. Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Edificio A, 2^{do} piso, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 43806-M y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN210603-03. Asimismo, el autor de este trabajo recibió una beca para la realización de sus estudios de Maestría del Programa de becas del CONACyT (beca # 194081).

COMITÉ TUTORAL:

Dra. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Dr. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO
Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA

A mi Mamá, por ser mi principal motivación, agradeciendo todas sus enseñanzas, cuidados, cariños y esfuerzos que desde siempre me ha dedicado. Mamá, eres el más grande motivo de esta familia y de cada instante desde el primer paso de mi vida

Pero sobre todo, agradezco a la vida que me permite aún tenerte a mi lado.

Agradecimientos

Al Dr. Abraham Landa, por abrirme las puertas en tan importante etapa de mi vida, por su contagiosa ambición de éxito, el apoyo, paciencia, tiempo, observaciones y recomendaciones importantes en mi formación, por su gran simpatía y tan agradable sonrisa.

Pero sobre todo, por su gran calidad humana y confianza en momentos difíciles.

A mis Amigos: Anayetzin Torres, Víctor Sanabria, Felipe Vaca. Por ser mis cómplices y por tener tan particular forma de complicar las cosas.

Al finísimo personal del laboratorio de Biología Molecular de Taenia solium Encabezado por el Dr. Abraham Landa y conformado por Alicia, Dr. Agustín Plancarte, Dr. Alejandro Padilla, Anayetzin, Felipe, el Vic, Gabriela, Paty, Mario y Pola.

A Adri todo.

Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas.

Louis Pasteur

CONTENIDO	
ÍNDICE	
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUCCIÓN	11
1.1 GENERALIDADES DE <i>Taenia crassiceps</i>	11
ONCOSFERA Y HUEVO	12
LARVA O CISTICERCO	12
ADULTO	13
1.2 ESTRÉS OXIDATIVO	16
ANIÓN SUPEROXIDO	16
PEROXIDO DE HIDRÓGENO	17
SISTEMAS ANTIOXIDANTES	17
SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	18
SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	18
SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN HELMINTOS	19
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENRAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 .MATERIALES Y MÉTODOS	21
MODELO <i>Taenia crassiceps</i> - RATÓN	21
PREPARACION DE ADNg DE <i>T.crassiceps</i>	21
PREPARACIÓN DE ARNm	22
AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA SOD	22
CLONACIÓN Y PREPARACIÓNDE ADN PLASMIDICO	23
SECUENCIACIÓN Y ANALISIS	24
PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE <i>T.crassiceps</i>	25
SISTEMA GENERADOR DEL RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)	25
DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE SOD EN EXTRACTOS DE <i>T.crassiceps</i>	26
ENSAYOS DE CULTIVO DE <i>T.crassiceps</i> con $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2	27
DETERINACIÓN DE LA VIABILIDAD	27

6. RESULTADOS	29
MÓDELO <i>T. crassiceps</i> - RATÓN	29
DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SOD EN EXTRACTO DE <i>T. crassiceps</i>	29
CARACTERIZACIÓN DEL GEN PARA LA SOD-Cu/Zn	31
SISTEMA GENRADOR DEL IÓN SUPERÓXIDO	35
INCUBACIÓN DE <i>T. crassiceps</i> CON O ₂ ⁻ GENRADO ENZIMÁTICAMENTE	36
EXPRESIÓN DEL GEN PARA LA SOD-Cu/Zn DE <i>T. crassiceps</i> CON O ₂ ⁻	38
INCUBACIÓN DE <i>T. crassiceps</i> CON H ₂ O ₂	39
EXPRESIÓN DEL GEN PARA LA SOD-Cu/Zn DE <i>T. crassiceps</i> CON H ₂ O ₂	41
7. DISCUSIÓN	42
8. ANEXO	45
9. REFERENCIAS	47

RESUMEN

La cisticercosis en el ratón es inducida por inoculación del cestodo (*Taenia crassiceps*) en su estadio larvario o de cisticerco, en el peritoneo. Se ha especulado que la permanencia y resistencia de los cestodos en sus hospederos se debe a la cantidad de enzimas desintoxicantes de especies reactivas que poseen. Los cisticercos están expuestos a una variedad de especies reactivas producidas por sus procesos metabólicos, así como por las células de la respuesta inmune en la defensa de su hospedero, como por ejemplo, el estallido respiratorio; proceso en el que los leucocitos en respuesta a patógenos liberan anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y otros xenobióticos. La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima desintoxicante que cataliza la dismutación del anión superóxido al agua oxigenada y al oxígeno. Hasta la fecha en los helmintos sólo se ha descrito la SOD-Cu/Zn en sus formas, citosólica y de secreción.

Este trabajo se realizó con el fin de estudiar los mecanismos que *T. crassiceps*, posee para responder al estrés oxidativo de su hospedero. Para ello se clonó la región del gen que codifica para la SOD de Cu/Zn de *T. crassiceps*. El análisis de esta región mostró que codifica para la enzima SOD-Cu/Zn citosólica, con una secuencia primaria que tiene una identidad del 95%, 50% y 61% con las enzimas de *T. solium*, humano y cerdo. Los cisticercos de *T. crassiceps* cultivados a diferentes tiempos y concentraciones del ión superóxido, no son afectados en su viabilidad. Por otro lado, concentraciones menores a 2 mM de H_2O_2 tampoco afectan la viabilidad de los cisticercos. En contraste concentraciones mayores a 2 mM de H_2O_2 son tóxicas y afectan la viabilidad y desarrollo del parásito. Finalmente, ensayos de transcripción reversa y PCR usando el ARN de cisticercos expuestos a diferentes concentraciones de los oxidantes antes mencionados mostraron que el gen para la SOD-Cu/Zn no es inducible por éstos.

ABSTRACT

Mouse cysticercosis is produced by inoculation of cysticerci of *Taenia crassiceps* in the peritoneal cavity. It has been speculated that the permanence and resistance of the cestodes in their host is due to the amount of antioxidant enzymes that possess. Cysticerci are exposed to a great variety of reactive species produced by host immune response and its own metabolic processes. The respiratory bursts produced by the leukocytes liberate superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical. In parasite superoxide dismutase (SOD) is the enzyme which catalyses the dismutation of superoxide anion to produce oxygen and hydrogen peroxide.

The aim of this work was to study *in vitro* the expression of the SOD Cu/Zn gene in *Taenia crassiceps* under oxidative stress conditions. To achieve this, coding SOD Cu/Zn region of *T. crassiceps* was cloned and sequenced. The analysis of the amino acid sequence showed that it had an identity of 95% with the cytosolic SOD-Cu/Zn of *Taenia solium*, and 50% and 61% with human and pig, respectively. To determine the expression of SOD Cu/Zn gene, the cysticerci were incubated at different times and concentrations of oxidants ($O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2) and the total RNA isolated. Primers flanking the SOD Cu/Zn coding region sequence and the reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to measure SOD Cu/Zn mRNA. These treatments neither induce any increase in expression levels of SOD gene. The $O_2^{\cdot-}$ has no effect on the viability of the parasite, while H_2O_2 had a toxic effect at concentrations above 2 mM. Noteworthy, the concentrations used of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 did not affect the expression of the SOD Cu/Zn gene.

1. INTRODUCCIÓN:

GENERALIDADES DEL PARÁSITO

Taenia crassiceps

PHYLUM:	<i>Platyhelminthes</i>
CLASE:	<i>Cestoidea</i>
SUBCLASE:	<i>Cestoda</i>
ORDEN:	<i>Cyclophylidea</i>
FAMILIA:	<i>Taenidae</i>
GENRO:	<i>Taenia</i>
ESPECIE:	<i>crassiceps</i>

El estadio de gusano adulto de la *Taenia crassiceps* se aloja en el intestino de los zorros rojos (hospedero definitivo) de Europa y Norteamérica. Un hospedero útil que se utiliza e infecta en el laboratorio es el roedor; en este la forma larvaria o cisticerco se inocula en la cavidad peritoneal. Debido a la propiedad de formar nuevos individuos por gemación se han logrado adaptar en laboratorios varias cepas de este cestodo a crecer en ratones sin pasar por el estadio adulto; un ejemplo es la cepa WFU que crece en ratones Balb/c. La reproducción experimental en la cavidad peritoneal de ratones permite obtener grandes cantidades de cisticercos. Por ello se le utiliza como un modelo para el estudio de la cisticercosis causada por *Taenia solium*; además las propiedades bioquímicas, inmunológicas así como las características morfológicas y fisiológicas de este parásito son semejantes a *T. solium* [1-4]. Existen al menos otras 2 cepas de este parásito, una denominada Hyg similar a la WFU ambas con escólex y una denominada ORF carente de éste [5, 6]. Estudios sobre estas cepas de *T. crassiceps*, en especial la ORF, han indicado que el balance hormonal y género del hospedero murino son de gran importancia para la velocidad de reproducción, ya que en ratones hembras se reproducen mejor [7]. El ciclo de vida de *T. crassiceps* en los cestodos comprende tres estadios: huevo, larva y adulto (fig. 1).

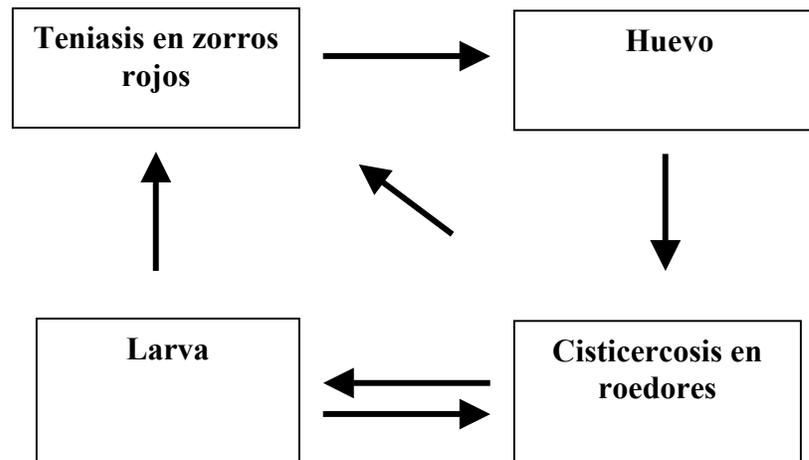


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. Las infecciones se dan de manera natural en animales silvestres. En el laboratorio, los cisticercos pueden ser mantenidos en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c a través de infecciones continuas. Adaptado de Romano, *et al.* 2003.

ONCÓSFERA Y HUEVO

Los huevos se componen de una cubierta protectora o embrióforo formada por bloques de queratina que son unidos por una proteína cementante. Generalmente su coloración es blanquecina o ligeramente amarillenta aunque varía de acuerdo con los pigmentos que absorben en el intestino de los hospederos. El embrióforo recubre a la oncósfera o embrión hexacanto, nombrada así ya que presenta 3 pares de ganchos, esta tiene forma esférica con un tamaño de 30 - 40 μm . [8].

LARVA O CISTICERCO

La morfología de la forma larvaria de este cestodo, es una vesícula de 0.5 a 1.5 cm de diámetro, con un escólex invaginado, de donde se desarrolla el verme adulto que posee cuatro ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos que son en número de 22 a 28. Este se observa como una esfera blanca opaca rodeada de líquido, cubierto por la pared vesicular (fig. 2). Microscópicamente se pueden observar hacia el exterior microvellosidades cubiertas por una membrana plasmática que lo protegen del contacto directo con el tejido del hospedero. La pared vesicular contiene varios tipos de células dispersa en un tejido conectivo que colinda con el fluido vesicular. Este fluido constituye más del 90% del contenido de la larva [9].

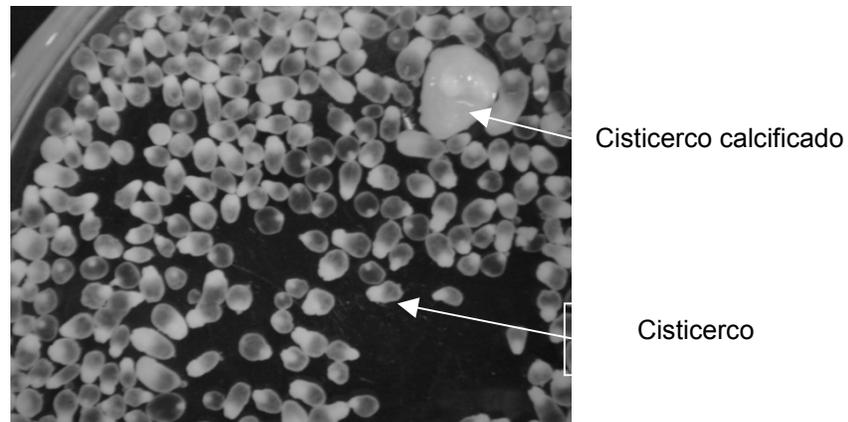


FIGURA 2. Cisticercos de *Taenia crassiceps*. Los puntos blancos opacos son el escólex.

ADULTO

El estadio adulto presenta un cuerpo alargado, adaptado a la forma tubular del intestino delgado de su hospedero intermediario vertebrado; el zorro. Este estadio morfológicamente presenta un cuerpo con simetría bilateral, compuesto por proglótidos alargados y aplanados dorsoventralmente. El parásito adulto puede dividirse en 3 regiones: **El escólex**: órgano de fijación a la mucosa intestinal, redondeado con acetábulos redondos u ovales (ventosas), además de un roseto armado de 22 a 32 ganchos que miden entre 0.110 y 0.180 mm de largo; como se observa en la (fig. 3). **El cuello**: que es la región de tejido indiferenciado situado inmediatamente abajo del escólex; Esta zona no es segmentada y produce por septación transversal los proglótidos, que componen el estróbilo; de ahí que la infección persista mientras el escólex y el cuello permanezcan unidos a la pared del intestino del hospedero.

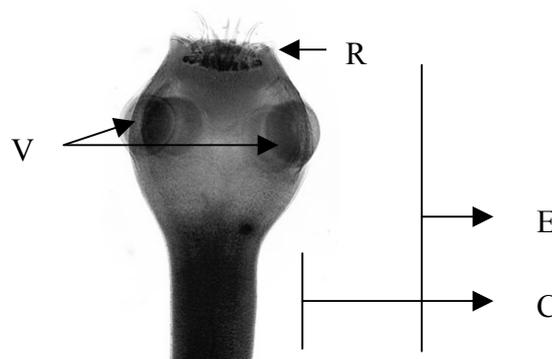


FIGURA 3. Escólex (E) de *Taenia crassiceps*. Se observa a simple vista un par de ventosas (V) y el roseto (R). (C) Cuello zona de crecimiento, donde se produce el estróbilo.

El estróbilo: Está formado por un número variable de segmentos llamados proglótidos, que aumentan su grado de madurez a medida que se alejan del cuello. En el extremo proximal se encuentran los proglótidos inmaduros, en los que apenas se distinguen las estructuras celulares que originan los genitales masculinos y femeninos que alberga cada segmento, ya que este organismo es hermafrodita; a continuación se encuentran los proglótidos maduros, de forma cuadrangular, en los que se observan los órganos reproductores completamente desarrollados conteniendo entre 150 y 200 testículos. En la porción final del estróbilo se localizan los proglótidos grávidos de forma rectangular, ocupados casi en su totalidad por el útero que presenta entre siete y trece ramas uterinas, con los órganos sexuales atrofiados y llenos de huevos [8].

Los cestodos carecen de sistema digestivo, pero en su lugar, poseen una superficie externa o tegumento de gran importancia fisiológica, con actividad metabólica, por la que a través de ella absorbe y excreta selectivamente, por difusión o por transporte activo las sustancias que requieren para su deshecho, defensa y nutrición. La glucosa es el nutriente más importante, ya que esta es la fuente de energía primaria en los cestodos. También los aminoácidos, purinas, pirimidinas y nucleósidos son absorbidos por esta superficie, y utilizados para sintetizar sus propias vitaminas y ácidos nucleicos [10]. Este tegumento (fig. 4), es el tejido más externo del parásito; compuesto por la membrana tegumental y un sincicio anucleado cubierto de extensiones citoplásmicas, mitocondrias y vacuolas de tamaños variables [11]. El elemento más externo del tegumento es un glicocálix sobre la membrana tegumentaria, una cubierta con moléculas que inactivan algunas enzimas del hospedero y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos.

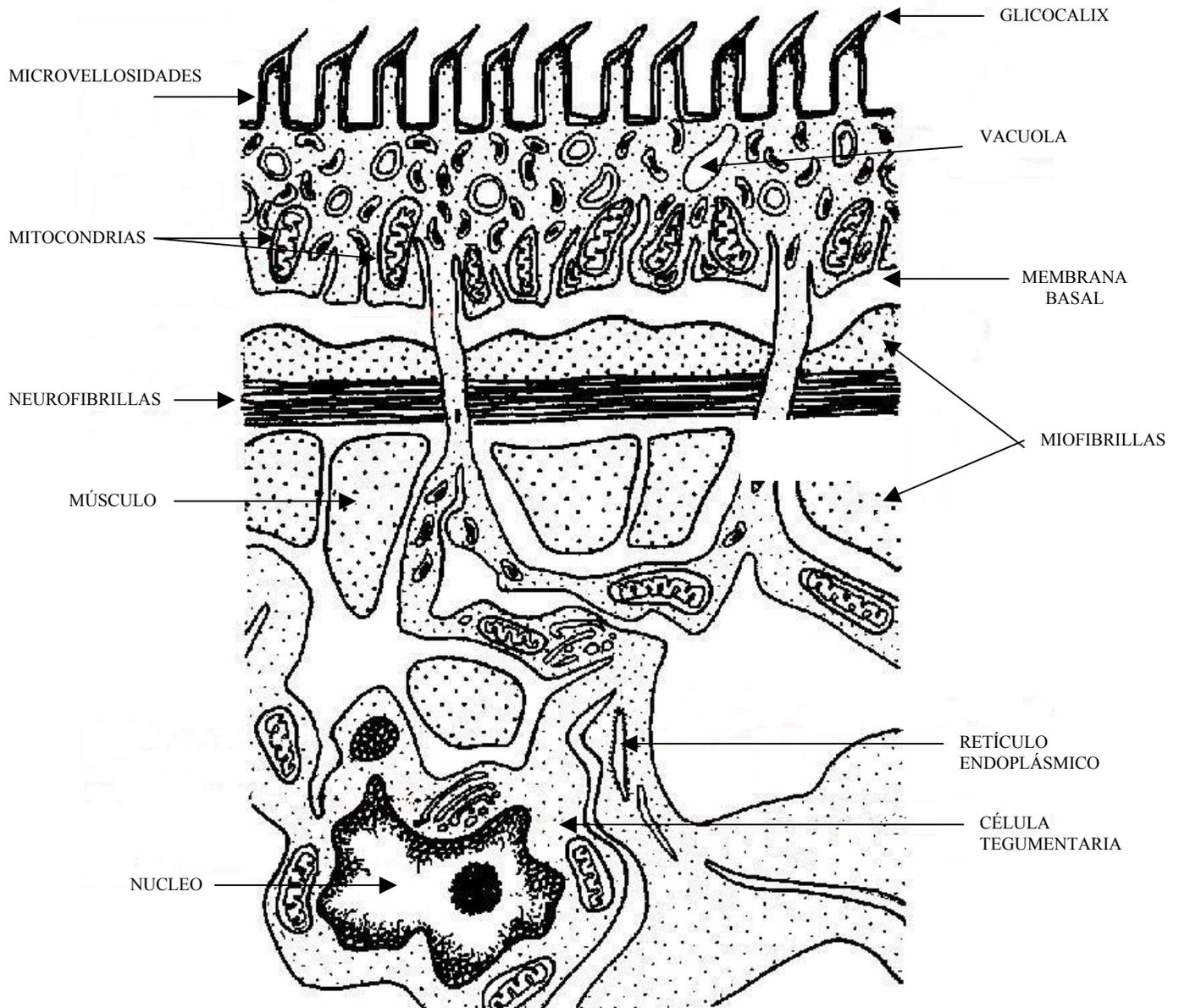


FIGURA 4. Esquema de la pared vesicular de un cestodo (Adaptado de BIODIDAC, University of Ottawa)

El parénquima, es delimitado por una membrana basal (colágena tipo IV) que tiene la función de sostén. Este también es considerado como centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno, es un tejido en el que se encuentran los sistemas de excreción, sistema nervioso, así como los paquetes de fibras musculares. El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios cerebroides en el escólex unidos mediante comisuras transversas. De estos ganglios salen cuatro cordones nerviosos amielínicos, dos anteriores que inervan el escólex y dos posteriores que corren a lo largo del estróbilo, inervándolo totalmente y conectándose por medio de comisuras transversas interproglotideas. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones

laterales. Algunos de los neuropéptidos de importancia en la transmisión de estímulos son la serotonina y la acetilcolina.

