

01672



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

PURIFICACION DE LA ENZIMA  
SUPEROXIDO DISMUTASA DE  
CISTICERCOS DE *T. solium*

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTADA POR  
RAMON GONZALEZ BEAS

COMITE TUTORAL:

AGUSTIN PLANCARTE CRESPO  
JOSE JUAN MARTINEZ MAYA  
VICTOR MANUEL VAZQUEZ PRATTS

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario

Ramón González Beas

## DEDICATORIA

A mi esposa

OLIVIA

A mis hijas

INDIRA SAMANTHA y LARISSA PALOMA

## AGRADECIMIENTOS

A LOS PROFESORES Y PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE  
MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA DE LA U.N.A.M.

A LOS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO  
DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.N.A.M.

Por su incondicional apoyo

## CONTENIDO

1	INTRODUCCION.....	1
1.1	Teniasis-cisticercosis causada por <i>Taenia solium</i> .....	1
1.2	Control de teniasis-cisticercosis causadas por <i>T. solium</i> .....	2
1.3	Evasión inmune.....	3
1.3.1	Enzimas antioxidantes y evasión inmune.....	4
1.4	La enzima Superóxido Dismutasa.....	6
2	JUSTIFICACION.....	9
3	HIPOTESIS.....	9
4	OBJETIVOS.....	9
5	MATERIAL Y METODOS.....	10
5.1	Purificación de la enzima.....	10
5.1.1	Parásitos.....	10
5.1.2	Homogeneización.....	10
5.1.3	Cromatografías secuenciales.....	10
5.1.4	Cromatografía de filtración en Sephadex G-75-200.....	12
5.1.5	Cromatografía de afinidad a heparina.....	12
5.2	Ensayos enzimáticos.....	12
5.2.1	En solución.....	13
5.2.2	Actividad enzimática en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos.....	14
5.2.3	Ensayos de inhibición enzimática.....	15
5.2.3.1	Inhibición por cianuro de potasio (KCN).....	15
5.2.3.2	Inhibición por temperatura.....	15
5.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).....	15
5.4	Cuantificación de proteína.....	17
5.5	Producción de sueros.....	18
5.6	Inmunoelctrotransferencia (IET).....	18
5.6.1	Revelado de las IET.....	19
5.7	Secuencia de aminoácidos.....	20
6	RESULTADOS.....	21
6.1	Purificación de la enzima.....	21
6.1.1	Parásitos.....	21
6.1.2	Homogeneizado.....	21
6.1.3	Cromatografías secuenciales.....	21
6.2	Cromatografía de filtración en G-75-200.....	22
6.3	Cromatografía de afinidad a heparina.....	23
6.4	PAGE-SDS.....	23
6.5	Secuencia de aminoácidos.....	24
6.6	Unidades de actividad enzimática.....	24
6.7	Ensayos de especificidad.....	24
6.8	Ensayos de inhibición enzimática.....	25
6.9	IET.....	25
6.9.1	Fracción con actividad obtenida de QAE-cellex.....	25

	6.9.2 Fracción con mayor actividad obtenida de F-S.....	26
	6.9.3 Fracción con mayor actividad obtenida del cromatoénfoque en PBE-94.....	26
	6.9.4 Diversas fracciones obtenidas del cromatoénfoque en PBE-94.....	27
7	DISCUSION.....	27
8	LITERATURA CITADA.....	35

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de la purificación de SOD T. s. ....	40
Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de SOD T. s. ....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de la determinación de unidades SOD.....	41
Figura 2. Secuencia amino terminal de mioglobina.....	41
Figura 3. Secuencia amino terminal de SOD <i>T. s.</i> .....	41
Figuras 4-14. Cromatografías de QAE-cellex.....	42
Figuras 15-22. Cromatografías de fenilseferosa.....	48
Figuras 23-31. Cromatografías en PBE-94.....	52
Figura 32. Cromatografía en sefarosa G-75.....	57
Figura 33. Geles analíticos (PAGE-SDS) del sobrenadante, de las fracciones de QAE-cellex y de las fracciones de fenilseferosa.....	58
Figura 34. PAGE-SDS de la fracción obtenida del cromatoenfoque en PBE-94 con mayor actividad enzimática para SOD en condiciones no reducidas.....	59
Figura 35. PAGE-SDS de la fracción obtenida del cromatoenfoque en PBE-94 con mayor actividad para SOD en condiciones reducidas.....	60
Figura 36. Ensayo enzimático para SOD en PAGE nativo.....	61
Figura 37. Inmunoelectrotransferencia de la fracción de QAE cellex con actividad para SOD.....	62
Figura 38. Inmunoelectrotransferencia de la fracción reducida de fenilsefarosa con actividad para SOD.....	63
Figura 39. Inmunoelectrotransferencia de la fracción no reducida de fenilsefarosa con actividad para SOD.....	64
Figura 40. Inmunoelectrotransferencia de la fracción con mayor actividad para SOD obtenida del cromatoenfoque en PBE.....	65
Figura 41. Inmunoelectrotransferencia de diferentes fracciones obtenidas del cromatoenfoque en PBE-94.....	66