La osmorregulación y la excreción dependen de un sistema protonefridial, con 2 pares de canales excretores laterales y conexiones transversas. El aparato excretor, está formado por células flamígeras, dispuestas en grupos de cuatro en el extremo libre de los túbulos. En el estadio adulto, estos últimos son prolongaciones capilares de los canales excretores que contienen moléculas solubles (urea, amoníaco) por lo general, son cuatro, dos dorsolaterales y dos ventrolaterales; los cuatro corren paralelamente a lo largo del estróbilo uniéndose a nivel del escólex. Los ventrales se conectan entre sí en el extremo posterior de cada segmento, por medio de un tubo transverso [12]. El sistema reproductor, es hermafrodita; los órganos reproductivos femeninos y masculinos están presentes en cada proglótido.

ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico proporcionado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes [13]. Los ER son especies químicas que son capaces de extraer electrones de las moléculas vecinas para completar su orbital; convirtiéndose en componentes altamente reactivos y en las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos [14]. Por ejemplo, el ión hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se generan por la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria, como productos de reacciones metabólicas normales en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico, membrana plasmática, los peroxisomas [15] y por macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del hospedero [16, 17]. Estas especies causan daño a toda clase de moléculas biológicas conduciendo a la oxidación, despolimerización de polisacáridos, modificaciones de ADN ruptura de cadenas, daño a la membrana, lípidos, proteínas, carbohidratos, además de estar involucrados en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, daño a la membrana, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, fragmentación y daño a carbohidratos [18].

ANIÓN SUPERÓXIDO

La reducción univalente del oxígeno, genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucra cuatro electrones, produciendo tres compuestos denominados (ERO), estos son el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). El anión superóxido se produce en el organismo durante el proceso metabólico normal, radiación ionizante; y en respuesta a patógenos por los leucocitos en el estallido respiratorio. El anión superóxido no es extremadamente dañino por sí sólo, pero puede interactuar con el óxido nítrico y conducir a la formación de otras especies altamente oxidantes como los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), hidroxilo ($\text{HO}_2\cdot$), y el peroxinitrilo ($\text{ONOO}\cdot$) [19].

El anión O_2^- es más selectivo en su reactividad y es potencialmente más dañino de esta forma; debido a que puede difundir una distancia considerable antes de que se encuentre con un posiblemente blanco. El anión O_2^- es la base conjugada del radical oxidante hidroperoxilo (HO_2^\cdot). El O_2^- es inestable en solventes protonados como el agua, a pH neutro es suficientemente estable para oxidar compuestos como fenoles, tioles, ascorbato, catecolaminas, leucoflavinas, tetrahidropterinas, sulfito, con hierro libre o unido a algunas proteínas, por ejemplo los centros [Fe-S] y otros ERO como el propio O_2^- , el óxido nítrico y los radicales fenoxi [20]. Además este anión inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa o afecta la reducción del NAD^+ y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de aminoácidos ramificados, la deshidratasa del dihidroxiácido, la reductasa del ribonucleótido que genera los difosfato de desoxiribonucleótidos para la síntesis del ADN y una fosfatasa de la proteína la calcineurina, importante en la transducción de señales [21].

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es la forma menos reactiva de las ERO. Su importancia recae en el hecho de que participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de ERO. Además, atraviesa con suma facilidad las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción. Se puede originar a partir de diversas fuentes: Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones ($O_2 + 2 e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + H_2O$) [22]. Por dismutación del superóxido [23] o como producto de algunas reacciones por las enzimas (glucosa oxidasa, uricasa.) [24], así como por reacciones químicas de autooxidación.

Por otro lado, el H_2O_2 está implicado en la señalización y regulación de genes como los de la superóxido dismutasa Mn^{3+} [25], interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos, a través de NF κ B y AP-1 [26].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Todos los organismos aerobios requieren mecanismos que limiten el daño molecular causado por las ERO como O_2^- , H_2O_2 , y el ión hidroxidrido (HO^\cdot) que son incrementadas por exposición a la radiación, ciclización redox de xenobióticos o fagocitos estimulados del hospedero [27].

Las ERO formadas en el organismo pueden iniciar una serie de reacciones en cadena, que continúan hasta que éstos son eliminados tras diversas reacciones con otras ERO o por la acción de algún sistema antioxidante, el cual protege a los tejidos de los efectos que ellos producen. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. Unos previenen la formación de nuevos ERO, convirtiéndolos en moléculas menos

perjudiciales antes de que puedan reaccionar y formar nuevos ERO a partir de otras moléculas. Para detener este proceso destructivo los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección al daño producido por las moléculas oxidantes[28]. Esta protección contra el daño oxidativo puede ser por prevención, intercepción y reparación.

La prevención de la formación de ERO es la primera línea de defensa contra ellos. Esto incluye a proteínas como la ferritina, transferrina y la ceruloplasmina que se unen a iones metálicos (cobre y hierro) con el fin de secuestrarlos e impedir su oxidación o bien por utilización de pigmentos como la melanina que protegen de la radiación, impidiendo se generen nuevos ERO. La intercepción de los ERO, es el proceso de desactivación de los mismos, lo podemos dividir en dos clases enzimáticos y no enzimáticos. Los no enzimáticos los cuales a su vez podemos subdividir en dos subclases: a) Sustancias eliminadoras o secuestradoras que son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales, un ejemplo de esto son el α -tocoferol ácido ascórbico, carotenos y glutatión y b) sustancias proteicas como la lactoferrina, la ceruloplasmina y la transferrina; y los sistemas enzimáticos, por ejemplo las tres principales enzimas antioxidantes, la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. El último mecanismo de protección es la reparación del daño producido por los ERO sobre las moléculas como el ADN, lípidos, proteínas y otros compuestos. Estos sistemas enzimáticos están relacionados con la reparación de ADN lipolíticos y proteolíticos capaces de restituir las funciones perdidas por las moléculas [18].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Este sistema consiste en la formación de compuestos no radicales. Estos antioxidantes capturan a los ERO impidiendo reacciones en cadena, o la formación de ERO secundarios por medio de la unión a compuestos de alto peso molecular; algunos solubles en agua como el ácido ascórbico tioles, urato y piruvato, así como algunos lípidos solubles como la vitamina E y el β -caroteno [29].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Los sistemas enzimáticos están conformados por una serie de enzimas antioxidantes esenciales en los parásitos [27, 30]. Las principales familias de enzimas antioxidantes en organismos eucariontes son las catalasas (CATs), las Glutatión peroxidases (GPXs) las peroxiredoxinas (PRXs). Las tres presentan actividad catalítica para descomponer H_2O_2 para y producen agua y oxígeno molecular. También las GPXs, las PRXs y las Glutatión S-transferasas pueden reducir hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos dando como producto final agua. Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del ion superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular y son la primera línea de defensa que tienen los organismos

[31]. El descubrimiento de estos sistemas enzimáticos representa un avance para el entendimiento de cómo los parásitos se defienden del estrés oxidativo interno y externo.

SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN HELMINTOS

La superóxido dismutasa (SOD) esta ampliamente distribuida en los organismos y existe en una variedad de formas que se clasifican, según el cofactor metálico que utiliza (Cu/Zn, de Mn y Fe), todas catalizan la misma reacción antes mencionada. Existen tres tipos de SODs en organismos eucariontes la de Cu/Zn (citosólica y otra extracelular), la de SOD de Mn³⁺ mitocondrial, y una de Fe identificada en protozoarios, algas y organismos fotosintéticos. Cada una de ellas es codificada por un gen diferente y difieren en su estructura y localización en la célula [32]. La SOD citoplásmica de Cu/Zn se encuentra ampliamente distribuida en el citosol y en el núcleo, pero está ausente en la mitocondria y compartimentos secretorios [33]. La SOD extracelular se encuentra fuera de las células en el plasma linfa y líquido cefalorraquídeo, mientras la SOD de Mn³⁺ está localizada en la matriz de la mitocondria [33]. La SOD de Cu/Zn citosólica es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas de 16 kDa, cada una contiene un átomo de cobre y uno de zinc, la SOD extracelular de Cu/Zn es una glicoproteína tetramérica compuesta de cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de 30 KDa. La SOD citoplásmica y la extracelular tienen un 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos y poseen los residuos conservados requeridos para la actividad y unión a los metales, como los residuos de histidina, y el aspartato envuelto en la unión al zinc, dos cisteínas envueltas en el puente disulfuro y la arginina en la entrada del sitio activo. En esta enzima solo los átomos de cobre participan en la ciclización oxido-reducción durante la dismutación de O₂⁻. Los átomos de zinc no están involucrados en el ciclo redox pero mantienen la configuración del sitio activo y facilitan la oxidación.

La SOD de Mn³⁺ o mitocondrial es una proteína tetramérica que es codificada en el núcleo, sintetizada como un precursor con un péptido señal que le ayuda a ser transportada hacia la mitocondria, donde pierde este péptido. La proteína precursora presenta un peso molecular de 25 KDa y la proteína madura dentro de la mitocondria un peso molecular de 22 KDa.

La SOD de Fe³⁺ es un tetrámero y se encuentra principalmente en organismos fotosintéticos ubicada en citoplasma, cloroplasto de algunas plantas, tiene un peso molecular de 22 KDa [20]. Cabe mencionar que las SOD de Mn³⁺ y la de Fe no han sido descrita en helmintos.

La SOD-Cu/Zn está presente en extractos de trematodos, nematodos y cestodos, incluido *T. solium* [34, 35]. Asimismo, se han realizado caracterizaciones moleculares amplias de los genes que codifican a estas 2 formas de SOD-Cu/Zn y se han producido y caracterizado varias enzimas recombinantes [30, 36-39].

2. HIPÓTESIS

La exposición del parásito a EROs ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) modificará la expresión del gen que la codifica.

3. OBJETIVO GENRAL

Estudiar la variación en la expresión de la SOD-Cu/Zn exponiendo cisticercos de *Taenia crassiceps* a ion superóxido y peróxido de hidrógeno.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Obtención de cisticercos a partir de ratones infectados con *Taenia crassiceps*.
- 2.- Clonación y caracterización del gen para la SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*.
- 3.- Evaluación del efecto del ión superóxido y peróxido de hidrógeno en cisticercos *in vitro*.
- 4.- Determinar la expresión del gen para SOD-Cu/Zn en cisticercos cultivados en presencia de ión superóxido y peróxido de hidrógeno.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo *Taenia crassiceps* - Ratón:

Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos de infecciones previas de ratones hembras Balb/c de 10 semanas con la cepa WFU. Para la infección se utilizó una aguja de calibre 16; y cisticercos de 2-3 mm que fueron inyectados el peritoneo del ratón. Los ratones fueron mantenidos en condiciones normales con alimento y agua *ad libitum.*, posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical a diferentes tiempos de infección. Los cisticercos fueron removidos de la cavidad peritoneal con PBS estéril mediante lavados y utilizados en posteriores infecciones para mantener la cepa, así como para obtener cisticercos para los experimentos.

Preparación de ADN genómico de *T. crassiceps*:

Cisticercos (5 g) de *T. crassiceps* congelados se resuspendieron con 10 volúmenes de amortiguador de lisis (ANEXO) conteniendo 20 µg/mL de ARNasa tipo II, la suspensión se incubó 1h a 37°C. Terminado este tiempo se adicionó proteinasa K a una concentración de 20 µg/mL y se incubó en agitación por 3 horas a 55°C, y una hora mas a 65°C. Se agregó NaCl a una concentración de 2 M y se incubó 2 minutos con agitación lenta. Esta suspensión se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos. El ADN de la fase acuosa fue mezclado con fenol/cloroformo y precipitado con un volumen igual de isopropanol. El precipitado (ADN) obtenido se secó a temperatura ambiente y fue resuspendido en TE (ANEXO), para después ser incubado a 65°C por 10 minutos. La cuantificación y pureza del ADN se determinó espectrofotométricamente mediante el cociente de absorbancia a 260 y 280 nm. Un valor entre 1.8 – 2.0 indica la no contaminación con proteínas y carbohidratos.

Preparación de ARNm:

La purificación se llevó a cabo por una modificación del método de Chomczynski y Sacchi 1987 [40]. Se sonicaron 5 g de cisticercos en 1 mL de TRIZOL (Life Technologies), se ejecutaron 3 pulsos de 20 segundos en frío. Se adicionaron a la mezcla 0.1 mL de cloroformo y se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Se adicionaron 0.25 mL de isopropanol a la fase acuosa y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la solución a 12000 xg por 10 minutos a 4° C. Se lavaron los precipitados con 0.5 mL de etanol al 75% y se dejó secar el ARN por 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado obtenido (ARN) se resuspendió en 30 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La cuantificación y pureza del ARN se determinó espectrofotométricamente. Los ARNs purificados se incubaron con DNAsa I (1U/mg ARN de Gibco-BRL) por 15 minutos a temperatura ambiente.

Amplificación de la región codificante de la SOD:

El fragmento de ADN que codifica para la SOD, se obtuvo de 2 maneras 1) usando el estuche ONE step RT-PCR (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en 25 µL con 1 µg de ARN y los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2. Como control del RT-PCR se utilizó 2 oligonucleótidos de regiones conservadas del gen de actina que amplifican un fragmento de 732pb. El programa de RT-PCR consistió en un ciclo de 50°C por 25 minutos para la síntesis del ADNc y para el PCR se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C por 15 segundos (Desnaturalización), 50°C por 30 segundos (alineamiento) y 72°C por 60 segundos (extensión) y un ciclo adicional a 72°C de 7 minutos. Los productos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio en

amortiguador de TAE a 100V por 45 minutos. El otro método usado fue 2) la amplificación del fragmento directamente por PCR usando 1 ug de ADN genómico de *T. crassiceps*. La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µL con los oligonucleótidos antes mencionados. Se siguieron las condiciones de PCR utilizadas para el ensayo de RT-PCR.

Clonación y preparación de ADN plasmídico,

Los fragmentos de ADN obtenidos del RT-PCR a partir de ARN total y de la PCR proveniente del ADN genómico, se clonaron directamente en el vector plásmido TOPO-TA. Con el ADN híbrido (vector TOPO-TA y gen para la SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*), se transformaron en frío por 1 h, bacterias *E.coli* TOP10 siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Las bacterias después se cultivaron a 37°C durante toda la noche en una caja petri con medio LB (ANEXO) con ampicilina 50 µg/mL (Medio líquido LB-Amp).

La preparación de ADN plasmídico, se llevó a acabo picando clonas de bacterias de la caja de LB crecidas durante toda la noche en 50mL de LB-Amp. Después de crecer por 16 h el cultivo se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y al precipitado se le adicionaron 5mL de solución 1 (Anexo), el que se resuspendió e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se le adicionaron 10 mL de solución 2 (Anexo), la muestra fue agitada suavemente y se incubó por 10 minutos a 4°C: Se le adicionaron 7.5mL de solución 3 (Anexo), se agitó la muestra y se mantuvo por 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 3000 xg 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo al cual se adicionaron 1.5mL de

isopropanol e incubó en hielo 10 minutos. Se centrifugó nuevamente 10 minutos a 3000 xg a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en TE. Se adicionaron 2 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente la muestra fue sometida a 2 extracciones con fenol-cloroformo-fenol y la fase acuosa fue pasada por una columna de sefarosa CL4B, previamente equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 500 µL, se realizó un gel de agarosa al 1% para determinar las fracciones que contienen el plásmido. Estas fracciones fueron precipitadas a -70°C con acetato de sodio 3M y etanol absoluto. Finalmente, las fracciones con el ADN fueron resuspendidas en 25 µL de TE y su concentración determinada como ya se mencionó anteriormente.

Secuenciación y Análisis:

Para las reacciones de secuencia se empleó como molde el ADN plasmídico (0.5 µg) purificado previamente. La secuencia se llevó a cabo automáticamente y para ello se empleó el estuche Thermo Sequenase cy5.5 Dye Terminator Sequencing. Brevemente, esta reacción se lleva a cabo en un volumen de 12 µL de agua desionizada conteniendo el molde o templado. A este se le agrega 1µL de los cebadores marcados con fluorocromos (2-5 µM) y se agita suavemente la mezcla que se denomina "reacción maestra". Para realizar las reacciones de terminación se necesitan 3 µL de dideoxinucleótidos del estuche que son repartidos en sus respectivos tubos, para después toda la mezcla someterse a un programa de PCR (20 ciclos de 95°C por 30 s; 55°C 30 s; 72°C 1min). Terminado el programa, se agregan 6 µL del amortiguador de cargado con formamida y colorante, se calienta a 72°C por 3 min y se cargan en el gel de secuencia sobre el secuenciador

automático 4X4 de Pharmacia. Los análisis como la traducción de las secuencias obtenidas, los alineamientos e identidad con otras SODs, se realizaron usando los programas informático PC/Gen, CLUSTAL W., y BLAST disponibles en Internet (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Preparación de extracto de *T. crassiceps*

Para obtener el extracto se homogenizaron en un Polytron cisticercos de *T. crassiceps* en una solución de extracción (ANEXO). La suspensión obtenida fue centrifugada a 15000 xg 30 minutos, el sobrenadante colectado se dializó en PBS pH 7.4 por 12 hrs, y volvió a centrifugar a 100,000 xg 30 minutos, este sobrenadante denominado extracto crudo se le determinó concentración de proteínas por el método de Lowry y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Sistema generador del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$):

Para producir el anión superóxido se utilizó la reacción de la xantina oxidasa con la xantina (McCord y Fridovich 1969). Se utilizó el amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.8 a 25°C , así como concentraciones variables de xantina oxidasa (30, 45, 56mU) y de xantina de 0.001 a 0.2mM, para determinar la mayor producción de superóxido. El anión superóxido fue medido por la reducción del citocromo C, el cual se detecta espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550nm (fig. 5). El ensayo enzimático para cada reacción se monitoreó durante 3 min.

Ensayos de actividad de SOD en extractos de *T. crassiceps*. La actividad de la enzima fue determinada por el método de McCord y Fridovich (1969), descrito previamente (fig. 5). La reacción se llevó a cabo en amortiguador de fosfato de potasio 50mM pH 7.8, 0.1mM de xantina, 0.019mM de citocromo C, 56mU de xantina oxidasa y diferentes concentraciones de (50 a 900 μ g) de extracto de *T.crassiceps*. El volumen final de la reacción fue de 1 mL y el tiempo de la medición de la reacción fue de 2 min. Una unidad de SOD fue definida como la cantidad de SOD necesaria para producir la inhibición del 50% de citocromo C. La actividad específica se definió como las unidades de actividad por mg de proteína. Para los ensayos de inhibición se utilizaron las mismas condiciones utilizando inhibidores específicos para la SOD-Cu/Zn (KCN a 0.01mM) y para la SOD-Mn³⁺ (NaN₃ a 10 mM) (42).

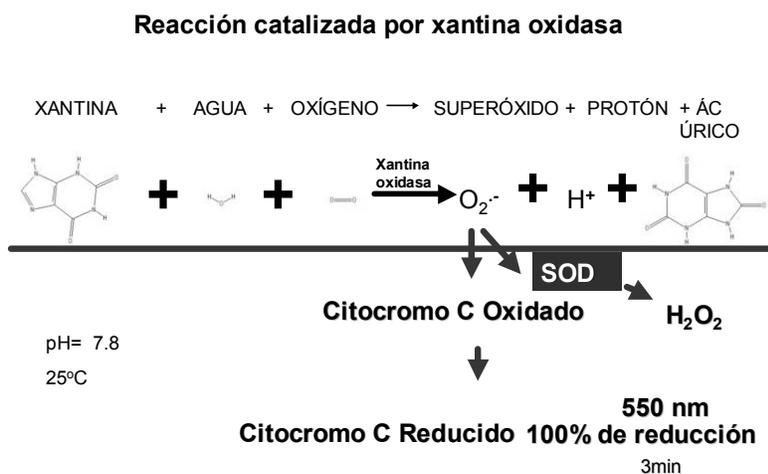


FIGURA 5. Ensayo de actividad SOD por el método de Xantina-Xantina oxidasa. En el caso del citocromo C se representa el 100% de su reducción; Respecto a la SOD se representa la inhibición de la reducción del citocromo C debida a la actividad de SOD de esta enzima.

Ensayos de cultivo de *T. crassiceps* con O_2^- y H_2O_2 :

Los cisticercos se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.1 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (110 μ g/mL) en placas de cultivo de 24 pozos. Se colocaron 20 parásitos por pozo y se cultivaron a 37°C con 5% de CO_2 , y 98% de humedad relativa. Cumplido un precultivo de 24 horas, los parásitos fueron tratados con diferentes concentraciones de superóxido (1.88, 2.85 y 3.77 nmol/min), y H_2O_2 (1 a 5 mM) por 0.5, 1, 6 y 24 horas. Cada experimento se realizó por cuadruplicado. Se utilizaron como controles cisticercos incubados en el medio antes descrito, el medio con Xantina (0.2mM) y otro con el medio y xantina oxidasa (45mU).

Determinación de la viabilidad:

Esta se determinó en placas de ELISA de 96 pozos incubando 10 cisticercos en bilis de cerdo al 30% en medio de cultivo por 2 h a 37°C con 5% de CO_2 , además de la evaginación, se observó la movilidad y la morfología en los parásitos por medio de un microscopio invertido. La evaginación de los cisticercos se determinó por la salida completa del escólex. La movilidad fue determinada mediante la observación de movimientos característicos de la pared del parásito y se clasificó en alta, media, baja o nula, asimismo la integridad de la morfología fue establecida por pérdida del fluido vesicular, daño en la pared y se clasificó en completa, media o nula (ver tablas 2 y 3).

Material biológico:

Escherichia coli cepa TOP10 de la casa Invitrogen. Ratones de la cepa Balb/c facilitados por la Facultad de Medicina y la cepa WFU de *T.crassiceps*.

Reactivos:

Los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 fueron diseñados a partir del principio y final respectivamente de la región codificante del gen para la *T. solium* y sintetizados por la compañía Pharmacia. El estuche para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el estuche ONE step para la transcripción reversa y PCR (RT-PCR) fueron comprados a la casa Invitrogen. Todos los demás reactivos para preparar las soluciones fueron de la mejor calidad posible.

6. RESULTADOS

Modelo *Taenia crassiceps* - ratón:

Con el objetivo de obtener cisticercos de *T. crassiceps* (WFU) para los ensayos *in vitro*, se realizó una cinética de crecimiento de los cisticercos infectando ratones Balb/c como se describe en métodos. La Figura 6 muestra que el crecimiento de los cisticercos en los ratones es exponencial, mostrando una mayor carga parasitaria en los ratones a mayor tiempo de infección. La mayor cantidad de parásitos se obtuvo a los 6 meses de infección, sin embargo en este tiempo aparecieron cisticercos calcificados (0.21%); que aumentaron al 20% en los ratones con más de 6 meses de infección. Además, la mayoría de los cisticercos variaron notablemente en forma, tamaño. Se observó que el mejor tiempo para la obtención de los parásitos utilizados en los experimentos fue el de 5 meses, en donde encontramos cisticercos que denominamos sanos, puesto que tenían un tamaño promedio de 2-3 mm, una morfología ovalada con un escólex invaginado de color blanco y una vesícula transparente llena de líquido claro, así como con una movilidad apreciable por contracción.

Detección de actividad de SODs en extracto de *T. crassiceps*:

La detección de esta actividad se llevó a cabo en un extracto soluble de cisticercos mediante el ensayo de xantina xantina-oxidasa utilizando inhibidores específicos para la SOD-Cu/Zn (KCN a 0.01mM) y para la SOD-Mn³⁺ (NaN₃ a 10 mM). La Figura 7, muestra que el extracto presenta actividad de SOD y esta fue tomada como el 100%. La actividad disminuyó al 10% al usar en el ensayo el KCN, y al 55% cuando se utilizó el NaN₃. Como controles se utilizaron ensayos de xantina xantina oxidasa con y sin inhibidores.

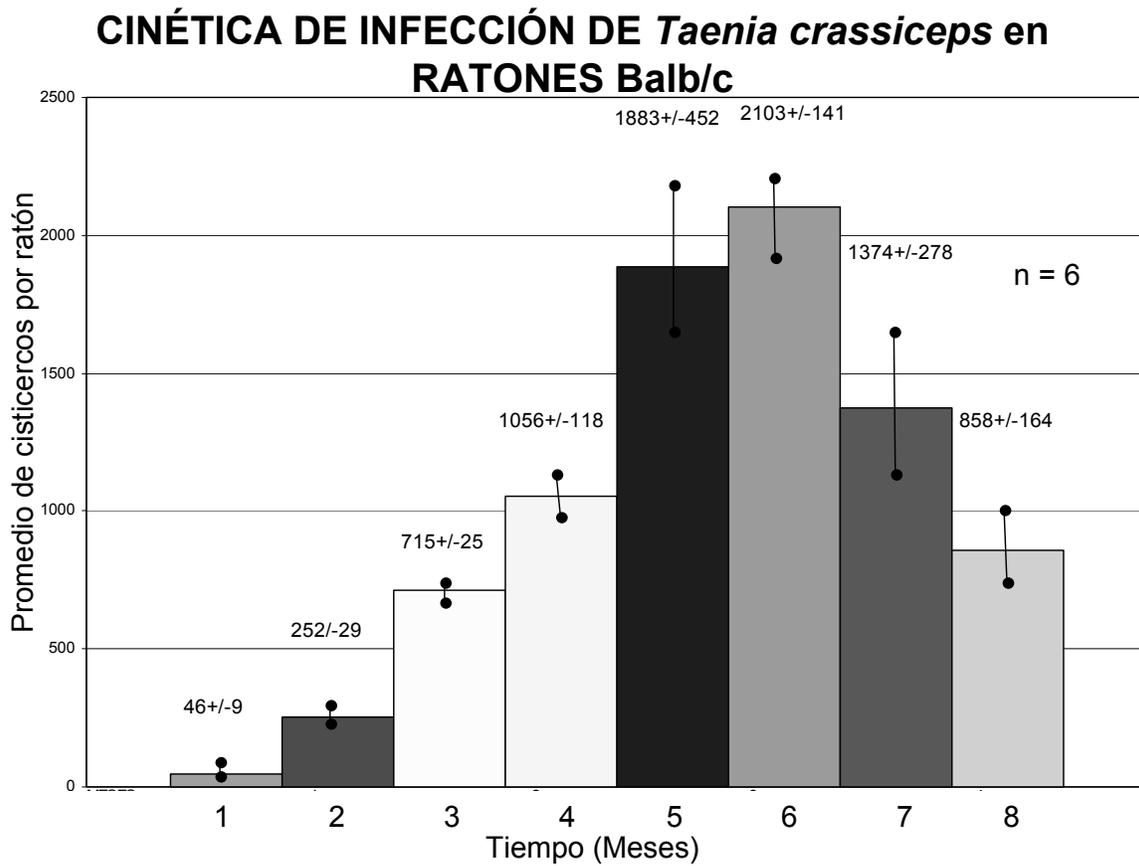


FIGURA 6 Cinética de infección de *T. crassiceps* en ratones Balb/c (6 hembras de 10 semanas de edad por mes); sobre las barras se muestra el promedio de cisticercos por ratón en los diferentes meses de infección. Las barras verticales muestran el error estándar.

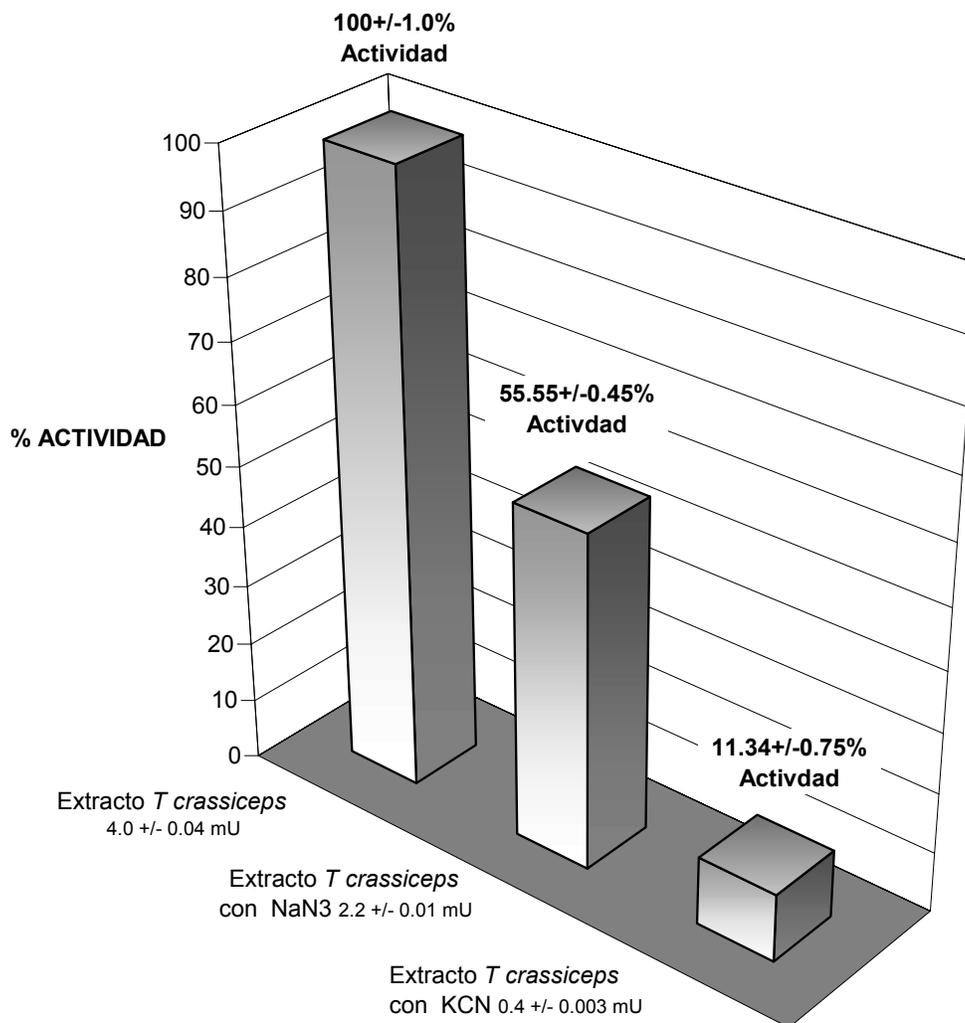


FIGURA 7. Inhibición de la actividad de SOD en extractos de cisticercos de *T. crassiceps*; usando ensayo de xantina-xantina oxidasa. Las barras muestran porcentaje de actividad de la SOD en el extracto sin inhibidores y con inhibidores específicos para la SOD de Mn^{3+} y la de Cu/Zn. Junto a las barras se muestra la actividad y el error estándar.

Caracterización del gen para la SOD Cu/Zn:

El método utilizado para la obtención de ADN genómico nos permitió obtener un ADN puro de *T. crassiceps* con un tamaño aproximado de 23 Kb. Usando este ADN con el método de la PCR y los 2 oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 se amplificó un fragmento de 0.6 kb, asimismo con el método de la RT-PCR y el ARN obtenido y los mismos oligonucleótidos nos produjo un fragmento del mismo tamaño (fig. 8). Ambos fragmentos fueron clonados en el vector TOPO-TA y

secuenciados como se describe en los métodos. La secuencia nucleotídica de ambos fragmentos resultó idéntica con un tamaño real del fragmento de 456 pb. El fragmento principia con un codón de inicio ATG que codifica para una metionina, y finaliza un codón de termino TGA. La traducción de la secuencia de nucleótidos a proteína y sus análisis computacionales indicaron que este fragmento codifica para una SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*, ya que se observan los motivos característicos para esta enzima, tales como los residuos conservados de histidinas para la unión al Cu y Zn y la formación del sitio activo, así como las cisteínas que forman los puentes disulfuro intracadenas (fig. 9). Asimismo, los análisis de comparación y alineamientos de la secuencia de esta de SOD-Cu/Zn con otras secuencias de la misma enzima, mostraron una identidad del 95%, 61% y 50% con la SOD-Cu/Zn de *T. solium*, cerdo y humano, respectivamente. Otro análisis de la secuencia de aminoácidos destaca la existencia de 25 residuos de glicina por cada subunidad, que constituyen casi 1/6 del total de aminoácidos y que se distribuyen uniformemente a lo largo de la secuencia. Esto hace que la hoja β sea una característica prominente de la estructura secundaria de esta enzima. También son característicos los numerosos cambios de dirección del esqueleto peptídico. El contenido de aminoácidos aromáticos se distingue por la presencia de 8 residuos de fenilalanina (F), la ausencia de triptofano (W), 7 residuos de serina (S), así como 2 residuos de tirosina (T). Estos últimos hacen un total de 9 posibles sitios de glicosilación de tipo O (N (X) S/T); además de 2 posibles sitios de glicosilación de tipo N.

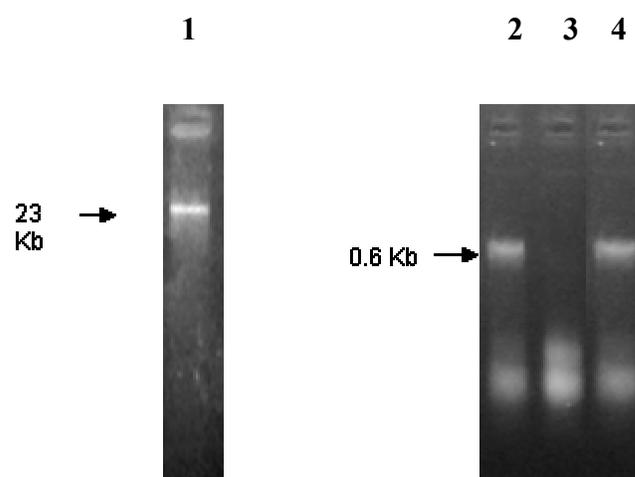


FIGURA 8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2%. En: 1) se observa el ADN genómico purificado de la *T. crassiceps*, 2) el fragmento amplificado por PCR a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2; 3. Control del ensayo de PCR con ADN genómico con solo el oligonucleótido SOZ-X1 y 4) fragmento amplificado a partir del ADNc obtenido de la RT-PCR con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2.

Secuencia codificante para la SOD Cu/Zn de *T. crassiceps* con SOZ-X1 SOZ-X2

1	<u>atg</u>	aag	gct	gtt	tgt	gtt	atg	cga	ggg	gag	gag
	M	K	A	V	C	V	M	R	G	E	E
34	ggc	gtt	aaa	ggg	gtt	gtt	cac	ttc	acc	caa	gct
	G	V	K	G	V	V	H	F	T	Q	A
67	ggc	gac	gct	gtg	aaa	gtg	cat	gct	gaa	ttt	gag
	G	D	A	V	K	V	H	A	E	F	E
100	ggg	ctg	aag	cct	gga	aag	cac	ggc	ttt	cac	gtc
	G	L	K	P	G	K	H	G	F	H	V
133	cac	gaa	ttc	ggt	gac	aca	aca	caa	ggc	tgc	act
	H	E	F	G	D	T	T	Q	G	C	T
166	tcg	gct	ggc	gcc	cac	ttt	aat	ccc	cac	ggc	aaa
	S	A	G	A	H	F	N	P	H	G	K
199	aac	cac	ggt	gct	cct	gat	gct	gct	gag	cga	cat
	N	H	G	A	P	D	A	A	E	R	H
232	gtt	ggg	gac	ctc	ggt	aac	gtt	acg	gct	ggt	gcc
	V	G	D	L	G	N	V	T	A	G	A
265	gat	ggt	aag	gcg	acg	ctt	gac	ctt	acg	gac	aag
	D	G	K	A	T	L	D	L	T	D	K
298	atg	att	tcc	ctc	act	ggc	gaa	cac	tca	gtt	att
	M	I	S	L	T	G	E	H	S	V	I
331	ggg	aga	tcc	ctc	gtg	att	cac	gtg	gat	ccg	gat
	G	R	S	L	V	I	H	V	D	P	D
364	gac	ttg	ggt	ttg	ggc	gga	cac	gag	tta	agc	ttg
	D	L	G	L	G	G	H	E	L	S	L
397	atc	act	ggc	aac	gct	ggg	ggt	cgt	gtt	gcc	tgc
	T	T	G	N	A	G	G	R	V	A	C
430	ggt	att	att	gga	att	gct	aag	agc	gag	tga	
	G	I	I	G	I	A	K	S	E	-	

FIGURA 9. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento de ADN que codifica para la SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*. Sobre la secuencia de aminoácidos se resalta en negritas el codón de inicio (ATG) y el codón de término (TGA), la secuencia de aminoácidos usados para los oligonucleótidos (SOZ-X1 y SOZ-X2) esta subrayada y en cajas los motivos característicos que contienen los aminoácidos que unen al Cu^{2+} y Zn^{2+} y que conforman el sitio activo de la enzima. En cajas punteadas los aminoácidos que forman las laminas β que forman el barrilete que sirve como canal, para conducir al anión al sitio activo; En círculos las histidinas que participan en la unión al Cu^{2+} ; En triángulos las histidinas que participan en la unión al Zn^{2+} ; Con rombos la arginina e histidina que participan en la reacción. Sombreados y junto a el aminoácido correspondiente al que difieren de la secuencia de *T. solium*.

Sistema generador del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$):
 Para determinar la concentración del anión producido por el sistema de xantina xantina oxidasa; Primero se determinaron las velocidades de producción del ión variando las concentraciones de xantina y manteniendo constante la xantina oxidasa para (30, 45 y 56 mU). Las velocidades obtenidas de cada concentración se graficaron cada una y ajustaron con la ecuación de Michaelis–Menten. De esta manera se pudo inferir la producción del ion superóxido (ver Tabla 1). La tabla muestra que la producción del superóxido es dependiente de la cantidad de sustrato y de la enzima usada.

TABLA 1 TABLA DE PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

mU XO	30	45	57
Xantina (mM)	(nmol/min)	(nmol/min)	(nmol/min)
0.000	0.000	0.000	0.000
0.001	0.87±0.05	0.12±0.07	1.16±0.07
0.003	1.78±0.09	1.81±0.01	2.34±0.17
0.005	2.22±0.09	2.08±0.2	2.86±0.18
0.007	2.27±0.08	2.63±0.16	3.69±0.22
0.010	2.36±0.06	2.81±0.16	4.46±0.21
0.0150	2.67±0.09	3.17±0.17	4.43±0.18
0.020	2.86±0.08	3.4±0.18	4.71±0.21
0.030	2.8±0.07	3.49±0.21	5±0.13
0.040	2.77±0.07	3.57±0.61	5.26±0.18
0.060	2.91±0.08	3.63±0.20	5.57±0.14
0.100	2.92±0.07	3.63±0.21	5.74±0.14
0.150	3.11±0.08	3.6±0.18	5.71±0.15
0.200	2.8±0.07	3.77±0.23	5.83±0.14

Incubación de *T. crassiceps* con O_2^- generado enzimáticamente:
Una vez obtenidas las concentraciones del anión producidas por el sistema xantina xantina-oxidasa se procedió a observar el efecto del sustrato (Xantina) y de la xantina oxidasa sobre los cisticercos. Se observó que la concentración más alta de xantina (0.20mM) no afecta la viabilidad del parásito. La xantina oxidasa a 56 mM fue tóxica afectando al 40% de los cisticercos, en contraste la xantina oxidasa a 30 y 45 mU no los afecta. Por lo que se decidió para los cultivos usar las concentraciones de ión superóxido producidas por la mezcla donde se usó la xantina oxidasa a 45 mU y las concentraciones de xantina de 0.004 0.012 y 0.200 mM, que producen el 1.88, 2.85 y 3.77 nmol/min de superóxido, respectivamente. Las concentraciones de superóxido antes mencionadas se utilizaron para los ensayos de cultivo con los cisticercos a los tiempos de 0.5, 1, 9 y 24 h. Ninguna de las concentraciones de ión superóxido ni los tiempos utilizados en los ensayos antes mencionados afectó la viabilidad de los parásitos, puesto que la viabilidad de éstos fue similar a la de los cisticercos controles que no fueron expuestos al superóxido (ver Tabla 2). En éstos se observó una evaginación del 100%, la movilidad característica de los cisticercos no disminuyó al aumentar la concentración ni el tiempo de exposición del oxidante, de igual manera no se observaron daños aparentes a la membrana.