## RESUMEN

Con el objeto de purificar la enzima Superóxido Dismutasa, sobrenadantes de homogenizados de cisticercos de *Taenia solium* fueron tratados a través de cromatografías líquidas en forma secuencial de QAE-cellex, Fenil Sefarosa y Cromatoenfoco en PBE-94. La enzima superóxido dismutasa de cisticercos de *T. solium* (SOD *T. s.*) nativa es un dímero con un peso molecular de 30 kDa, y cada monómero de 15 KDa, es hidrofílica, presenta un punto isoeléctrico de  $6.3 \pm 0.25$  y una actividad de 2,900 U/mg. La incubación de SOD *T. s.* con 10 mM de cianuro de potasio o por 4 minutos a 100°C inhiben su actividad en un 80% y 100% respectivamente. La enzima es reconocida por anticuerpos de conejo anti Cu-ZnSOD de eritrocitos de bovino. Por este procedimiento de purificación también se copurificó mioglobina del parásito y/o del huésped. SOD *T. s.* y la mioglobina podrían ser moléculas capaces de inactivar el anión superóxido derivado del ataque fagocítico y de esta forma participar en la evasión inmune.

## SUMMARY

A protein with superoxide dismutase activity was purified from *Taenia solium* metacestodes (SOD *T. s.*) by sequential ion exchange chromatography on quaternary-amino-ethyl-cellulose (QAE-cellex), hydrophobic interaction on phenil-sepharose (F-S) and chromatofocusing on polybuffer exchanger 94 (PBE-94). The native SOD *T. s.* is a dimeric protein with apparent molecular weight of 30 KDa determined by gel filtration chromatography on sephadex G 75-200 and 15 KDa determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis under reducing conditions. The isoelectric point of the purified protein is of  $6.3 \pm 0.25$ . Boiling for 4 minutes the SOD *T. s.* inhibited completely the enzymic activity, whereas incubation on 10mM KCN inhibited only 80% enzymic activity. SOD *T. s.* was recognized for antibodies of rabbit anti-SOD of bovine cell red. For this purification procedure we also purified myoglobin of the parasite and/or host. SOD *T. s.* and myoglobin could be molecules that inactivate the superoxide anion derived of the phagocytic attack on this way take part in the immune evasion.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Teniasis y Cisticercosis causadas por *Taenia solium*.

*T. solium* es un céstodo parásito que requiere de dos huéspedes para desarrollar su ciclo biológico. El hombre es el único huésped definitivo porque en su intestino delgado se encuentra la fase adulta del parásito, misma que elimina junto con las heces proglótidos repletos de huevos contaminando el medio ambiente. Los proglótidos si son ingeridos por el cerdo serán activados por los jugos gástricos, liberando de sus cubiertas el embrión hexacanto, éste atraviesa la pared intestinal y a través del sistema circulatorio y/o linfático puede alcanzar diferentes tejidos en donde se desarrollará la fase larvaria o cisticerco. El hombre al consumir carne de cerdo con cisticercos viables desarrollará la teniasis (1), la cual puede durar hasta 25 años (2).

De manera accidental, si una persona consume huevos de *T. solium*, puede desarrollar la fase larvaria en sus tejidos pero, cuando los cisticercos se alojan en el sistema nervioso central ocasionan la neurocisticercosis, cuyas manifestaciones clínicas dependen de la localización, número y estado del parásito, pudiendo causar graves trastornos neurológicos e incluso la muerte. También esta forma de la parasitosis puede cursar asintomática, inclusive por 30 años (3).