TABLA 2. Efecto del O_2^- producido con xantina oxidasa (45mU) y xantina (0.004 0.012 y 0.200 mM) en cultivos de *T.crassiceps* expuestos a diferentes

TIEMPO (Horas)	CONTROL	XOX 45mU	XANT (0.20mM xantina)	1.88nm/min O_2^- (0.004mM xantina)	2.85nm/min O_2^- (0.012mM xantina)	3.77nm/min O_2^- (0.20mM xantina)
0.5	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	9.5/10 ++++ C	10/10 ++++ C
1	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	9.5/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C
9	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C
24	10/10 ++++ C	8/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C

NUMERO DE CISTICERCOS EVAGINADOS
NUMERO TOTAL DE CISTICERCOS

mU= miliunidades enzimáticas
mM= Milimolar

MOVILIDAD: ++++ ALTA +++ MEDIA ++ MODERADA
 + BAJA - NULA

INTEGRIDAD DE CISTICERCOS: C= COMPLETA M= MEDIA N= NULA

Expresión del gen para la SOD Cu/Zn de *T. crassiceps* con $O_2^{\cdot -}$:
La evaluación de la expresión del gen de la SOD Cu/Zn en cisticercos tratados o no con los agentes oxidantes se realizó por RT-PCR, método que amplifica los mensajeros que producen los genes (fig. 10). El nivel de expresión del gen para la SOD-Cu/Zn en los cisticercos no expuestos y expuestos al superóxido no afectó la cantidad de mensajero producido normalmente por este gen, asimismo el gen de actina utilizado como control de la expresión mantiene una expresión constante, comparado con el control que no se expuso al superóxido.

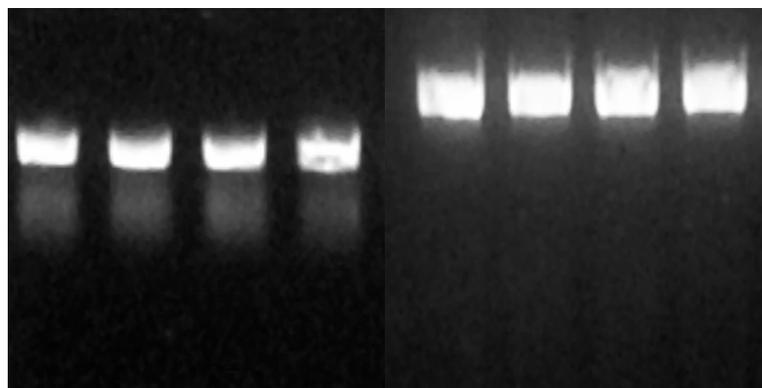


FIGURA 10. Efecto sobre la expresión de los genes de SOD-Cu/Zn y Actina de cisticercos de *T. crassiceps* incubados con diferentes concentraciones de ión superóxido a tiempos de 0.5 h. La amplificación del mensajero para la SOD-Cu/Zn y Actina se llevó a cabo por la RT-PCR con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 y Actina-1 y Actina-2 con ARN de cisticercos: 1 y 1') sin nada (control), 2 y 2') expuesto a xantina (0.20 mM), 3 y 3') expuestos a 1.88 nmol/min y 4 y 4') a 3.77 nmol/min de $O_2^{\cdot -}$. El gel fue de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Incubación de *T. crassiceps* con H_2O_2 :

Para observar el efecto de otro ERO, se uso el H_2O_2 en los cisticercos de *T. crassiceps* se procedió a la incubación del parásito con este oxidante a diferentes concentraciones y un tiempo de 30 minutos (Tabla 3). En contraste al ión superóxido, el H_2O_2 si tuvo efectos dañinos sobre los cisticercos. La disminución de la evaginación, movilidad y daño a la pared de las larvas se dio al aumentar la concentración y tiempo de exposición al H_2O_2 . Mostrando que concentraciones por arriba de 2 mM destruyen totalmente a los parásitos, en contraste, éstos son capaces de resistir hasta concentraciones de 2 mM, sin sufrir daño, puesto que la evaginación, movilidad y su morfología no se ven alteradas. El daño se observó por la afectación de la integridad morfológica de la pared del cisticerco, dónde se observa vacuolización, ruptura y liberación de tejido al medio de cultivo y cisticercos opalescentes.

TABLA 3 Efecto de diferentes concentraciones de H₂O₂ sobre *T.crassiceps* cultivados por 30 minutos.

TIEMPO (Horas)	CONTROL	1.0mM	2.0mM	3.0mM	4.0 mM	5.0 mM
1	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	4/10 + M	0/10 - N	0/10 - N
6	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	0/10 - N	0/10 - N	0/10 - N
24	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	0/10 + N	0/10 - N	0/10 - N

NUMERO DE CISTICERCOS EVAGINADOS
NUMERO TOTAL DE CISTICERCOS

mU=miliunidades enzimáticas
mM=Milimolar

MOVILIDAD: ++++ ALTA +++ MEDIA ++ MODERADA

 + BAJA - NULA

INTEGRIDAD DE CISTICERCOS: C= COMPLETA M= MEDIA N= NULA

Expresión de SOD Cu/Zn de *T. crassiceps* con H₂O₂:

La evaluación de la expresión del gen de la SOD Cu/Zn en cisticercos tratados y no tratados con H₂O₂ se realizó también por la RT-PCR (fig. 11). El nivel de expresión del gen para la SOD-Cu/Zn y del gen para la actina en los cisticercos expuestos a las concentraciones de 0.25 a 2 mM de H₂O₂ no se afectó, puesto que los cisticercos controles no expuestos al oxidante presentan el mismo nivel de expresión de ambos genes. Cabe mencionar que de los cisticercos expuestos a concentraciones mayores a 2 mM, fue imposible amplificar los mensajeros para los genes de SOD-Cu/Zn y de actina por la RT-PCR.

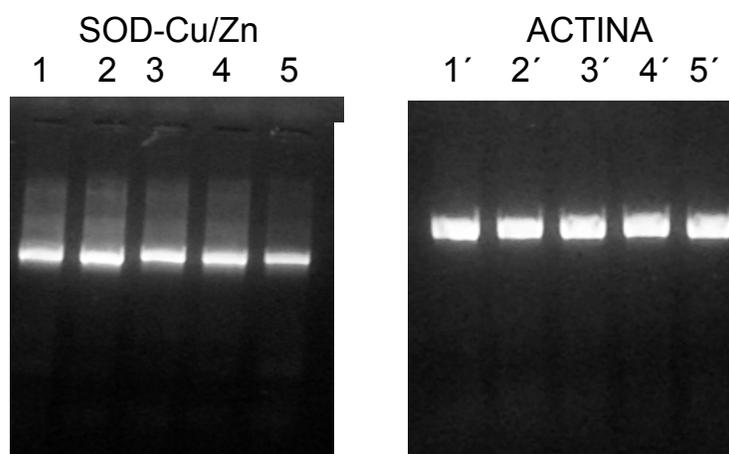


FIGURA 11. Efecto de H₂O₂ sobre la expresión de los genes de SOD-Cu/Zn y Actina de cisticercos de *T. crassiceps*, incubados con diferentes concentraciones de peróxido de H₂O₂ al tiempo de 0.5 h. La amplificación del mensajero para la SOD-Cu/Zn y Actina se llevó a cabo por la RT-PCR con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 y Actina-1 y Actina-2 con ARN de Cisticercos expuestos a 1 y 1') 0 (control), 2 y 2') a 0.25, 3 y 3') a 0.5, 4 y 4') a 1 y 5 y 5') a 2 mM. El gel de agarosa al 2% fue teñido con bromuro de etidio.

7. DISCUSIÓN

El anión superóxido se produce en el parásito durante el proceso metabólico normal, y en el estallido respiratorio por los leucocitos en respuesta a patógenos. El anión superóxido no es dañino *per se*, aunque puede afectar algunas enzimas. Su efecto dañino es debido a que puede reaccionar con otras moléculas como el H_2O_2 y el óxido nítrico para formar otras especies altamente tóxicas como el singulete, hidroxilo ($OH\cdot$), hidroxilo ($HO_2\cdot$), y el peroxinitrilo, que son altamente oxidantes [19].

Los organismos requieren mecanismos que limiten el daño molecular causado por las ERO primarias como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxidrilo ($HO\cdot$) [27]. Para detener este proceso destructivo los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección [28]. Dentro de los sistemas enzimáticos las tres principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y las peroxiredoxinas. Cabe mencionar que la catalasa no existe en helmintos y que estos presentan poca actividad de glutatión peroxidasa.

Taenia solium causa cisticercosis en humanos y cerdos. Éticamente no es posible obtener cisticercos de humanos, pero sí de cerdos infectados cuyos cisticercos son de edad desconocida. Para poder controlar la edad de la infección y de los cisticercos, se estableció un modelo de cisticercosis en ratones Balb/c por *T. crassiceps*. Este modelo nos permitió saber que los cisticercos crecen describiendo una tendencia en forma Gausiana dentro de los ratones, obteniendo el máximo de cisticercos, viables con una morfología típica y movimiento vigoroso en las infecciones menores a 5 meses. Por lo que en los ensayos se utilizaron estos cisticercos.

Se prepararon extractos con cisticercos para medir en ellos la actividad de SOD con y sin inhibidores específicos para la SOD-Cu/Zn y de Mn^{2+} . Estos ensayos mostraron que existe una actividad de 11% de SOD-Cu/Zn, 55% de Mn^{3+} y un 34% probablemente de una SOD no conocida o bien de otra molécula. Este

ensayo nos muestra que puede existir una SOD de Mn^{3+} no descrita en helmintos aún. Una vez detectada la actividad de SOD-Cu/Zn, se aisló y caracterizó la región del gen que codifica para la misma en *T. crassiceps*. Los fragmentos obtenidos del ADNc y ADNg de *T. crassiceps* presentaron el mismo tamaño de 456 nucleótidos, lo que indica que este gen no contiene intrones, además de que su secuencia primaria tiene todas las características de una SOD-Cu/Zn. Asimismo, presentó una homología de 95% con la enzima de *T. solium*, organismo filogenéticamente relacionado y baja homología con la enzima de sus hospederos, lo que la postula como buen blanco farmacológico.

Como es ya conocido el nivel de expresión de muchos genes es regulado por alguna molécula del ambiente. Una alta concentración del transcrito de un gen se correlaciona con una alta exposición del parásito a los metabolitos tóxicos como las ERO. Por ejemplo, se ha demostrado que algunas enzimas antioxidantes son expresadas en gran cantidad en esquistosomas adultos por la presencia de agentes oxidantes. Por otro lado, es conocido que los helmintos son capaces de vivir por largos periodos en sus hospederos ya que producen grandes cantidades de estas enzimas antioxidantes cuando los parásitos envejecen en el huésped [41-44].

Para evaluar el efecto de la variación de la expresión de dos EROs, el ión superóxido y el H_2O_2 sobre el gen que codifica para la SOD-Cu/Zn, se incubaron cisticercos con los oxidantes antes mencionados, utilizando como control el gen de actina, gen que no varía su expresión ante estímulos. El nivel de expresión de la SOD Cu/Zn en cisticercos expuestos a diferentes concentraciones de los oxidantes y tiempos usados, no la afectó y se comportó como el gen control. Esto sugiere que el gen para la SOD-Cu/Zn se expresa constantemente en el tiempo y no es afectado por O_2^- y H_2O_2 .

Por otro lado, los ensayos de exposición a los oxidantes, nos muestran que este parásito es muy resistente a altas concentraciones de superóxido (3.77 nmol/min); *in vivo*, concentraciones mucho más altas que las que producen las células fagocíticas (promedio de $1.03 \text{ nmol}/10^7$ leucocitos por 15 minutos). Asimismo, este ensayo muestra que los cisticercos son muy resistentes al H_2O_2 (2 mM), ya que

otros parásitos mueren a concentraciones menores a 1 mM [45, 46]. Esto podría explicar la resistencia de estos cestodos a la respuesta inmune en infecciones crónicas.

Finalmente, las aportaciones de este trabajo fueron, implementar un modelo de cisticercosis de *T. crassiceps*, desarrollar de un método cuantitativo para la generación del anión superóxido; demostrar que el gen de la SOD-Cu/Zn en *T. crassiceps* no contiene intrones, desarrollar un método para medir la expresión de genes de estos parásitos en condiciones de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán realizar varios estudios que podrán ser aplicados a *Taenia solium*, un cestodo de importancia médica.

8. ANEXO

AMORTIGUADOR DE LISIS

Tris		50mM
EDTA		0.1 mM
Sarcosil		0.5%

Ajustar pH 8.0 y aforar a un litro

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS 10X)

NaCl	137mM	80.0g
KCl	2.7mM	2.0g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.3mM	11.5g

Ajustar a pH7.4 y aforar a un litro.

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS pH 7.8

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

Ajustar a pH7.8 y aforar a un litro.

MEDIO DE CULTIVO LURIA BETANI (LB)

NaCl	5.8g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0g	
Tris-HCl pH 7.5	1M	50.0mL
Gelatina al 2%	5.0mL	

Todos los componentes del medio de cultivo se diluyen y aforan a 1L con agua desionizada. El pH del medio se ajusta a 7.0 y se esteriliza en autoclave durante 20min a 15Lb de presión en ciclo líquido.

TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1mM

Aforar a un litro

MEDIO LB

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Aforar a un litro

PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA AL 1.5 % + BROMURO DE ETIDIO

Para cuatro geles: Disolver 2.4 g de agarosa en 160 mL de TAE 1X, adicionar 36 µL de bromuro de etidio, mezclar bien y verter en los moldes. Dejar solidificando a 4 °C.

SOLUCIÓN 1

Glucosa	50mM
EDTA	10mM
Tris	25Mm
Ajustar pH8.0 y aforar a un litro	

SOLUCIÓN 2

NaOH	0.2mM
SDS	1.0%
Aforar a un litro	

SOLUCIÓN 3

NH ₄ Ac	7.5M
Aforar a un litro	

9. REFERENCIAS

1. Larralde, C., et al., *Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus, and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients.* Am J Trop Med Hyg, 1989. **40**(3): p. 282-90.
2. Larralde, C., et al., *Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia solium.* Arch Pathol Lab Med, 1990. **114**(9): p. 926-8.
3. Sciutto, E., et al., *Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T. solium antigens against experimental murine T. crassiceps cysticercosis.* Parasite Immunol, 1990. **12**(6): p. 687-96.
4. Laclette, J.P., et al., *Crystals of virus-like particles in the metacestodes of Taenia solium and T. crassiceps.* J Invertebr Pathol, 1990. **56**(2): p. 215-21.
5. Dorais, F.J. and G.W. Esch, *Growth rate of two Taenia crassiceps strains.* Exp Parasitol, 1969. **25**(1): p. 395-8.
6. Fox, L.L., R.E. Kuhn, and G.W. Esch, *Taenia crassiceps: antigenic comparison of two larval strains.* Exp Parasitol, 1971. **29**(2): p. 194-6.
7. Romano, M.C., et al., *Steroid hormone production by parasites: the case of Taenia crassiceps and Taenia solium cysticerci.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 221-5.
8. J., W.K.S., *Cestodes. Principles and practice of parasitology.* , ed. J.W.a.S. Ltd. 2001.
9. Barry, M. and L.C. Kaldjian, *Neurocysticercosis.* Semin Neurol, 1993. **13**(2): p. 131-43.
10. Schmidt G.D., R.L.S., *Cestoidea: Form, function, and classification of the tapeworms: Foundations of parasitology.* . 6^a ed, ed. M. Hill. 2000, USA.
11. E., T.J.V., *Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites.* . 1995, San Diego: Academic Press.
12. • Lamothe AR. & García Pl., *Helmintiasis de hombre en México* Edit., AGT editor s.a., México, 1988.
13. D., H., *Free radical theory of aging.* Mutat Res, 1992(275): p. 257-266.
14. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* J Lab Clin Med, 1992. **119**(6): p. 598-620.
15. Cross, A.R. and O.T. Jones, *Enzymic mechanisms of superoxide production.* Biochim Biophys Acta, 1991. **1057**(3): p. 281-98.
16. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease.* Mayo Clin Proc, 1988. **63**(4): p. 390-408.
17. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions.* Mayo Clin Proc, 1988. **63**(4): p. 381-9.
18. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense.* Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
19. Rosen, G.M., et al., *Free radicals and phagocytic cells.* Faseb J, 1995. **9**(2): p. 200-9.
20. Fridovich, I., *Oxygen toxicity: a radical explanation.* J Exp Biol, 1998. **201**(Pt 8): p. 1203-9.

21. Torres, W.H., *Biología de las especies reactivas*. Mensaje bioquímico, 2002. **XXVI**: p. 55.
22. Fridovich, I., *Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18515-7.
23. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
24. Fridovich, I., *Biological effects of the superoxide radical*. Arch Biochem Biophys, 1986. **247**(1): p. 1-11.
25. Yi, M.J., et al., *Heat-shock protein 25 (Hspb1) regulates manganese superoxide dismutase through activation of Nfkb (NF-kappaB)*. Radiat Res, 2002. **158**(5): p. 641-9.
26. Schreck, R. and P.A. Baeuerle, *Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B*. Methods Enzymol, 1994. **234**: p. 151-63.
27. Henkle-Duhrsen, K. and A. Kampkotter, *Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **114**(2): p. 129-42.
28. Callahan, H.L., R.K. Crouch, and E.R. James, *Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?* Parasitol Today, 1988. **4**(8): p. 218-25.
29. Brophy, P.M. and D.I. Pritchard, *Immunity to helminths: Ready to tip the biochemical balance?* Parasitol Today, 1992. **8**(12): p. 419-22.
30. James, E.R., *Superoxide dismutase*. Parasitol Today, 1994. **10**(12): p. 481-4.
31. McGonigle, S., G.P. Curley, and J.P. Dalton, *Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite Fasciola hepatica*. Parasitology, 1997. **115** (Pt 1): p. 101-4.
32. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
33. Crapo, J.D., et al., *Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10405-9.
34. Sanchez-Moreno, M., et al., *Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by a series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis*. Arzneimittelforschung, 1989. **39**(7): p. 759-61.
35. Gonzalez, R., G. Mendoza-Hernandez, and A. Plancarte, *Purification of Taenia solium cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification*. Parasitol Res, 2002. **88**(10): p. 881-7.
36. Tang, L., et al., *Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from Brugia lymphatic filarial nematode parasites*. Infect Immun, 1994. **62**(3): p. 961-7.
37. Liddell, S. and D.P. Knox, *Extracellular and cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutases from Haemonchus contortus*. Parasitology, 1998. **116** (Pt 4): p. 383-94.
38. Lattemann, C.T., et al., *Immunogenicity of the extracellular copper/zinc superoxide dismutase of the filarial parasite Acanthocheilonema viteae delivered by a two-phase vaccine strain of Salmonella typhimurium*. Parasite Immunol, 1999. **21**(4): p. 219-24.
39. Castellanos-Gonzalez, A., L. Jimenez, and A. Landa, *Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from Taenia solium*. Int J Parasitol, 2002. **32**(9): p. 1175-82.

-
40. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 41. Nare, B., J.M. Smith, and R.K. Prichard, *Schistosoma mansoni: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development*. Exp Parasitol, 1990. **70**(4): p. 389-97.
 42. Mei, H. and P.T. LoVerde, *Schistosoma mansoni: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes*. Exp Parasitol, 1997. **86**(1): p. 69-78.
 43. Morel, Y. and R. Barouki, *Repression of gene expression by oxidative stress*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 481-96.
 44. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
 45. Callahan, H.L., R.K. Crouch, and E.R. James, *Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for Onchocerca cervicalis microfilariae*. Parasitology, 1990. **100 Pt 3**: p. 407-15.
 46. Freudenstein-Dan, A., D. Gold, and Z. Fishelson, *Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing*. J Parasitol, 2003. **89**(6): p. 1129-35.

*I can see clearly now, the rain is gone,
I can see all obstacles in my way
Gone are the dark clouds that had me blind
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright , bright
Sun-Shiny day*

*Oh yes I can make it now, the pain is gone
All of the bad feelings have disappeared
Here is the rainbow I've been prayin' for
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day*

*Look all around, there's nothin' but blue skies
Look straight ahead, nothin' but blue skies*

*I can see clearly now, the rain is gone,
I can see all obstacles in my way
Here is the rainbow I've been prayin' for
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright , bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day*

Bob Marley

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir

Albert Einstein

CONTENIDO	
ÍNDICE	
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUCCIÓN	11
1.1 GENERALIDADES DE <i>Taenia crassiceps</i>	11
ONCOSFERA Y HUEVO	12
LARVA O CISTICERCO	12
ADULTO	13
1.2 ESTRÉS OXIDATIVO	16
ANIÓN SUPEROXIDO	16
PEROXIDO DE HIDRÓGENO	17
SISTEMAS ANTIOXIDANTES	17
SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	18
SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	18
SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN HELMINTOS	19
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENRAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 .MATERIALES Y MÉTODOS	21
MODELO <i>Taenia crassiceps</i> - RATÓN	21
PREPARACION DE ADNg DE <i>T.crassiceps</i>	21
PREPARACIÓN DE ARNm	22
AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA SOD	22
CLONACIÓN Y PREPARACIÓNDE ADN PLASMIDICO	23
SECUENCIACIÓN Y ANALISIS	24
PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE <i>T.crassiceps</i>	25
SISTEMA GENERADOR DEL RADICAL SUPERÓXIDO (O ₂ ^{·-})	25
DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE SOD EN EXTRACTOS DE <i>T.crassiceps</i>	26
ENSAYOS DE CULTIVO DE <i>T.crassiceps</i> con O ₂ ^{·-} y H ₂ O ₂	27
DETERINACIÓN DE LA VIABILIDAD	27

6. RESULTADOS	29
MÓDELO <i>T. crassiceps</i> - RATÓN	29
DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SOD EN EXTRACTO DE <i>T. crassiceps</i>	29
CARACTERIZACIÓN DEL GEN PARA LA SOD-Cu/Zn	31
SISTEMA GENRADOR DEL IÓN SUPERÓXIDO	35
INCUBACIÓN DE <i>T. crassiceps</i> CON O ₂ ⁻ GENRADO ENZIMÁTICAMENTE	36
EXPRESIÓN DEL GEN PARA LA SOD-Cu/Zn DE <i>T. crassiceps</i> CON O ₂ ⁻	38
INCUBACIÓN DE <i>T. crassiceps</i> CON H ₂ O ₂	39
EXPRESIÓN DEL GEN PARA LA SOD-Cu/Zn DE <i>T. crassiceps</i> CON H ₂ O ₂	41
7. DISCUSIÓN	42
8. ANEXO	45
9. REFERENCIAS	47

RESUMEN

La cisticercosis en el ratón es inducida por inoculación del cestodo (*Taenia crassiceps*) en su estadio larvario o de cisticerco, en el peritoneo. Se ha especulado que la permanencia y resistencia de los cestodos en sus hospederos se debe a la cantidad de enzimas desintoxicantes de especies reactivas que poseen. Los cisticercos están expuestos a una variedad de especies reactivas producidas por sus procesos metabólicos, así como por las células de la respuesta inmune en la defensa de su hospedero, como por ejemplo, el estallido respiratorio; proceso en el que los leucocitos en respuesta a patógenos liberan anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y otros xenobióticos. La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima desintoxicante que cataliza la dismutación del anión superóxido al agua oxigenada y al oxígeno. Hasta la fecha en los helmintos sólo se ha descrito la SOD-Cu/Zn en sus formas, citosólica y de secreción.

Este trabajo se realizó con el fin de estudiar los mecanismos que *T. crassiceps*, posee para responder al estrés oxidativo de su hospedero. Para ello se clonó la región del gen que codifica para la SOD de Cu/Zn de *T. crassiceps*. El análisis de esta región mostró que codifica para la enzima SOD-Cu/Zn citosólica, con una secuencia primaria que tiene una identidad del 95%, 50% y 61% con las enzimas de *T. solium*, humano y cerdo. Los cisticercos de *T. crassiceps* cultivados a diferentes tiempos y concentraciones del ión superóxido, no son afectados en su viabilidad. Por otro lado, concentraciones menores a 2 mM de H_2O_2 tampoco afectan la viabilidad de los cisticercos. En contraste concentraciones mayores a 2 mM de H_2O_2 son tóxicas y afectan la viabilidad y desarrollo del parásito. Finalmente, ensayos de transcripción reversa y PCR usando el ARN de cisticercos expuestos a diferentes concentraciones de los oxidantes antes mencionados mostraron que el gen para la SOD-Cu/Zn no es inducible por éstos.

ABSTRACT

Mouse cysticercosis is produced by inoculation of cysticerci of *Taenia crassiceps* in the peritoneal cavity. It has been speculated that the permanence and resistance of the cestodes in their host is due to the amount of antioxidant enzymes that possess. Cysticerci are exposed to a great variety of reactive species produced by host immune response and its own metabolic processes. The respiratory bursts produced by the leukocytes liberate superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical. In parasite superoxide dismutase (SOD) is the enzyme which catalyses the dismutation of superoxide anion to produce oxygen and hydrogen peroxide.

The aim of this work was to study *in vitro* the expression of the SOD Cu/Zn gene in *Taenia crassiceps* under oxidative stress conditions. To achieve this, coding SOD Cu/Zn region of *T. crassiceps* was cloned and sequenced. The analysis of the amino acid sequence showed that it had an identity of 95% with the cytosolic SOD-Cu/Zn of *Taenia solium*, and 50% and 61% with human and pig, respectively. To determine the expression of SOD Cu/Zn gene, the cysticerci were incubated at different times and concentrations of oxidants ($O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2) and the total RNA isolated. Primers flanking the SOD Cu/Zn coding region sequence and the reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to measure SOD Cu/Zn mRNA. These treatments neither induce any increase in expression levels of SOD gene. The $O_2^{\cdot-}$ has no effect on the viability of the parasite, while H_2O_2 had a toxic effect at concentrations above 2 mM. Noteworthy, the concentrations used of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 did not affect the expression of the SOD Cu/Zn gene.

1. INTRODUCCIÓN:

GENERALIDADES DEL PARÁSITO

Taenia crassiceps

PHYLUM:	<i>Platyhelminthes</i>
CLASE:	<i>Cestoidea</i>
SUBCLASE:	<i>Cestoda</i>
ORDEN:	<i>Cyclophylidea</i>
FAMILIA:	<i>Taenidae</i>
GENRO:	<i>Taenia</i>
ESPECIE:	<i>crassiceps</i>

El estadio de gusano adulto de la *Taenia crassiceps* se aloja en el intestino de los zorros rojos (hospedero definitivo) de Europa y Norteamérica. Un hospedero útil que se utiliza e infecta en el laboratorio es el roedor; en este la forma larvaria o cisticerco se inocula en la cavidad peritoneal. Debido a la propiedad de formar nuevos individuos por gemación se han logrado adaptar en laboratorios varias cepas de este cestodo a crecer en ratones sin pasar por el estadio adulto; un ejemplo es la cepa WFU que crece en ratones Balb/c. La reproducción experimental en la cavidad peritoneal de ratones permite obtener grandes cantidades de cisticercos. Por ello se le utiliza como un modelo para el estudio de la cisticercosis causada por *Taenia solium*; además las propiedades bioquímicas, inmunológicas así como las características morfológicas y fisiológicas de este parásito son semejantes a *T. solium* [1-4]. Existen al menos otras 2 cepas de este parásito, una denominada Hyg similar a la WFU ambas con escólex y una denominada ORF carente de éste [5, 6]. Estudios sobre estas cepas de *T. crassiceps*, en especial la ORF, han indicado que el balance hormonal y género del hospedero murino son de gran importancia para la velocidad de reproducción, ya que en ratones hembras se reproducen mejor [7]. El ciclo de vida de *T. crassiceps* en los cestodos comprende tres estadios: huevo, larva y adulto (fig. 1).

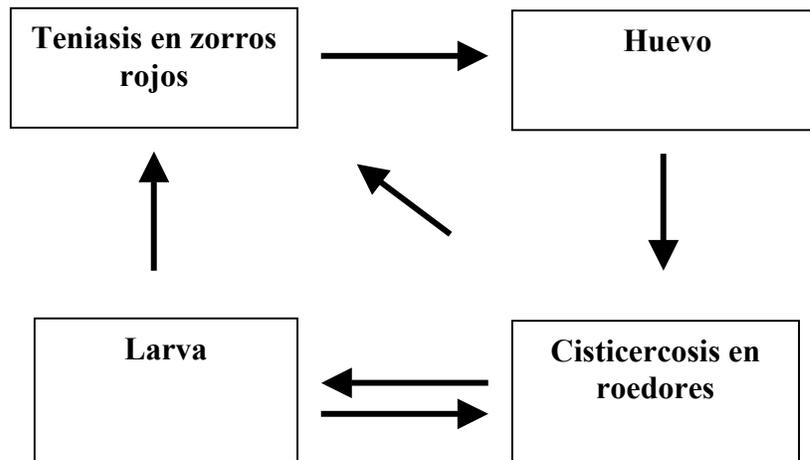


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. Las infecciones se dan de manera natural en animales silvestres. En el laboratorio, los cisticercos pueden ser mantenidos en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c a través de infecciones continuas. Adaptado de Romano, *et al.* 2003.

ONCÓSFERA Y HUEVO

Los huevos se componen de una cubierta protectora o embrióforo formada por bloques de queratina que son unidos por una proteína cementante. Generalmente su coloración es blanquecina o ligeramente amarillenta aunque varía de acuerdo con los pigmentos que absorben en el intestino de los hospederos. El embrióforo recubre a la oncósfera o embrión hexacanto, nombrada así ya que presenta 3 pares de ganchos, esta tiene forma esférica con un tamaño de 30 - 40 μm . [8].

LARVA O CISTICERCO

La morfología de la forma larvaria de este cestodo, es una vesícula de 0.5 a 1.5 cm de diámetro, con un escólex invaginado, de donde se desarrolla el verme adulto que posee cuatro ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos que son en número de 22 a 28. Este se observa como una esfera blanca opaca rodeada de líquido, cubierto por la pared vesicular (fig. 2). Microscópicamente se pueden observar hacia el exterior microvellosidades cubiertas por una membrana plasmática que lo protegen del contacto directo con el tejido del hospedero. La pared vesicular contiene varios tipos de células dispersa en un tejido conectivo que colinda con el fluido vesicular. Este fluido constituye más del 90% del contenido de la larva [9].

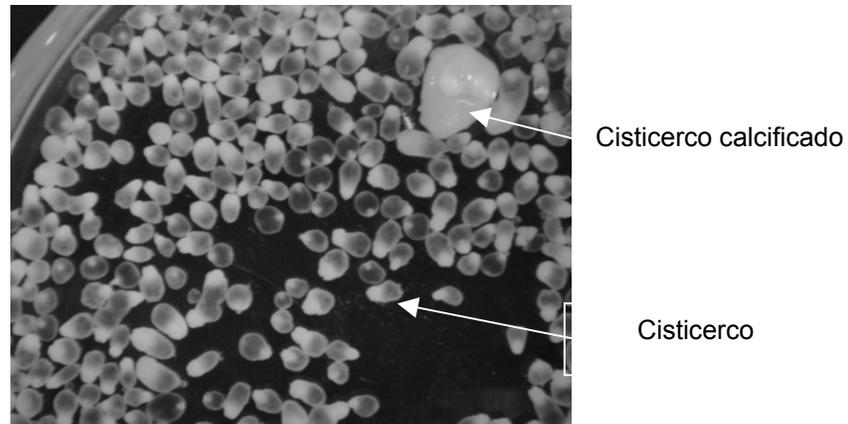


FIGURA 2. Cisticercos de *Taenia crassiceps*. Los puntos blancos opacos son el escólex.

ADULTO

El estadio adulto presenta un cuerpo alargado, adaptado a la forma tubular del intestino delgado de su hospedero intermediario vertebrado; el zorro. Este estadio morfológicamente presenta un cuerpo con simetría bilateral, compuesto por proglótidos alargados y aplanados dorsoventralmente. El parásito adulto puede dividirse en 3 regiones: **El escólex:** órgano de fijación a la mucosa intestinal, redondeado con acetábulos redondos u ovales (ventosas), además de un roseto armado de 22 a 32 ganchos que miden entre 0.110 y 0.180 mm de largo; como se observa en la (fig. 3). **El cuello:** que es la región de tejido indiferenciado situado inmediatamente abajo del escólex; Esta zona no es segmentada y produce por septación transversal los proglótidos, que componen el estróbil; de ahí que la infección persista mientras el escólex y el cuello permanezcan unidos a la pared del intestino del hospedero.

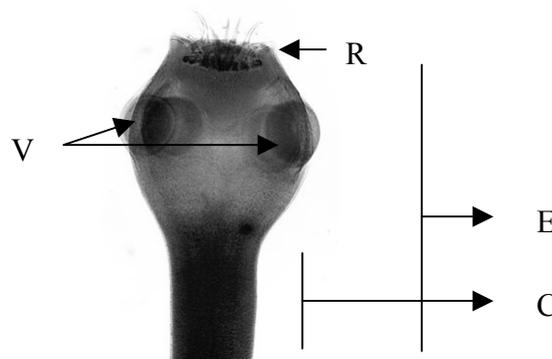


FIGURA 3. Escólex (E) de *Taenia crassiceps*. Se observa a simple vista un par de ventosas (V) y el roseto (R). (C) Cuello zona de crecimiento, donde se produce el estróbil.

El estróbilo: Está formado por un número variable de segmentos llamados proglótidos, que aumentan su grado de madurez a medida que se alejan del cuello. En el extremo proximal se encuentran los proglótidos inmaduros, en los que apenas se distinguen las estructuras celulares que originan los genitales masculinos y femeninos que alberga cada segmento, ya que este organismo es hermafrodita; a continuación se encuentran los proglótidos maduros, de forma cuadrangular, en los que se observan los órganos reproductores completamente desarrollados conteniendo entre 150 y 200 testículos. En la porción final del estróbilo se localizan los proglótidos grávidos de forma rectangular, ocupados casi en su totalidad por el útero que presenta entre siete y trece ramas uterinas, con los órganos sexuales atrofiados y llenos de huevos [8].

Los cestodos carecen de sistema digestivo, pero en su lugar, poseen una superficie externa o tegumento de gran importancia fisiológica, con actividad metabólica, por la que a través de ella absorbe y excreta selectivamente, por difusión o por transporte activo las sustancias que requieren para su deshecho, defensa y nutrición. La glucosa es el nutriente más importante, ya que esta es la fuente de energía primaria en los cestodos. También los aminoácidos, purinas, pirimidinas y nucleósidos son absorbidos por esta superficie, y utilizados para sintetizar sus propias vitaminas y ácidos nucleicos [10]. Este tegumento (fig. 4), es el tejido más externo del parásito; compuesto por la membrana tegumental y un sincicio anucleado cubierto de extensiones citoplásmicas, mitocondrias y vacuolas de tamaños variables [11]. El elemento más externo del tegumento es un glicocálix sobre la membrana tegumentaria, una cubierta con moléculas que inactivan algunas enzimas del hospedero y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos.

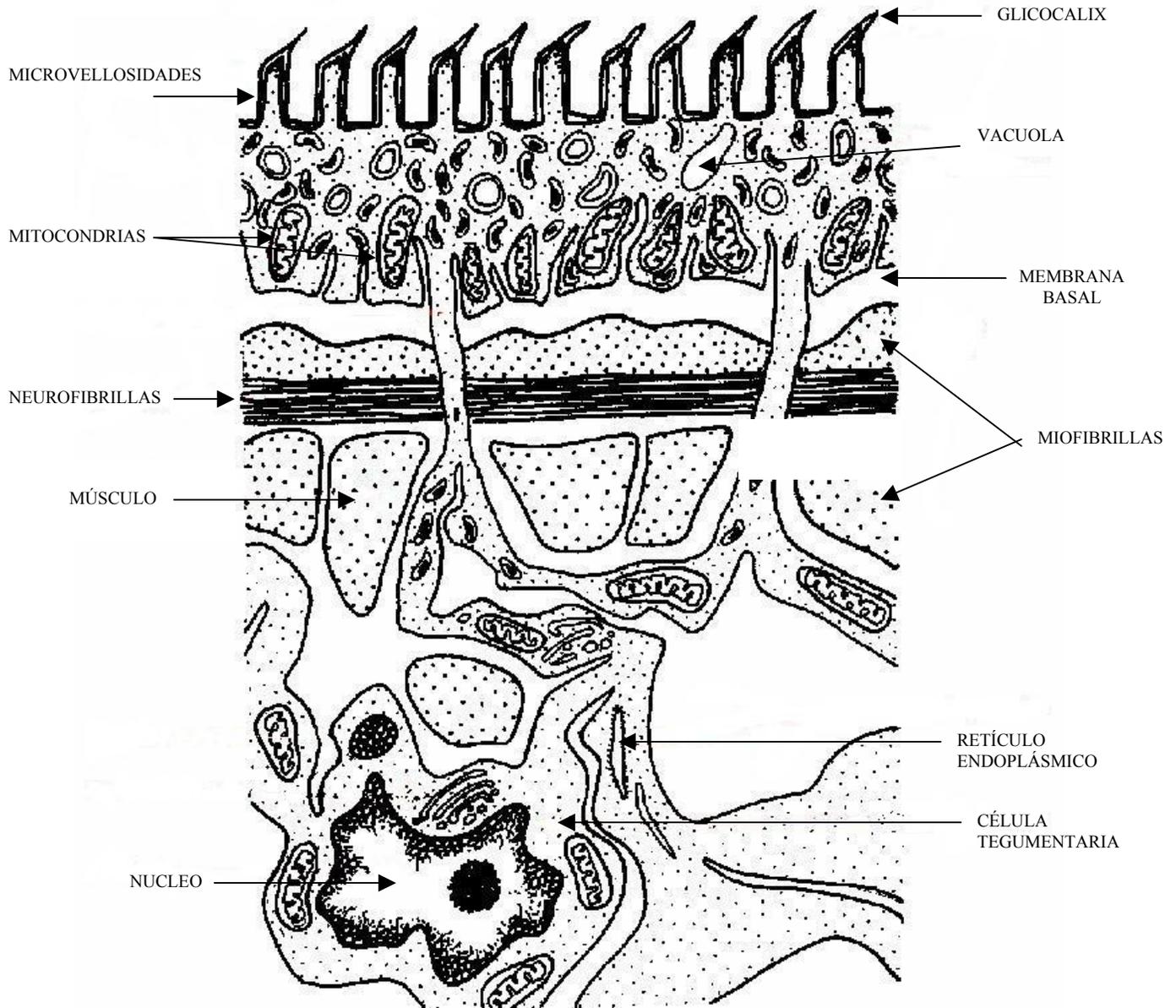


FIGURA 4. Esquema de la pared vesicular de un cestodo (Adaptado de BIODIDAC, University of Ottawa)

El parénquima, es delimitado por una membrana basal (colágena tipo IV) que tiene la función de sostén. Este también es considerado como centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno, es un tejido en el que se encuentran los sistemas de excreción, sistema nervioso, así como los paquetes de fibras musculares. El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios cerebroides en el escólex unidos mediante comisuras transversas. De estos ganglios salen cuatro cordones nerviosos amielínicos, dos anteriores que inervan el escólex y dos posteriores que corren a lo largo del estróbilo, inervándolo totalmente y conectándose por medio de comisuras transversas interproglotideas. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones

laterales. Algunos de los neuropéptidos de importancia en la transmisión de estímulos son la serotonina y la acetilcolina.