En muchos países de Asia, África y América Latina esta enfermedad es un problema de salud pública. En México la neurocisticercosis es la principal causa de epilepsia tardía (4) además, el 13% de las neurocirugías realizadas durante 1995 fueron debidas a esta enfermedad (5) y el 75% de los casos se presentan en individuos de edad productiva (6).

El complejo teniasis-cisticercosis persiste en sitios en donde las condiciones sanitarias y de higiene son deficientes. En países desarrollados la teniasis-cisticercosis prácticamente ha sido erradicada gracias al mejoramiento de las condiciones sanitarias y a mejores hábitos higiénicos de la sociedad (7). Sin embargo, en los últimos 10 años, debido a la migración de individuos por razones de trabajo han resurgido los casos en algunos de estos países (8).

#### 1.2 Control de la Teniasis-Cisticercosis causadas por *T. solium*.

La OMS considera al complejo teniasis-cisticercosis como una enfermedad capaz de ser erradicada debido a que el parásito tiene un solo huésped definitivo, hay fármacos eficientes contra este céstodo y no existen huéspedes intermediarios silvestres que puedan perpetuar la enfermedad en algún ambiente (9). Sin embargo, se han identificado varios problemas que dificultarían su erradicación a corto plazo. Por ejemplo los tratamientos masivos podrían, en individuos asintomáticos con cisticercos, desencadenar la enfermedad al destruir al parásito, por su parte los céstodos serían capaces de volverse también resistentes a los fármacos. Además la población de zonas en erradicación podría resultar más susceptible a la introducción de nuevos focos de infección por la cada vez menor estimulación antigénica en el medio ambiente debido a la eliminación del parásito (10).

Por otro lado, ya que el cerdo es el huésped intermediario, la disminución de la prevalencia de la cisticercosis porcina mediante la vacunación sería una estrategia valiosa. A este respecto Molinari *et. al.* (11) han demostrado que en el extracto crudo de cisticercos de *T. solium* existen componentes antigénicos capaces de despertar una respuesta inmune protectora, por lo cual se han ensayado diversos componentes tanto purificados como recombinantes obtenidos de *T. solium*, *Taenia ovis* y *Taenia crassiceps* con resultados

alentadores. Sin embargo, algunos investigadores consideran que la vacunación por si sola no es una medida que controle el complejo teniasis-cisticercosis por lo que se hace necesario considerar otras estrategias como el aprovisionamiento de agua potable y de letrinas para la disposición adecuada de excretas (12).

### 1.3 Evasión inmune.

Se han descrito diversas maneras mediante las cuales los parásitos evaden la respuesta inmune, por ejemplo, la variación antigénica estudiada en *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* y *Leishmania* sp, se basa en la habilidad de estos protozoarios para cambiar constantemente la composición molecular de sus superficies, así se ha observado en *T. brucei* la presencia de una glicoproteína para la cual codifican más de mil diferentes genes aunque solo se expresan uno por uno (13).

Otra estrategia de evasión del ataque inmune es la producción de proteasas que hidrolizan componentes del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria del huésped. Las enzimas proteolíticas se han descrito en diversas especies de parásitos y en diferentes estadios de desarrollo de los mismos. Wesley K. *et al.* (14) mostraron que los extractos de microfilarias de *Dirofilaria immitis* poseen un efecto enzimático, ya que fueron capaces de hidrolizar diversas proteínas entre las que se incluye la IgG. En larvas de *T. taeniformis* se describió una proteína, denominada Teniaestatina, capaz de inhibir la cascada del complemento tanto por la vía clásica, al hidrolizar el factor C3, como por la vía alterna rompiendo al factor D (15), además de que es capaz de inhibir la quimiotaxis de neutrófilos (16).

A partir de metacéstodos de *T. solium* se ha aislado el antígeno B, una molécula estructuralmente similar a la paramiosina encontrada en *Schistosoma mansoni*, la cual

también es capaz de inhibir la activación del sistema del complemento (17). Por otro lado, un péptido de bajo peso molecular, denominado "factor del metacéstono", aislado también de larvas de *T. solium*, inhibe la proliferación celular y la respuesta inflamatoria alrededor de los metacéstonos implantados subcutáneamente en ratones. Este efecto posiblemente se logra debido a que el "factor del metacéstono" disminuye la producción de interleucina 2, interferón  $\gamma$  e interleucina 4, así como del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (18).