La osmorregulación y la excreción dependen de un sistema protonefridial, con 2 pares de canales excretores laterales y conexiones transversas. El aparato excretor, está formado por células flamígeras, dispuestas en grupos de cuatro en el extremo libre de los túbulos. En el estadio adulto, estos últimos son prolongaciones capilares de los canales excretores que contienen moléculas solubles (urea, amoniaco) por lo general, son cuatro, dos dorsolaterales y dos ventrolaterales; los cuatro corren paralelamente a lo largo del estróbilo uniéndose a nivel del escólex. Los ventrales se conectan entre sí en el extremo posterior de cada segmento, por medio de un tubo transverso [12]. El sistema reproductor, es hermafrodita; los órganos reproductivos femeninos y masculinos están presentes en cada proglótido.

ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico proporcionado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes [13]. Los ER son especies químicas que son capaces de extraer electrones de las moléculas vecinas para completar su orbital; convirtiéndose en componentes altamente reactivos y en las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos [14]. Por ejemplo, el ión hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se generan por la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria, como productos de reacciones metabólicas normales en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico, membrana plasmática, los peroxisomas [15] y por macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del hospedero [16, 17]. Estas especies causan daño a toda clase de moléculas biológicas conduciendo a la oxidación, despolimerización de polisacáridos, modificaciones de ADN ruptura de cadenas, daño a la membrana, lípidos, proteínas, carbohidratos, además de estar involucrados en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, daño a la membrana, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, fragmentación y daño a carbohidratos [18].

ANIÓN SUPERÓXIDO

La reducción univalente del oxígeno, genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucra cuatro electrones, produciendo tres compuestos denominados (ERO), estos son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). El anión superóxido se produce en el organismo durante el proceso metabólico normal, radiación ionizante; y en respuesta a patógenos por los leucocitos en el estallido respiratorio. El anión superóxido no es extremadamente dañino por sí sólo, pero puede interactuar con el óxido nítrico y conducir a la formación de otras especies altamente oxidantes como los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), hidroxilo ($\text{HO}_2\cdot$), y el peroxinitrilo ($\text{ONOO}\cdot$) [19].

El anión O_2^- es más selectivo en su reactividad y es potencialmente más dañino de esta forma; debido a que puede difundir una distancia considerable antes de que se encuentre con un posiblemente blanco. El anión O_2^- es la base conjugada del radical oxidante hidroperoxilo (HO_2^\cdot). El O_2^- es inestable en solventes protonados como el agua, a pH neutro es suficientemente estable para oxidar compuestos como fenoles, tioles, ascorbato, catecolaminas, leucoflavinas, tetrahidropterinas, sulfito, con hierro libre o unido a algunas proteínas, por ejemplo los centros [Fe-S] y otros ERO como el propio O_2^- , el óxido nítrico y los radicales fenoxi [20]. Además este anión inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa o afecta la reducción del NAD^+ y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de aminoácidos ramificados, la deshidratasa del dihidroxiácido, la reductasa del ribonucleótido que genera los difosfato de desoxiribonucleótidos para la síntesis del ADN y una fosfatasa de la proteína la calcineurina, importante en la transducción de señales [21].

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es la forma menos reactiva de las ERO. Su importancia recae en el hecho de que participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de ERO. Además, atraviesa con suma facilidad las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción. Se puede originar a partir de diversas fuentes: Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones ($O_2 + 2 e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + H_2O$) [22]. Por dismutación del superóxido [23] o como producto de algunas reacciones por las enzimas (glucosa oxidasa, uricasa.) [24], así como por reacciones químicas de autooxidación. Por otro lado, el H_2O_2 está implicado en la señalización y regulación de genes como los de la superóxido dismutasa Mn^{3+} [25], interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos, a través de NF κ B y AP-1 [26].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Todos los organismos aerobios requieren mecanismos que limiten el daño molecular causado por las ERO como O_2^- , H_2O_2 , y el ión hidroxidriilo (HO^\cdot) que son incrementadas por exposición a la radiación, ciclización redox de xenobióticos o fagocitos estimulados del hospedero [27].

Las ERO formadas en el organismo pueden iniciar una serie de reacciones en cadena, que continúan hasta que éstos son eliminados tras diversas reacciones con otras ERO o por la acción de algún sistema antioxidante, el cual protege a los tejidos de los efectos que ellos producen. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. Unos previenen la formación de nuevos ERO, convirtiéndolos en moléculas menos

perjudiciales antes de que puedan reaccionar y formar nuevos ERO a partir de otras moléculas. Para detener este proceso destructivo los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección al daño producido por las moléculas oxidantes[28]. Esta protección contra el daño oxidativo puede ser por prevención, intercepción y reparación.

La prevención de la formación de ERO es la primera línea de defensa contra ellos. Esto incluye a proteínas como la ferritina, transferrina y la ceruloplasmina que se unen a iones metálicos (cobre y hierro) con el fin de secuestrarlos e impedir su oxidación o bien por utilización de pigmentos como la melanina que protegen de la radiación, impidiendo se generen nuevos ERO. La intercepción de los ERO, es el proceso de desactivación de los mismos, lo podemos dividir en dos clases enzimáticos y no enzimáticos. Los no enzimáticos los cuales a su vez podemos subdividir en dos subclases: a) Sustancias eliminadoras o secuestradoras que son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales, un ejemplo de esto son el α -tocoferol ácido ascórbico, carotenos y glutatión y b) sustancias proteicas como la lactoferrina, la ceruloplasmina y la transferrina; y los sistemas enzimáticos, por ejemplo las tres principales enzimas antioxidantes, la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. El último mecanismo de protección es la reparación del daño producido por los ERO sobre las moléculas como el ADN, lípidos, proteínas y otros compuestos. Estos sistemas enzimáticos están relacionados con la reparación de ADN lipolíticos y proteolíticos capaces de restituir las funciones perdidas por las moléculas [18].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Este sistema consiste en la formación de compuestos no radicales. Estos antioxidantes capturan a los ERO impidiendo reacciones en cadena, o la formación de ERO secundarios por medio de la unión a compuestos de alto peso molecular; algunos solubles en agua como el ácido ascórbico tioles, urato y piruvato, así como algunos lípidos solubles como la vitamina E y el β -caroteno [29].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Los sistemas enzimáticos están conformados por una serie de enzimas antioxidantes esenciales en los parásitos [27, 30]. Las principales familias de enzimas antioxidantes en organismos eucariontes son las catalasas (CATs), las Glutatión peroxidases (GPXs) las peroxiredoxinas (PRXs). Las tres presentan actividad catalítica para descomponer H_2O_2 para y producen agua y oxígeno molecular. También las GPXs, las PRXs y las Glutatión S-transferasas pueden reducir hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos dando como producto final agua. Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del ion superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular y son la primera línea de defensa que tienen los organismos

[31]. El descubrimiento de estos sistemas enzimáticos representa un avance para el entendimiento de cómo los parásitos se defienden del estrés oxidativo interno y externo.

SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN HELMINTOS

La superóxido dismutasa (SOD) esta ampliamente distribuida en los organismos y existe en una variedad de formas que se clasifican, según el cofactor metálico que utiliza (Cu/Zn, de Mn y Fe), todas catalizan la misma reacción antes mencionada. Existen tres tipos de SODs en organismos eucariontes la de Cu/Zn (citosólica y otra extracelular), la de SOD de Mn³⁺ mitocondrial, y una de Fe identificada en protozoarios, algas y organismos fotosintéticos. Cada una de ellas es codificada por un gen diferente y difieren en su estructura y localización en la célula [32]. La SOD citoplásmica de Cu/Zn se encuentra ampliamente distribuida en el citosol y en el núcleo, pero está ausente en la mitocondria y compartimentos secretorios [33]. La SOD extracelular se encuentra fuera de las células en el plasma linfa y líquido cefalorraquídeo, mientras la SOD de Mn³⁺ está localizada en la matriz de la mitocondria [33]. La SOD de Cu/Zn citosólica es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas de 16 kDa, cada una contiene un átomo de cobre y uno de zinc, la SOD extracelular de Cu/Zn es una glicoproteína tetramérica compuesta de cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de 30 KDa. La SOD citoplásmica y la extracelular tienen un 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos y poseen los residuos conservados requeridos para la actividad y unión a los metales, como los residuos de histidina, y el aspartato envuelto en la unión al zinc, dos cisteínas envueltas en el puente disulfuro y la arginina en la entrada del sitio activo. En esta enzima solo los átomos de cobre participan en la ciclización oxido-reducción durante la dismutación de O₂⁻. Los átomos de zinc no están involucrados en el ciclo redox pero mantienen la configuración del sitio activo y facilitan la oxidación.

La SOD de Mn³⁺ o mitocondrial es una proteína tetramérica que es codificada en el núcleo, sintetizada como un precursor con un péptido señal que le ayuda a ser transportada hacia la mitocondria, donde pierde este péptido. La proteína precursora presenta un peso molecular de 25 KDa y la proteína madura dentro de la mitocondria un peso molecular de 22 KDa.

La SOD de Fe³⁺ es un tetrámero y se encuentra principalmente en organismos fotosintéticos ubicada en citoplasma, cloroplasto de algunas plantas, tiene un peso molecular de 22 KDa [20]. Cabe mencionar que las SOD de Mn³⁺ y la de Fe no han sido descrita en helmintos.

La SOD-Cu/Zn está presente en extractos de trematodos, nematodos y cestodos, incluido *T. solium* [34, 35]. Asimismo, se han realizado caracterizaciones moleculares amplias de los genes que codifican a estas 2 formas de SOD-Cu/Zn y se han producido y caracterizado varias enzimas recombinantes [30, 36-39].

2. HIPÓTESIS

La exposición del parásito a EROs ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) modificará la expresión del gen que la codifica.

3. OBJETIVO GENRAL

Estudiar la variación en la expresión de la SOD-Cu/Zn exponiendo cisticercos de *Taenia crassiceps* a ion superóxido y peróxido de hidrógeno.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Obtención de cisticercos a partir de ratones infectados con *Taenia crassiceps*.
- 2.- Clonación y caracterización del gen para la SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*.
- 3.- Evaluación del efecto del ión superóxido y peróxido de hidrógeno en cisticercos *in vitro*.
- 4.- Determinar la expresión del gen para SOD-Cu/Zn en cisticercos cultivados en presencia de ión superóxido y peróxido de hidrógeno.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo *Taenia crassiceps* - Ratón:

Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos de infecciones previas de ratones hembras Balb/c de 10 semanas con la cepa WFU. Para la infección se utilizó una aguja de calibre 16; y cisticercos de 2-3 mm que fueron inyectados el peritoneo del ratón. Los ratones fueron mantenidos en condiciones normales con alimento y agua *ad libitum.*, posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical a diferentes tiempos de infección. Los cisticercos fueron removidos de la cavidad peritoneal con PBS estéril mediante lavados y utilizados en posteriores infecciones para mantener la cepa, así como para obtener cisticercos para los experimentos.

Preparación de ADN genómico de *T. crassiceps*:

Cisticercos (5 g) de *T. crassiceps* congelados se resuspendieron con 10 volúmenes de amortiguador de lisis (ANEXO) conteniendo 20 µg/mL de ARNasa tipo II, la suspensión se incubó 1h a 37°C. Terminado este tiempo se adicionó proteinasa K a una concentración de 20 µg/mL y se incubó en agitación por 3 horas a 55°C, y una hora mas a 65°C. Se agregó NaCl a una concentración de 2 M y se incubó 2 minutos con agitación lenta. Esta suspensión se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos. El ADN de la fase acuosa fue mezclado con fenol/cloroformo y precipitado con un volumen igual de isopropanol. El precipitado (ADN) obtenido se secó a temperatura ambiente y fue resuspendido en TE (ANEXO), para después ser incubado a 65°C por 10 minutos. La cuantificación y pureza del ADN se determinó espectrofotométricamente mediante el cociente de absorbancia a 260 y 280 nm. Un valor entre 1.8 – 2.0 indica la no contaminación con proteínas y carbohidratos.

Preparación de ARNm:

La purificación se llevó a cabo por una modificación del método de Chomczynski y Sacchi 1987 [40]. Se sonicaron 5 g de cisticercos en 1 mL de TRIZOL (Life Technologies), se ejecutaron 3 pulsos de 20 segundos en frío. Se adicionaron a la mezcla 0.1 mL de cloroformo y se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Se adicionaron 0.25 mL de isopropanol a la fase acuosa y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la solución a 12000 xg por 10 minutos a 4° C. Se lavaron los precipitados con 0.5 mL de etanol al 75% y se dejó secar el ARN por 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado obtenido (ARN) se resuspendió en 30 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La cuantificación y pureza del ARN se determinó espectrofotométricamente. Los ARNs purificados se incubaron con DNAsa I (1U/mg ARN de Gibco-BRL) por 15 minutos a temperatura ambiente.

Amplificación de la región codificante de la SOD:

El fragmento de ADN que codifica para la SOD, se obtuvo de 2 maneras 1) usando el estuche ONE step RT-PCR (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en 25 µL con 1 µg de ARN y los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2. Como control del RT-PCR se utilizó 2 oligonucleótidos de regiones conservadas del gen de actina que amplifican un fragmento de 732pb. El programa de RT-PCR consistió en un ciclo de 50°C por 25 minutos para la síntesis del ADNc y para el PCR se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C por 15 segundos (Desnaturalización), 50°C por 30 segundos (alineamiento) y 72°C por 60 segundos (extensión) y un ciclo adicional a 72°C de 7 minutos. Los productos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio en

amortiguador de TAE a 100V por 45 minutos. El otro método usado fue 2) la amplificación del fragmento directamente por PCR usando 1 ug de ADN genómico de *T. crassiceps*. La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µL con los oligonucleótidos antes mencionados. Se siguieron las condiciones de PCR utilizadas para el ensayo de RT-PCR.

Clonación y preparación de ADN plasmídico,
Los fragmentos de ADN obtenidos del RT-PCR a partir de ARN total y de la PCR proveniente del ADN genómico, se clonaron directamente en el vector plásmido TOPO-TA. Con el ADN híbrido (vector TOPO-TA y gen para la SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*), se transformaron en frío por 1 h, bacterias *E.coli* TOP10 siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Las bacterias después se cultivaron a 37°C durante toda la noche en una caja petri con medio LB (ANEXO) con ampicilina 50 µg/mL (Medio líquido LB-Amp).

La preparación de ADN plasmídico, se llevó a acabo picando clonas de bacterias de la caja de LB crecidas durante toda la noche en 50mL de LB-Amp. Después de crecer por 16 h el cultivo se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y al precipitado se le adicionaron 5mL de solución 1 (Anexo), el que se resuspendió e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se le adicionaron 10 mL de solución 2 (Anexo), la muestra fue agitada suavemente y se incubó por 10 minutos a 4°C: Se le adicionaron 7.5mL de solución 3 (Anexo), se agitó la muestra y se mantuvo por 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 3000 xg 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo al cual se adicionaron 1.5mL de

isopropanol e incubó en hielo 10 minutos. Se centrifugó nuevamente 10 minutos a 3000 xg a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en TE. Se adicionaron 2 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente la muestra fue sometida a 2 extracciones con fenol-cloroformo-fenol y la fase acuosa fue pasada por una columna de sefarosa CL4B, previamente equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 500 µL, se realizó un gel de agarosa al 1% para determinar las fracciones que contienen el plásmido. Estas fracciones fueron precipitadas a -70°C con acetato de sodio 3M y etanol absoluto. Finalmente, las fracciones con el ADN fueron resuspendidas en 25 µL de TE y su concentración determinada como ya se mencionó anteriormente.

Secuenciación y Análisis:

Para las reacciones de secuencia se empleó como molde el ADN plasmídico (0.5 µg) purificado previamente. La secuencia se llevó a cabo automáticamente y para ello se empleó el estuche Thermo Sequenase cy5.5 Dye Terminator Sequencing. Brevemente, esta reacción se lleva a cabo en un volumen de 12 µL de agua desionizada conteniendo el molde o templado. A este se le agrega 1µL de los cebadores marcados con fluorocromos (2-5 µM) y se agita suavemente la mezcla que se denomina “reacción maestra”. Para realizar las reacciones de terminación se necesitan 3 µL de dideoxinucleótidos del estuche que son repartidos en sus respectivos tubos, para después toda la mezcla someterse a un programa de PCR (20 ciclos de 95°C por 30 s; 55°C 30 s; 72°C 1min). Terminado el programa, se agregan 6 µL del amortiguador de cargado con formamida y colorante, se calienta a 72°C por 3 min y se cargan en el gel de secuencia sobre el secuenciador

automático 4X4 de Pharmacia. Los análisis como la traducción de las secuencias obtenidas, los alineamientos e identidad con otras SODs, se realizaron usando los programas informático PC/Gen, CLUSTAL W., y BLAST disponibles en Internet (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Preparación de extracto de *T. crassiceps*

Para obtener el extracto se homogenizaron en un Polytron cisticercos de *T. crassiceps* en una solución de extracción (ANEXO). La suspensión obtenida fue centrifugada a 15000 xg 30 minutos, el sobrenadante colectado se dializó en PBS pH 7.4 por 12 hrs, y volvió a centrifugar a 100,000 xg 30 minutos, este sobrenadante denominado extracto crudo se le determinó concentración de proteínas por el método de Lowry y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Sistema generador del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$):

Para producir el anión superóxido se utilizó la reacción de la xantina oxidasa con la xantina (McCord y Fridovich 1969). Se utilizó el amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.8 a 25°C , así como concentraciones variables de xantina oxidasa (30, 45, 56mU) y de xantina de 0.001 a 0.2mM, para determinar la mayor producción de superóxido. El anión superóxido fue medido por la reducción del citocromo C, el cual se detecta espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550nm (fig. 5). El ensayo enzimático para cada reacción se monitoreó durante 3 min.

Ensayos de actividad de SOD en extractos de *T. crassiceps*. La actividad de la enzima fue determinada por el método de McCord y Fridovich (1969), descrito previamente (fig. 5). La reacción se llevó a cabo en amortiguador de fosfato de potasio 50mM pH 7.8, 0.1mM de xantina, 0.019mM de citocromo C, 56mU de xantina oxidasa y diferentes concentraciones de (50 a 900 μ g) de extracto de *T.crassiceps*. El volumen final de la reacción fue de 1 mL y el tiempo de la medición de la reacción fue de 2 min. Una unidad de SOD fue definida como la cantidad de SOD necesaria para producir la inhibición del 50% de citocromo C. La actividad específica se definió como las unidades de actividad por mg de proteína. Para los ensayos de inhibición se utilizaron las mismas condiciones utilizando inhibidores específicos para la SOD-Cu/Zn (KCN a 0.01mM) y para la SOD-Mn³⁺ (NaN₃ a 10 mM) (42).

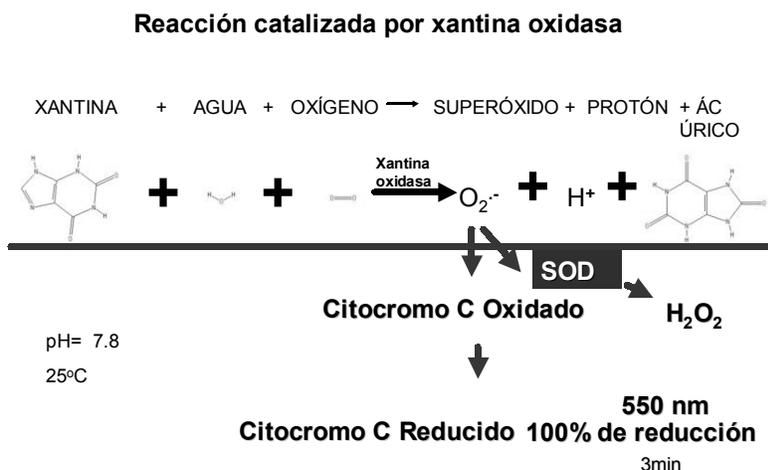


FIGURA 5. Ensayo de actividad SOD por el método de Xantina-Xantina oxidasa. En el caso del citocromo C se representa el 100% de su reducción; Respecto a la SOD se representa la inhibición de la reducción del citocromo C debida a la actividad de SOD de esta enzima.