El mimetismo molecular o recubrimiento con antígenos del huésped es otra estrategia identificada en los parásitos para evadir el ataque inmune. Las larvas de *S. mansoni* son capaces de absorber antígenos del sistema de histocompatibilidad de sus huéspedes, lo que les confiere un sistema de defensa contra las células asesinas del sistema inmune, (19) y/o también pueden recubrirse de lipoproteínas de baja densidad que disminuye la capacidad de los anticuerpos para adherirse a su superficie (20).

### 1.3.1 Enzimas antioxidantes y evasión inmune.

Otra estrategia de evasión inmune es la producción de enzimas antioxidantes capaces de inactivar especies tóxicas derivadas de la reducción parcial del oxígeno (20,21). Cuando las células fagocíticas del huésped son estimuladas por la presencia de agentes extraños se produce el fenómeno denominado "Estallido Respiratorio" (22,23), el cual consiste en un incremento del consumo de oxígeno ( $O_2$ ) y gracias a un sistema enzimático asociado a la membrana, que emplea fosfato de nicotín adenín dinucleotido reducido (NADPH) como donador de electrones, el  $O_2$  se reduce formándose el primer compuesto tóxico derivado de este fenómeno, el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (24,25). El  $O_2^{\cdot-}$  es liberado dentro de la vacuola

fagocítica y al espacio extracelular (24) y reacciones subsecuentes del superóxido producen otros agentes tóxicos como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), producido por la dismutación espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa. El  $H_2O_2$  al reaccionar con haluros como el cloro, yodo o bromo, y catalizado por la peroxidasa de eosinófilos o la mieloperoxidasa de neutrófilos formará ácidos hipohaluros más tóxicos. También el  $O_2^{\cdot-}$ , a través de la reacción de Haber Weiss o al reaccionar con el óxido nítrico formará el radical hidroxilo (26,27). Este último es el compuesto más reactivo y dañino derivado de este fenómeno y es capaz de modificar la estructura de ácidos nucleicos, proteínas y dañar membranas lipídicas al desencadenar la lipoperoxidación (28).

que en su fase adulta tiene un estrecho contacto con el sistema inmune del huésped, ya que vive en el sistema intravascular mesentérico. En este parásito se han identificado diversas enzimas antioxidantes como Glutación peroxidasa, dos formas de Superóxido dismutasa, cinco isoformas de Glutación S-transferasa, Citocromo c peroxidasa y Glutación Reductasa (31). La Glutación peroxidasa y la Superóxido dismutasa se encuentran en la superficie y el epitelio intestinal, lo que podría constituir una respuesta de adaptación del parásito al ataque inmune del huésped (31).

#### 1.4 La enzima Superóxido dismutasa (SOD).

Un radical libre es aquel compuesto que tiene en su estructura un electrón desapareado. (28). Bajo esta definición el oxígeno molecular ( $O_2$ ) es un biradical ya que tiene en su estructura dos electrones desapareados, así cuando el  $O_2$  acepta un electrón se produce el  $O_2^{\bullet}$ .

El descubrimiento de la dismutación (reacción de óxido-reducción de un compuesto consigo mismo) del  $O_2^{\bullet}$  catalizada por la enzima Superóxido dismutasa, por McCord y Fridovich (44), demostró la existencia de radicales reactivos de oxígeno en los organismos vivos, similares a aquellos obtenidos de la irradiación del agua (23). Se ha comprobado que el  $O_2^{\bullet}$ , con una vida media muy corta, se produce durante el proceso de la respiración en la membrana mitocondrial, también en los cloroplastos de las plantas durante la síntesis de carbohidratos, en las células fagocíticas durante el estallido respiratorio además, diversos compuestos xenobióticos como el paraquat o algunos parasitocidas, luego de ser reducidos ceden su electrón desapareado al  $O_2$ , produciendo  $O_2^{\bullet}$  (ciclicidad redox) (23).

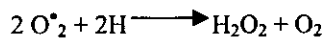
Según el metal contenido en su sitio activo existen 3 tipos de SOD. La enzima que contiene cobre y zinc (Cu-ZnSOD), originalmente descrita como exclusiva de eucariontes, se encuentra en el citoplasma de la célula y ha sido purificada también de varias especies de bacterias como *Micoplasma hyopneumoniae* (32), *E. Coli* (33) y *Brucella abortus* (34) y de cloroplastos de diversas plantas verdes (23). Otra es la que contiene en su sitio activo Manganeseo (MnSOD) y se encuentra en procariontes y en la mitocondria de las células eucariotas. El tercer tipo contiene hierro (FeSOD) y esta presente en procariontes, cloroplastos y especies del reino protista (35), estos 2 últimos tipos de enzimas son similares tanto en su secuencia de aminoácidos como en su estructura, lo que sugiere un ancestro común (35,27).