Ensayos de cultivo de *T. crassiceps* con O_2^- y H_2O_2 :

Los cisticercos se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.1 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (110 μ g/mL) en placas de cultivo de 24 pozos. Se colocaron 20 parásitos por pozo y se cultivaron a 37°C con 5% de CO_2 , y 98% de humedad relativa. Cumplido un precultivo de 24 horas, los parásitos fueron tratados con diferentes concentraciones de superóxido (1.88, 2.85 y 3.77 nmol/min), y H_2O_2 (1 a 5 mM) por 0.5, 1, 6 y 24 horas. Cada experimento se realizó por cuadruplicado. Se utilizaron como controles cisticercos incubados en el medio antes descrito, el medio con Xantina (0.2mM) y otro con el medio y xantina oxidasa (45mU).

Determinación de la viabilidad:

Esta se determinó en placas de ELISA de 96 pozos incubando 10 cisticercos en bilis de cerdo al 30% en medio de cultivo por 2 h a 37°C con 5% de CO_2 , además de la evaginación, se observó la movilidad y la morfología en los parásitos por medio de un microscopio invertido. La evaginación de los cisticercos se determinó por la salida completa del escólex. La movilidad fue determinada mediante la observación de movimientos característicos de la pared del parásito y se clasificó en alta, media, baja o nula, asimismo la integridad de la morfología fue establecida por pérdida del fluido vesicular, daño en la pared y se clasificó en completa, media o nula (ver tablas 2 y 3).

Material biológico:

Escherichia coli cepa TOP10 de la casa Invitrogen. Ratones de la cepa Balb/c facilitados por la Facultad de Medicina y la cepa WFU de *T.crassiceps*.

Reactivos:

Los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 fueron diseñados a partir del principio y final respectivamente de la región codificante del gen para la *T. solium* y sintetizados por la compañía Pharmacia. El estuche para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el estuche ONE step para la transcripción reversa y PCR (RT-PCR) fueron comprados a la casa Invitrogen. Todas los demás reactivos para preparar las soluciones fueron de la mejor calidad posible.

6. RESULTADOS

Modelo *Taenia crassiceps* - ratón:

Con el objetivo de obtener cisticercos de *T. crassiceps* (WFU) para los ensayos *in vitro*, se realizó una cinética de crecimiento de los cisticercos infectando ratones Balb/c como se describe en métodos. La Figura 6 muestra que el crecimiento de los cisticercos en los ratones es exponencial, mostrando una mayor carga parasitaria en los ratones a mayor tiempo de infección. La mayor cantidad de parásitos se obtuvo a los 6 meses de infección, sin embargo en este tiempo aparecieron cisticercos calcificados (0.21%); que aumentaron al 20% en los ratones con más de 6 meses de infección. Además, la mayoría de los cisticercos variaron notablemente en forma, tamaño. Se observó que el mejor tiempo para la obtención de los parásitos utilizados en los experimentos fue el de 5 meses, en donde encontramos cisticercos que denominamos sanos, puesto que tenían un tamaño promedio de 2-3 mm, una morfología ovalada con un escólex invaginado de color blanco y una vesícula transparente llena de líquido claro, así como con una movilidad apreciable por contracción.

Detección de actividad de SODs en extracto de *T. crassiceps*:

La detección de esta actividad se llevó a cabo en un extracto soluble de cisticercos mediante el ensayo de xantina xantina-oxidasa utilizando inhibidores específicos para la SOD-Cu/Zn (KCN a 0.01mM) y para la SOD-Mn³⁺ (NaN₃ a 10 mM). La Figura 7, muestra que el extracto presenta actividad de SOD y esta fue tomada como el 100%. La actividad disminuyó al 10% al usar en el ensayo el KCN, y al 55% cuando se utilizó el NaN₃. Como controles se utilizaron ensayos de xantina xantina oxidasa con y sin inhibidores.

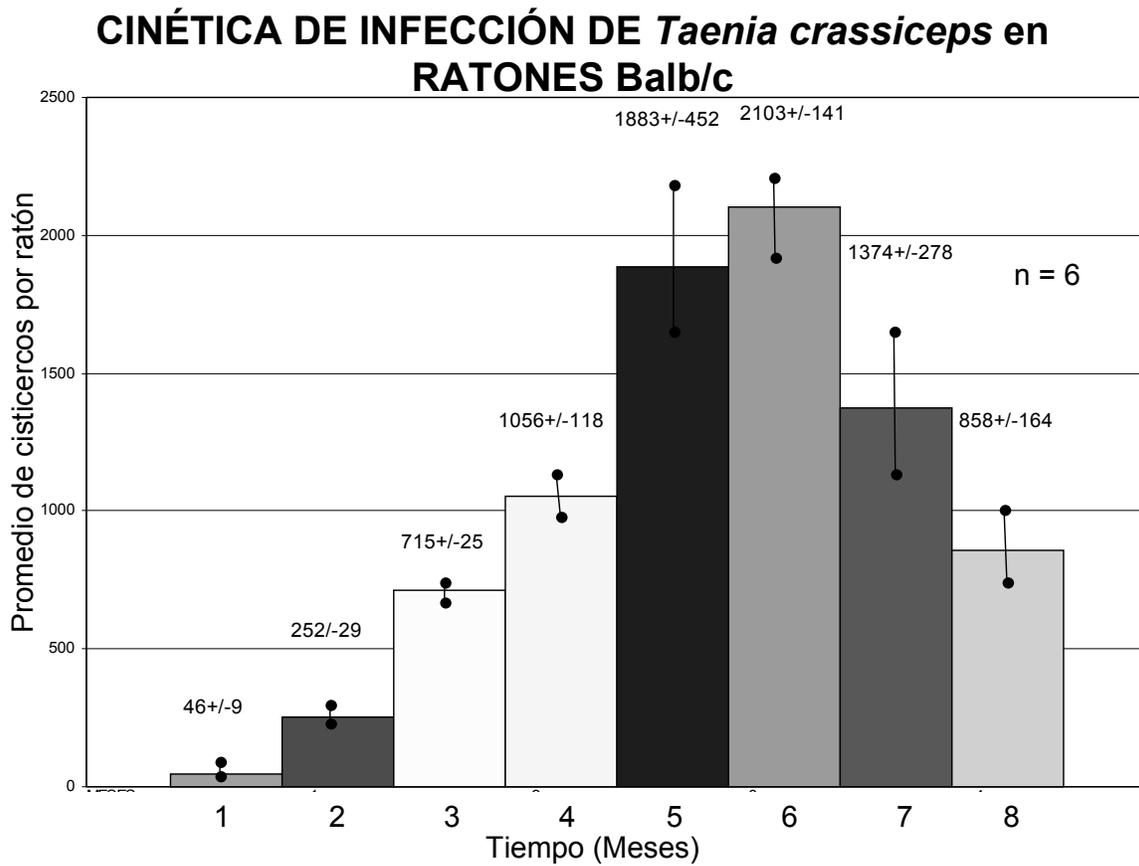


FIGURA 6 Cinética de infección de *T. crassiceps* en ratones Balb/c (6 hembras de 10 semanas de edad por mes); sobre las barras se muestra el promedio de cisticercos por ratón en los diferentes meses de infección. Las barras verticales muestran el error estándar.

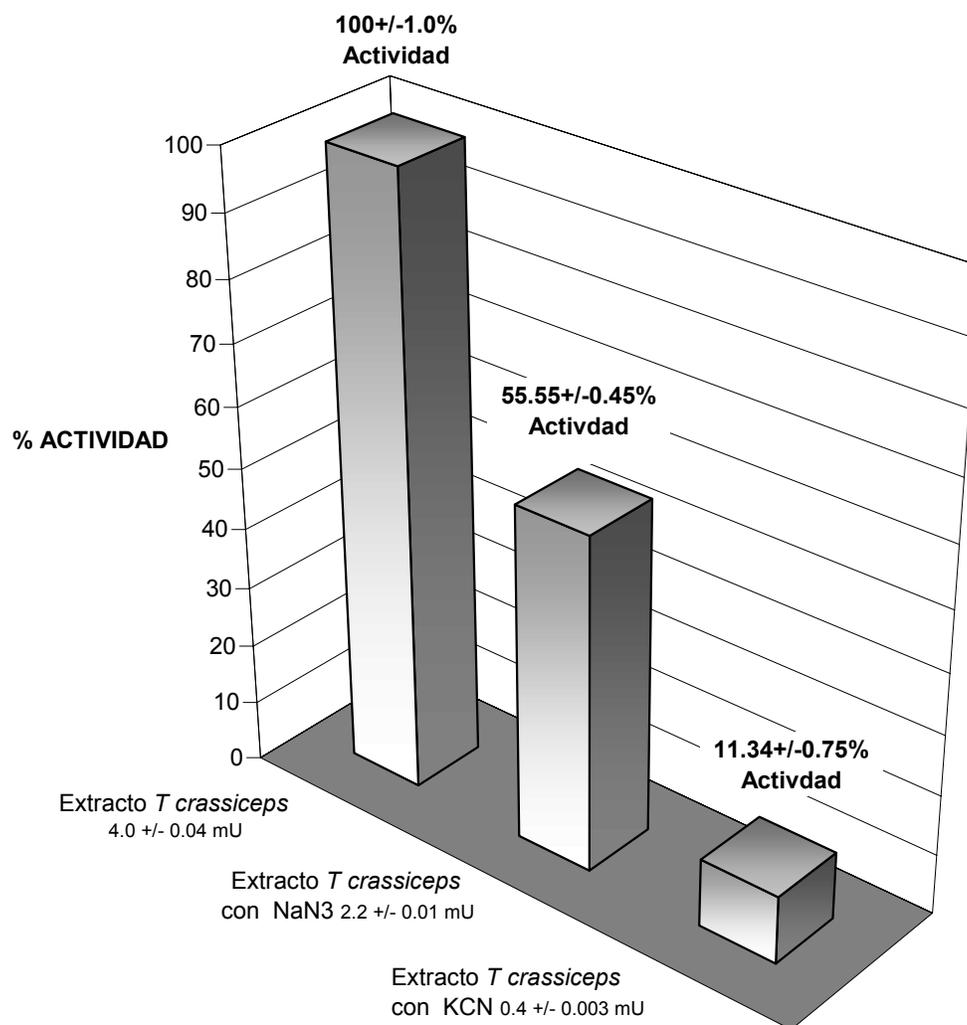


FIGURA 7. Inhibición de la actividad de SOD en extractos de cisticercos de *T. crassiceps*; usando ensayo de xantina-xantina oxidasa. Las barras muestran porcentaje de actividad de la SOD en el extracto sin inhibidores y con inhibidores específicos para la SOD de Mn³⁺ y la de Cu/Zn. Junto a las barras se muestra la actividad y el error estándar.

Caracterización del gen para la SOD Cu/Zn:

El método utilizado para la obtención de ADN genómico nos permitió obtener un ADN puro de *T. crassiceps* con un tamaño aproximado de 23 Kb. Usando este ADN con el método de la PCR y los 2 oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 se amplificó un fragmento de 0.6 kb, asimismo con el método de la RT-PCR y el ARN obtenido y los mismos oligonucleótidos nos produjo un fragmento del mismo tamaño (fig. 8). Ambos fragmentos fueron clonados en el vector TOPO-TA y

secuenciados como se describe en los métodos. La secuencia nucleotídica de ambos fragmentos resultó idéntica con un tamaño real del fragmento de 456 pb. El fragmento principia con un codón de inicio ATG que codifica para una metionina, y finaliza un codón de termino TGA. La traducción de la secuencia de nucleótidos a proteína y sus análisis computacionales indicaron que este fragmento codifica para una SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*, ya que se observan los motivos característicos para esta enzima, tales como los residuos conservados de histidinas para la unión al Cu y Zn y la formación del sitio activo, así como las cisteínas que forman los puentes disulfuro intracadenas (fig. 9). Asimismo, los análisis de comparación y alineamientos de la secuencia de esta de SOD-Cu/Zn con otras secuencias de la misma enzima, mostraron una identidad del 95%, 61% y 50% con la SOD-Cu/Zn de *T. solium*, cerdo y humano, respectivamente. Otro análisis de la secuencia de aminoácidos destaca la existencia de 25 residuos de glicina por cada subunidad, que constituyen casi 1/6 del total de aminoácidos y que se distribuyen uniformemente a lo largo de la secuencia. Esto hace que la hoja β sea una característica prominente de la estructura secundaria de esta enzima. También son característicos los numerosos cambios de dirección del esqueleto peptídico. El contenido de aminoácidos aromáticos se distingue por la presencia de 8 residuos de fenilalanina (F), la ausencia de triptofano (W), 7 residuos de serina (S), así como 2 residuos de tirosina (T). Estos últimos hacen un total de 9 posibles sitios de glicosilación de tipo O (N (X) S/T); además de 2 posibles sitios de glicosilación de tipo N.

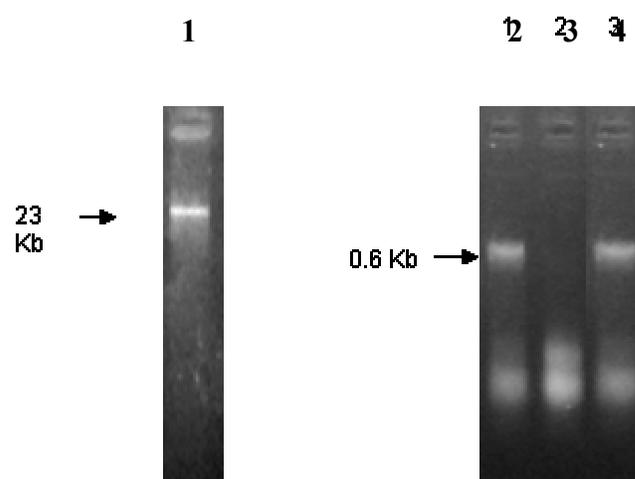


FIGURA 8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2%. En: 1) se observa el ADN genómico purificado de la *T. crassiceps*, 2) el fragmento amplificado por PCR a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2; 3. Control del ensayo de PCR con ADN genómico con solo el oligonucleótido SOZ-X1 y 4) fragmento amplificado a partir del ADNc obtenido de la RT-PCR con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2.

Secuencia codificante para la SOD Cu/Zn de *T. crassiceps* con SOZ-X1 SOZ-X2

1	<u>atg</u>	aag	gct	gtt	tgt	gtt	atg	cga	ggg	gag	gag
	M	K	A	V	C	V	M	R	G	E	E
34	ggc	gtt	aaa	ggg	gtt	gtt	cac	ttc	acc	caa	gct
	G	V	K	G	V	V	H	F	T	Q	A
67	ggc	gac	gct	gtg	aaa	gtg	cat	gct	gaa	ttt	gag
	G	D	A	V	K	V	H	A	E	F	E
100	ggg	ctg	aag	cct	gga	aag	cac	ggc	ttt	cac	gtc
	G	L	K	P	G	K	H	G	F	H	V
133	cac	gaa	ttc	ggt	gac	aca	aca	caa	ggc	tgc	act
	H	E	F	G	D	T	T	Q	G	C	T
166	tcg	gct	ggc	gcc	cac	ttt	aat	ccc	cac	ggc	aaa
	S	A	G	A	H	F	N	P	H	G	K_R
199	aac	cac	ggt	gct	cct	gat	gct	gct	gag	cga	cat
	N	H	G	A_L	P	D	A	A	E	R	H
232	gtt	ggg	gac	ctc	ggt	aac	gtt	acg	gct	ggt	gcc
	V	G	D	L_F	G	N	V	T	A	G	A
265	gat	ggt	aag	gcg	acg	ctt	gac	ctt	acg	gac	aag
	D	G	K	A	T	L	D	L	T	D	K
298	atg	att	tcc	ctc	act	ggc	gaa	cac	tca	gtt	att
	M	I	S	L	T	G	E	H	S	V	I
331	ggg	aga	tcc	ctc	gtg	att	cac	gtg	gat	ccg	gat
	G	R	S	L	V	I	H	V	D	P	D
364	gac	ttg	ggt	ttg	ggc	gga	cac	gag	tta	agc	ttg
	D	L	G	L	G	G	H	E	L	S	L
397	atc	act	ggc	aac	gct	ggg	ggt	cgt	gtt	gcc	tgc
	T	T	G	N	A	G	G	R	V	A	C
430	ggt	att	att	gga	att	gct	aag	agc	gag	tga	
	G	I	I	G	I	A	K	S	E	-	

FIGURA 9. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento de ADN que codifica para la SOD-Cu/Zn de *T. crassiceps*. Sobre la secuencia de aminoácidos se resalta en negritas el codón de inicio (ATG) y el codón de término (TGA), la secuencia de aminoácidos usados para los oligonucleótidos (SOZ-X1 y SOZ-X2) esta subrayada y en cajas los motivos característicos que contienen los aminoácidos que unen al Cu^{2+} y Zn^{2+} y que conforman el sitio activo de la enzima. En cajas punteadas los aminoácidos que forman las laminas β que forman el barrilete que sirve como canal, para conducir al anión al sitio activo; En círculos las histidinas que participan en la unión al Cu^{2+} ; En triángulos las histidinas que participan en la unión al Zn^{2+} ; Con rombos la arginina e histidina que participan en la reacción. Sombreados y junto a el aminoácido correspondiente al que difieren de la secuencia de *T. solium*.

Sistema generador del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$):
 Para determinar la concentración del anión producido por el sistema de xantina xantina oxidasa; Primero se determinaron las velocidades de producción del ión variando las concentraciones de xantina y manteniendo constante la xantina oxidasa para (30, 45 y 56 mU). Las velocidades obtenidas de cada concentración se graficaron cada una y ajustaron con la ecuación de Michaelis–Menten. De esta manera se pudo inferir la producción del ion superóxido (ver Tabla 1). La tabla muestra que la producción del superóxido es dependiente de la cantidad de sustrato y de la enzima usada.

TABLA 1 TABLA DE PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

mU XO	30	45	57
Xantina (mM)	(nmol/min)	(nmol/min)	(nmol/min)
0.000	0.000	0.000	0.000
0.001	0.87±0.05	0.12±0.07	1.16±0.07
0.003	1.78±0.09	1.81±0.01	2.34±0.17
0.005	2.22±0.09	2.08±0.2	2.86±0.18
0.007	2.27±0.08	2.63±0.16	3.69±0.22
0.010	2.36±0.06	2.81±0.16	4.46±0.21
0.0150	2.67±0.09	3.17±0.17	4.43±0.18
0.020	2.86±0.08	3.4±0.18	4.71±0.21
0.030	2.8±0.07	3.49±0.21	5±0.13
0.040	2.77±0.07	3.57±0.61	5.26±0.18
0.060	2.91±0.08	3.63±0.20	5.57±0.14
0.100	2.92±0.07	3.63±0.21	5.74±0.14
0.150	3.11±0.08	3.6±0.18	5.71±0.15
0.200	2.8±0.07	3.77±0.23	5.83±0.14

Incubación de *T. crassiceps* con $O_2^{\cdot -}$ generado enzimáticamente:

Una vez obtenidas las concentraciones del anión producidas por el sistema xantina xantina-oxidasa se procedió a observar el efecto del sustrato (Xantina) y de la xantina oxidasa sobre los cisticercos. Se observó que la concentración más alta de xantina (0.20mM) no afecta la viabilidad del parásito. La xantina oxidasa a 56 mM fue tóxica afectando al 40% de los cisticercos, en contraste la xantina oxidasa a 30 y 45 mU no los afecta. Por lo que se decidió para los cultivos usar las concentraciones de ión superóxido producidas por la mezcla donde se usó la xantina oxidasa a 45 mU y las concentraciones de xantina de 0.004 0.012 y 0.200 mM, que producen el 1.88, 2.85 y 3.77 nmol/min de superóxido, respectivamente. Las concentraciones de superóxido antes mencionadas se utilizaron para los ensayos de cultivo con los cisticercos a los tiempos de 0.5, 1, 9 y 24 h. Ninguna de las concentraciones de ión superóxido ni los tiempos utilizados en los ensayos antes mencionados afectó la viabilidad de los parásitos, puesto que la viabilidad de éstos fue similar a la de los cisticercos controles que no fueron expuestos al superóxido (ver Tabla 2). En éstos se observó una evaginación del 100%, la movilidad característica de los cisticercos no disminuyó al aumentar la concentración ni el tiempo de exposición del oxidante, de igual manera no se observaron daños aparentes a la membrana.