La forma más comúnmente descrita de SOD es la dimérica, compuesta por 2 monómeros de aproximadamente 15 a 18 KDa cada uno, sin embargo Leid y Suquet (36) encontraron en larvas de *T. taeniaeformis* una forma tetramérica de 64 KDa, constituida por monómeros de 16.6 KDa cada uno.

Una forma extracelular, glicosilada, que contiene en su sitio activo Cu-Zn (EC-SOD) ha sido descrita en tejido, linfa y plasma de humano y otros mamíferos (37, 38), algunos parásitos y bacterias, por ejemplo *Nocardia asteroides*, una bacteria patógena que sobrevive en el interior de los fagocitos, induce el estallido respiratorio, pero sin embargo sobrevive al ataque fagocítico y se ha comprobado que produce durante todo su desarrollo EC-SOD (39). *S. mansoni* expresa la forma citosólica de SOD y una forma glicosilada que contiene el péptido señalizador característico de las proteínas secretadas, esta última se localiza en la región subtegumental del parásito adulto (40, 41). Una EC-SOD también se ha descrito en *Onchocerca volvulus* y se ha postulado que puede estar involucrada en la

defensa contra el ataque del anión superóxido producido extracelularmente, incluido el derivado del ataque fagocítico (42). Esta forma molecular de SOD se ha descrito con un peso de 135 KDa, compuesta por 4 monómeros de entre 28 y 30 KDa cada uno y es codificada por un gen diferente al que codifica para la Cu-Zn SOD citosólica. (37).

Con una eficiencia similar entre las distintas formas (26, 43), la enzima cataliza la reacción siguiente:



Es posible que los cisticercos de *T. solium* posean la enzima SOD, ya que son capaces de establecerse y desarrollarse en los tejidos del huésped en forma crónica, incluso estando en contacto con el sistema inmune.

## 2. JUSTIFICACION

Los parásitos han desarrollado diversos mecanismos mediante los cuales logran establecerse y permanecer prolongados periodos en sus huéspedes. La variación antigénica, el mimetismo molecular, la producción de proteasas parasitarias que inactivan moléculas del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria del huésped así como la producción de enzimas antioxidantes capaces de inactivar compuestos reactivos de oxígeno, incluidos los derivados de las células fagocíticas, son algunos de los mecanismos propuestos.

En diversos helmintos se han identificado varias enzimas antioxidantes, sin embargo en *T. solium* solo se han reportado 2 formas de Glutación *S*-transferasa. En el presente trabajo se pretende identificar la presencia de la enzima SOD en cisticercos de *T. solium*.

## 3. HIPOTESIS

Si componentes proteicos (CP) de cisticercos de *T. solium* son capaces de inhibir la reducción del citocromo *c* en el ensayo descrito por McCord y Fridovich entonces en esos CP se encuentra la enzima Superóxido dismutasa.

## 4. OBJETIVOS

4.1 Purificar por procedimientos bioquímicos la enzima superóxido dismutasa de cisticercos de

*T. solium*.

4.2 Caracterizar parcialmente a la enzima superóxido dismutasa de cisticercos de

*T. solium*.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 Purificación de la enzima.

#### 5.1.1 Parásitos.

Cisticercos de *T. solium* se diseccionaron de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente e inmediatamente se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se tuvo suficiente cuidado en este proceso para no incluir los tejidos del huésped en ellos.

#### 5.1.2. Homogeneización.

Los parásitos fueron homogenizados siguiendo la técnica de Leid y col.(36), brevemente: Los cisticercos fueron suspendidos en una proporción de 1:3 (p/v) en tris 0.01 M y KCl 3 M, pH 8.0, se homogenizaron en un homogeneizador de tejidos marca Polytron (Brinkmann Instrumens, New York, U.S.A.) dando pulsos de 15,000 rpm durante 1 minuto con intervalos de 30 segundos en número suficiente para permitir la destrucción total de todos los parásitos, dejándolos en agitación lenta toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El homogeneizado se centrifugó a 45,000g durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante obtenido fue dializado exhaustivamente en tris 0.01 M pH 8.0 y nuevamente centrifugado a 45,000g durante 90 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . a partir del sobrenadante de esta última centrifugación (Sn-1) se purificó la proteína..

#### 5.1.3. Cromatografías secuenciales.

Sn-1 se pasó por una cromatografía de intercambio aniónico en QAE-cellex (4 cm de diámetro por 19 cm de altura) a  $4^{\circ}\text{C}$ , la resina se equilibró con tris-HCl 0.01 M pH 8.0. Las

proteínas adsorbidas a la columna fueron eluidas mediante un gradiente salino de NaCl de 0 a 0.5 M en tris 0.01 M pH 8.0 a un flujo de 90 ml/h y se colectaron fracciones de 3 ml. Para determinar la actividad enzimática se emplearon los métodos tanto en solución como en geles nativos descritos más adelante. Todas las fracciones con actividad enzimática (QAE-elu) se mezclaron y concentraron por presión negativa con nitrógeno en el sistema de filtración Amicon con una membrana de corte de peso molecular de 3000 Daltons (Millipore, MA, USA). Con el objeto de verificar la formación del gradiente salino se midió la conductividad iónica en cada 5 fracciones con un conductímetro YSI modelo 3200 (YSI Inc. Yellow Spring, Ohio, U.S.A.), expresando la conductividad en milisiemens (mS). Las QAE-elu concentradas se prepararon para la siguiente cromatografía dializando contra fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) 0.7 M, pH 7.8.

Las QAE-elu se separaron en una cromatografía de hidrofobicidad de Fenilsefarsa (F-S) (2 cm de diámetro por 21 cm de altura) a 4° C, equilibrada con  $K_2HPO_4$  0.7 M pH 7.8. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con el mismo amortiguador de fosfatos pero a una concentración de 0.1 M a un flujo de 19 cm / h Fracciones de 3 ml fueron colectadas y se les determinó la actividad enzimática para SOD. Las fracciones con actividad enzimática se juntaron (F-S elu) y se concentraron por el sistema previamente descrito y posteriormente se dializaron contra imidazole 0.025 M pH 7.4 a 4°C.

F-S elu se separó en un cromatoenfoco de sefarsa multiamortiguadores de intercambio iónico (cromatoenfoco en PBE 94. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) (1 cm de diámetro por 18 cm de altura). La resina se equilibró con imidazole 0.025 M pH 7.4. Como eluyente se usó PBE 74, pH 4.0 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) y se colectaron fracciones de 2 ml. El pH de cada fracción se determinó mediante

un potenciómetro Beckman modelo PHI 32. Debido a la baja concentración proteica en las fracciones obtenidas se decidió agruparlas en rangos de 0.15 unidades de pH de diferencia entre ellas. Estas se concentraron por Amicon y para ajustarles el pH se dializaron contra amortiguador de fosfatos pH 7.2 (PBS). Posteriormente se emplearon 100 µl de cada grupo para determinar la actividad enzimática para SOD.

#### 5.1.4 Cromatografía de filtración en Sephadex G-75-200.

Con el objeto de identificar el peso molecular de la forma nativa de la enzima SOD, una muestra de 10 mg de proteína de F-S elu se pasó a través de una cromatografía de afinidad en Sephadex G-75-200 (1 cm de diámetro por 60 cm de altura) a temperatura ambiente. La columna se estandarizó a un flujo de 0.5 ml/h empleando como proteínas de referencia para pesos moleculares albúmina de suero bovino (60 KDa), anhidrasa carbónica (32 KDa) y mioglobina de corazón de caballo (16 KDa). Las proteínas se eluyeron con  $K_2HPO_4$  0.05 M pH 7.0. Se colectaron fracciones de 0.7 ml.

#### 5.1.5 Cromatografía de afinidad a heparina.

Puesto que en mamíferos y en *S. mansoni* se ha reportado una forma extracelular de la enzima SOD glicosilada, una muestra de 28 mg de proteína de QAE elu fue pasada a través de una cromatografía de afinidad a heparina-Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) (1 cm de diámetro por 5 cm de altura). La columna se equilibró con  $Na_2HPO_4$  0.025 M pH 6.5 y las proteínas fijadas a la resina fueron eluidas con NaCl 1.0 M.