TABLA 2. Efecto del O_2^- producido con xantina oxidasa (45mU) y xantina (0.004 0.012 y 0.200 mM) en cultivos de *T.crassiceps* expuestos a diferentes

TIEMPO (Horas)	CONTROL	XOX 45mU	XANT (0.20mM xantina)	1.88nm/min O_2^- (0.004mM xantina)	2.85nm/min O_2^- (0.012mM xantina)	3.77nm/min O_2^- (0.20mM xantina)
0.5	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	9.5/10 ++++ C	10/10 ++++ C
1	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	9.5/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C
9	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C
24	10/10 ++++ C	8/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C

NUMERO DE CISTICERCOS EVAGINADOS
NUMERO TOTAL DE CISTICERCOS

mU= miliunidades enzimáticas
mM= Milimolar

MOVILIDAD: ++++ ALTA +++ MEDIA ++ MODERADA
 + BAJA - NULA

INTEGRIDAD DE CISTICERCOS: C= COMPLETA M= MEDIA N= NULA

Expresión del gen para la SOD Cu/Zn de *T. crassiceps* con $O_2^{\cdot -}$:
La evaluación de la expresión del gen de la SOD Cu/Zn en cisticercos tratados o no con los agentes oxidantes se realizó por RT-PCR, método que amplifica los mensajeros que producen los genes (fig. 10). El nivel de expresión del gen para la SOD-Cu/Zn en los cisticercos no expuestos y expuestos al superóxido no afectó la cantidad de mensajero producido normalmente por este gen, asimismo el gen de actina utilizado como control de la expresión mantiene una expresión constante, comparado con el control que no se expuso al superóxido.

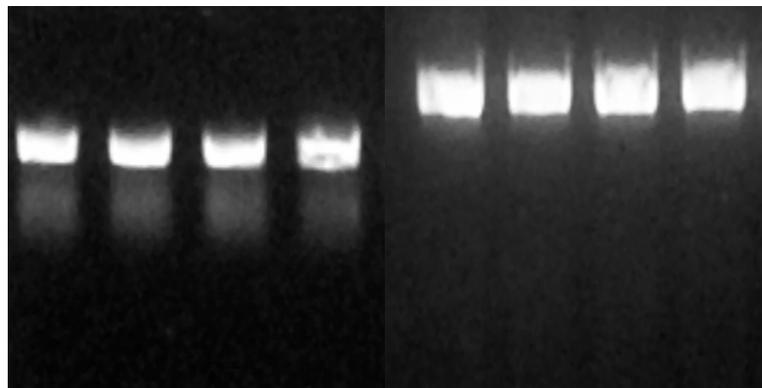


FIGURA 10. Efecto sobre la expresión de los genes de SOD-Cu/Zn y Actina de cisticercos de *T. crassiceps* incubados con diferentes concentraciones de ión superóxido a tiempos de 0.5 h. La amplificación del mensajero para la SOD-Cu/Zn y Actina se llevó a cabo por la RT-PCR con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 y Actina-1 y Actina-2 con ARN de cisticercos: 1 y 1') sin nada (control), 2 y 2') expuesto a xantina (0.20 mM), 3 y 3') expuestos a 1.88 nmol/min y 4 y 4') a 3.77 nmol/min de $O_2^{\cdot -}$. El gel fue de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Incubación de *T. crassiceps* con H₂O₂:

Para observar el efecto de otro ERO, se uso el H₂O₂ en los cisticercos de *T. crassiceps* se procedió a la incubación del parásito con este oxidante a diferentes concentraciones y un tiempo de 30 minutos (Tabla 3). En contraste al ión superóxido, el H₂O₂ si tuvo efectos dañinos sobre los cisticercos. La disminución de la evaginación, movilidad y daño a la pared de las larvas se dio al aumentar la concentración y tiempo de exposición al H₂O₂. Mostrando que concentraciones por arriba de 2 mM destruyen totalmente a los parásitos, en contraste, éstos son capaces de resistir hasta concentraciones de 2 mM, sin sufrir daño, puesto que la evaginación, movilidad y su morfología no se ven alteradas. El daño se observó por la afectación de la integridad morfológica de la pared del cisticerco, dónde se observa vacuolización, ruptura y liberación de tejido al medio de cultivo y cisticercos opalescentes.

TABLA 3 Efecto de diferentes concentraciones de H₂O₂ sobre *T.crassiceps* cultivados por 30 minutos.

TIEMPO (Horas)	CONTROL	1.0mM	2.0mM	3.0mM	4.0 mM	5.0 mM
1	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	4/10 + M	0/10 - N	0/10 - N
6	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	0/10 - N	0/10 - N	0/10 - N
24	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	10/10 ++++ C	0/10 + N	0/10 - N	0/10 - N

NUMERO DE CISTICERCOS EVAGINADOS
NUMERO TOTAL DE CISTICERCOS

mU=miliunidades enzimáticas
mM=Milimolar

MOVILIDAD: ++++ ALTA +++ MEDIA ++ MODERADA
 + BAJA - NULA

INTEGRIDAD DE CISTICERCOS: C= COMPLETA M= MEDIA N= NULA

Expresión de SOD Cu/Zn de *T. crassiceps* con H₂O₂:

La evaluación de la expresión del gen de la SOD Cu/Zn en cisticercos tratados y no tratados con H₂O₂ se realizó también por la RT-PCR (fig. 11). El nivel de expresión del gen para la SOD-Cu/Zn y del gen para la actina en los cisticercos expuestos a las concentraciones de 0.25 a 2 mM de H₂O₂ no se afectó, puesto que los cisticercos controles no expuestos al oxidante presentan el mismo nivel de expresión de ambos genes. Cabe mencionar que de los cisticercos expuestos a concentraciones mayores a 2 mM, fue imposible amplificar los mensajeros para los genes de SOD-Cu/Zn y de actina por la RT-PCR.

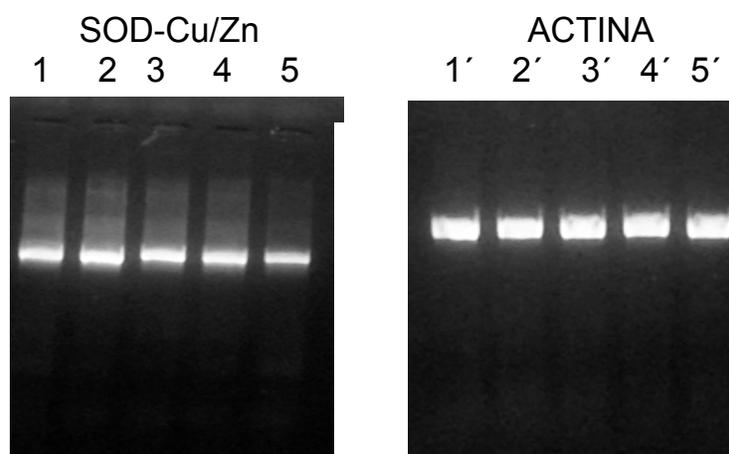


FIGURA 11. Efecto de H₂O₂ sobre la expresión de los genes de SOD-Cu/Zn y Actina de cisticercos de *T. crassiceps*, incubados con diferentes concentraciones de peróxido de H₂O₂ al tiempo de 0.5 h. La amplificación del mensajero para la SOD-Cu/Zn y Actina se llevó a cabo por la RT-PCR con los oligonucleótidos SOZ-X1 y SOZ-X2 y Actina-1 y Actina-2 con ARN de Cisticercos expuestos a 1 y 1') 0 (control), 2 y 2') a 0.25, 3 y 3') a 0.5, 4 y 4') a 1 y 5 y 5') a 2 mM. El gel de agarosa al 2% fue teñido con bromuro de etidio.

7. DISCUSIÓN

El anión superóxido se produce en el parásito durante el proceso metabólico normal, y en el estallido respiratorio por los leucocitos en respuesta a patógenos. El anión superóxido no es dañino *per se*, aunque puede afectar algunas enzimas. Su efecto dañino es debido a que puede reaccionar con otras moléculas como el H_2O_2 y el óxido nítrico para formar otras especies altamente tóxicas como el singulete, hidroxilo ($OH\cdot$), hidroxilo ($HO_2\cdot$), y el peroxinitrilo, que son altamente oxidantes [19].

Los organismos requieren mecanismos que limiten el daño molecular causado por las ERO primarias como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxidrilo ($HO\cdot$) [27]. Para detener este proceso destructivo los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección [28]. Dentro de los sistemas enzimáticos las tres principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y las peroxiredoxinas. Cabe mencionar que la catalasa no existe en helmintos y que estos presentan poca actividad de glutatión peroxidasa.

Taenia solium causa cisticercosis en humanos y cerdos. Éticamente no es posible obtener cisticercos de humanos, pero sí de cerdos infectados cuyos cisticercos son de edad desconocida. Para poder controlar la edad de la infección y de los cisticercos, se estableció un modelo de cisticercosis en ratones Balb/c por *T. crassiceps*. Este modelo nos permitió saber que los cisticercos crecen describiendo una tendencia en forma Gausiana dentro de los ratones, obteniendo el máximo de cisticercos, viables con una morfología típica y movimiento vigoroso en las infecciones menores a 5 meses. Por lo que en los ensayos se utilizaron estos cisticercos.

Se prepararon extractos con cisticercos para medir en ellos la actividad de SOD con y sin inhibidores específicos para la SOD-Cu/Zn y de Mn^{2+} . Estos ensayos mostraron que existe una actividad de 11% de SOD-Cu/Zn, 55% de Mn^{3+} y un 34% probablemente de una SOD no conocida o bien de otra molécula. Este

ensayo nos muestra que puede existir una SOD de Mn^{3+} no descrita en helmintos aún. Una vez detectada la actividad de SOD-Cu/Zn, se aisló y caracterizó la región del gen que codifica para la misma en *T. crassiceps*. Los fragmentos obtenidos del ADNc y ADNg de *T. crassiceps* presentaron el mismo tamaño de 456 nucleótidos, lo que indica que este gen no contiene intrones, además de que su secuencia primaria tiene todas las características de una SOD-Cu/Zn. Asimismo, presentó una homología de 95% con la enzima de *T. solium*, organismo filogenéticamente relacionado y baja homología con la enzima de sus hospederos, lo que la postula como buen blanco farmacológico.

Como es ya conocido el nivel de expresión de muchos genes es regulado por alguna molécula del ambiente. Una alta concentración del transcrito de un gen se correlaciona con una alta exposición del parásito a los metabolitos tóxicos como las ERO. Por ejemplo, se ha demostrado que algunas enzimas antioxidantes son expresadas en gran cantidad en esquistosomas adultos por la presencia de agentes oxidantes. Por otro lado, es conocido que los helmintos son capaces de vivir por largos periodos en sus hospederos ya que producen grandes cantidades de estas enzimas antioxidantes cuando los parásitos envejecen en el huésped [41-44].

Para evaluar el efecto de la variación de la expresión de dos EROs, el ión superóxido y el H_2O_2 sobre el gen que codifica para la SOD-Cu/Zn, se incubaron cisticercos con los oxidantes antes mencionados, utilizando como control el gen de actina, gen que no varía su expresión ante estímulos. El nivel de expresión de la SOD Cu/Zn en cisticercos expuestos a diferentes concentraciones de los oxidantes y tiempos usados, no la afectó y se comportó como el gen control. Esto sugiere que el gen para la SOD-Cu/Zn se expresa constantemente en el tiempo y no es afectado por O_2^- y H_2O_2 .

Por otro lado, los ensayos de exposición a los oxidantes, nos muestran que este parásito es muy resistente a altas concentraciones de superóxido (3.77 nmol/min); *in vivo*, concentraciones mucho más altas que las que producen las células fagocíticas (promedio de $1.03 \text{ nmol}/10^7$ leucocitos por 15 minutos). Asimismo, este ensayo muestra que los cisticercos son muy resistentes al H_2O_2 (2 mM), ya que

otros parásitos mueren a concentraciones menores a 1 mM [45, 46]. Esto podría explicar la resistencia de estos cestodos a la respuesta inmune en infecciones crónicas.

Finalmente, las aportaciones de este trabajo fueron, implementar un modelo de cisticercosis de *T. crassiceps*, desarrollar de un método cuantitativo para la generación del anión superóxido; demostrar que el gen de la SOD-Cu/Zn en *T. crassiceps* no contiene intrones, desarrollar un método para medir la expresión de genes de estos parásitos en condiciones de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán realizar varios estudios que podrán ser aplicados a *Taenia solium*, un cestodo de importancia médica.

8. ANEXO

AMORTIGUADOR DE LISIS

Tris		50mM
EDTA		0.1 mM
Sarcosil		0.5%

Ajustar pH 8.0 y aforar a un litro

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS 10X)

NaCl	137mM	80.0g
KCl	2.7mM	2.0g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.3mM	11.5g

Ajustar a pH7.4 y aforar a un litro.

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS pH 7.8

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

Ajustar a pH7.8 y aforar a un litro.

MEDIO DE CULTIVO LURIA BETANI (LB)

NaCl	5.8g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0g	
Tris-HCl pH 7.5	1M	50.0mL
Gelatina al 2%	5.0mL	

Todos los componentes del medio de cultivo se diluyen y aforan a 1L con agua desionizada. El pH del medio se ajusta a 7.0 y se esteriliza en autoclave durante 20min a 15Lb de presión en ciclo líquido.

TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1mM

Aforar a un litro

MEDIO LB

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Aforar a un litro

PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA AL 1.5 % + BROMURO DE ETIDIO

Para cuatro geles: Disolver 2.4 g de agarosa en 160 mL de TAE 1X, adicionar 36 µL de bromuro de etidio, mezclar bien y verter en los moldes. Dejar solidificando a 4 °C.

SOLUCIÓN 1

Glucosa	50mM
EDTA	10mM
Tris	25Mm
Ajustar pH8.0 y aforar a un litro	

SOLUCIÓN 2

NaOH	0.2mM
SDS	1.0%
Aforar a un litro	

SOLUCIÓN 3

NH ₄ Ac	7.5M
Aforar a un litro	

9. REFERENCIAS

1. Larralde, C., et al., *Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus, and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients*. Am J Trop Med Hyg, 1989. **40**(3): p. 282-90.
2. Larralde, C., et al., *Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia solium*. Arch Pathol Lab Med, 1990. **114**(9): p. 926-8.
3. Sciutto, E., et al., *Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T. solium antigens against experimental murine T. crassiceps cysticercosis*. Parasite Immunol, 1990. **12**(6): p. 687-96.
4. Lacleste, J.P., et al., *Crystals of virus-like particles in the metacestodes of Taenia solium and T. crassiceps*. J Invertebr Pathol, 1990. **56**(2): p. 215-21.
5. Dorais, F.J. and G.W. Esch, *Growth rate of two Taenia crassiceps strains*. Exp Parasitol, 1969. **25**(1): p. 395-8.
6. Fox, L.L., R.E. Kuhn, and G.W. Esch, *Taenia crassiceps: antigenic comparison of two larval strains*. Exp Parasitol, 1971. **29**(2): p. 194-6.
7. Romano, M.C., et al., *Steroid hormone production by parasites: the case of Taenia crassiceps and Taenia solium cysticerci*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 221-5.
8. J., W.K.S., *Cestodes. Principles and practice of parasitology*. , ed. J.W.a.S. Ltd. 2001.
9. Barry, M. and L.C. Kaldjian, *Neurocysticercosis*. Semin Neurol, 1993. **13**(2): p. 131-43.
10. Schmidt G.D., R.L.S., *Cestoidea: Form, function, and classification of the tapeworms: Foundations of parasitology*. . 6^a ed, ed. M. Hill. 2000, USA.
11. E., T.J.V., *Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. . 1995, San Diego: Academic Press.
12. • Lamothe AR. & García Pl., *Helmintiasis de hombre en México* Edit., AGT editor s.a., México, 1988.
13. D., H., *Free radical theory of aging*. Mutat Res, 1992(275): p. 257-266.
14. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* J Lab Clin Med, 1992. **119**(6): p. 598-620.
15. Cross, A.R. and O.T. Jones, *Enzymic mechanisms of superoxide production*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1057**(3): p. 281-98.
16. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease*. Mayo Clin Proc, 1988. **63**(4): p. 390-408.
17. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions*. Mayo Clin Proc, 1988. **63**(4): p. 381-9.
18. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
19. Rosen, G.M., et al., *Free radicals and phagocytic cells*. Faseb J, 1995. **9**(2): p. 200-9.
20. Fridovich, I., *Oxygen toxicity: a radical explanation*. J Exp Biol, 1998. **201**(Pt 8): p. 1203-9.

21. Torres, W.H., *Biología de las especies reactivas*. Mensaje bioquímico, 2002. **XXVI**: p. 55.
22. Fridovich, I., *Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18515-7.
23. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
24. Fridovich, I., *Biological effects of the superoxide radical*. Arch Biochem Biophys, 1986. **247**(1): p. 1-11.
25. Yi, M.J., et al., *Heat-shock protein 25 (Hspb1) regulates manganese superoxide dismutase through activation of Nfkb (NF-kappaB)*. Radiat Res, 2002. **158**(5): p. 641-9.
26. Schreck, R. and P.A. Baeuerle, *Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B*. Methods Enzymol, 1994. **234**: p. 151-63.
27. Henkle-Duhrsen, K. and A. Kampkotter, *Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **114**(2): p. 129-42.
28. Callahan, H.L., R.K. Crouch, and E.R. James, *Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?* Parasitol Today, 1988. **4**(8): p. 218-25.
29. Brophy, P.M. and D.I. Pritchard, *Immunity to helminths: Ready to tip the biochemical balance?* Parasitol Today, 1992. **8**(12): p. 419-22.
30. James, E.R., *Superoxide dismutase*. Parasitol Today, 1994. **10**(12): p. 481-4.
31. McGonigle, S., G.P. Curley, and J.P. Dalton, *Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite Fasciola hepatica*. Parasitology, 1997. **115** (Pt 1): p. 101-4.
32. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
33. Crapo, J.D., et al., *Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10405-9.
34. Sanchez-Moreno, M., et al., *Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by a series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis*. Arzneimittelforschung, 1989. **39**(7): p. 759-61.
35. Gonzalez, R., G. Mendoza-Hernandez, and A. Plancarte, *Purification of Taenia solium cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification*. Parasitol Res, 2002. **88**(10): p. 881-7.
36. Tang, L., et al., *Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from Brugia lymphatic filarial nematode parasites*. Infect Immun, 1994. **62**(3): p. 961-7.
37. Liddell, S. and D.P. Knox, *Extracellular and cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutases from Haemonchus contortus*. Parasitology, 1998. **116** (Pt 4): p. 383-94.
38. Lattemann, C.T., et al., *Immunogenicity of the extracellular copper/zinc superoxide dismutase of the filarial parasite Acanthocheilonema viteae delivered by a two-phase vaccine strain of Salmonella typhimurium*. Parasite Immunol, 1999. **21**(4): p. 219-24.
39. Castellanos-Gonzalez, A., L. Jimenez, and A. Landa, *Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from Taenia solium*. Int J Parasitol, 2002. **32**(9): p. 1175-82.

-
40. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 41. Nare, B., J.M. Smith, and R.K. Prichard, *Schistosoma mansoni: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development*. Exp Parasitol, 1990. **70**(4): p. 389-97.
 42. Mei, H. and P.T. LoVerde, *Schistosoma mansoni: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes*. Exp Parasitol, 1997. **86**(1): p. 69-78.
 43. Morel, Y. and R. Barouki, *Repression of gene expression by oxidative stress*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 481-96.
 44. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
 45. Callahan, H.L., R.K. Crouch, and E.R. James, *Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for Onchocerca cervicalis microfilariae*. Parasitology, 1990. **100 Pt 3**: p. 407-15.
 46. Freudenstein-Dan, A., D. Gold, and Z. Fishelson, *Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing*. J Parasitol, 2003. **89**(6): p. 1129-35.

*I can see clearly now, the rain is gone,
I can see all obstacles in my way
Gone are the dark clouds that had me blind
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day*

*Oh yes I can make it now, the pain is gone
All of the bad feelings have disappeared
Here is the rainbow I've been prayin' for
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day*

*Look all around, there's nothin' but blue skies
Look straight ahead, nothin' but blue skies*

*I can see clearly now, the rain is gone,
I can see all obstacles in my way
Here is the rainbow I've been prayin' for
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day
It's gonna be a bright, bright
Sun-Shiny day*

Bob Marley

El hombre encuentra a Dios detrás de
cada puerta que la ciencia logra
abrir

Albert Einstein