## 5.2 Ensayos enzimáticos.

### 5.2.1 En solución.

La actividad enzimática para SOD se determinó por el método desarrollado por McCord y Fridovich, basado en la inhibición de la reducción del citocromo c (44). Brevemente, el ensayo comprende dos sistemas, uno generador del  $O_2^{\bullet}$  y otro que es un detector del mismo. El  $O_2^{\bullet}$  se genera cuando la enzima xantina oxidasa oxida a la xantina y cede el electrón a una molécula de  $O_2$ . Así el  $O_2^{\bullet}$  es capaz de reducir a su vez (ceder un electrón) al citocromo c, que en el ensayo funciona como la molécula detectora. En estado reducido el citocromo c tiene su valor máximo de excitación a una longitud de onda de 550 nm. La cantidad de xantina oxidasa que se adiciona debe ser la suficiente para obtener de 0.1 a 0.12 unidades de absorbancia en 2 minutos en el control negativo. Si SOD está presente en la mezcla de ensayo inhibe la reducción del citocromo c, es decir, si en las fracciones obtenidas durante los procesos de purificación existe SOD, los valores de absorbancia deberán de ser de cero o tendientes a él en 2 minutos. Una unidad de SOD se definió como la cantidad de la enzima que inhibe en un 50% la reducción del citocromo c y se cuantificó conforme al método descrito por Galleno *et al.* (45) (fig. 1). Prácticamente la técnica se desarrolla de la siguiente manera: El amortiguador de ensayo (AFE) contiene  $K_2HPO_4$  0.05 M y ácido etilen-diamino tetra-ácetico (EDTA) 0.0001 M, pH 7.8. A 3 ml de AFE se le adicionan 200  $\mu$ l de una solución de 0.0015 M de xantina (Sigma Chemical, St. Louis, MO. USA) en agua destilada y 200  $\mu$ l de una solución 0.00029 M de citocromo c (Sigma Chemical St. Louis, MO. USA) en agua destilada. A la mezcla anterior se adicionan los 200  $\mu$ l de la muestra a analizar o de AFE (control negativo), al control positivo se le incluyen 10 unidades de SOD de eritrocitos de bovino (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA)

contenidas en 200  $\mu$ l de AFE de tal manera que los tubos de muestras experimentales y controles contienen un volumen final de 3.6 ml cada uno. Las lecturas a 550 nm se realizaron 2 minutos después de adicionar la cantidad determinada de la enzima xantina oxidasa a la mezcla de ensayo.

### 5.2.2 Actividad enzimática en geles de enfoque isoeléctrico.

La actividad enzimática de SOD también se demostró al inhibir la reducción del Nitroazul de tetrazolio (NBT) por la técnica de Beauchamp y Fridovich (46) en geles de enfoque isoeléctrico descritos por Robertson *et al* (47) con las siguientes modificaciones: se prepararon geles de poliacrilamida al 10% conteniendo 2.5% de anfolitos (pH 3.5-10) (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) en una cámara Miniprotean III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Cal. U.S.A.). Las muestras para analizar se suspendieron en un volumen igual de glicerol al 66% conteniendo anfolitos a la misma proporción que en el gel. El amortiguador catódico fue hidróxido de sodio 20 mM y el anódico ácido fosfórico 10 mM. La electroforesis se realizó a 200 Volts durante 1.5 horas y 400 Volts la siguiente hora y media, a temperatura ambiente. Al finalizar la electroforesis los geles se incubaron por 20 minutos en una solución de NBT (Sigma Chemical, St. Louis, Mo. USA)  $2.45 \times 10^{-3}$  M y riboflavina (Sigma Chemical, St. Louis, Mo. USA)  $2.5 \times 10^{-5}$  M en la oscuridad a temperatura ambiente y en agitación lenta. Inmediatamente después la reacción enzimática se reveló sumergiendo el gel en una solución de N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamino (TEMED) al 1% en agua desionizada en presencia de luz directa, la reacción se paró lavando exhaustivamente los geles con agua destilada.

### 5.2.3 Ensayos de inhibición enzimática.

Los ensayos de inhibición enzimática se realizaron por duplicado con la fracción de mayor actividad enzimática obtenida del cromatoenfoco en PBE-94, ubicada en un pH de  $6.3 \pm 0.25$ .

#### 5.2.3.1 Inhibición por cianuro de potasio (KCN).

Las condiciones y reactivos de estos ensayos son los mismos empleados en solución más la adición de KCN como inhibidor. Se probaron concentraciones de 0.5, 1.0 y 10 mM por 2 minutos de incubación con aproximadamente 5 unidades de SOD de eritrocitos de bovino (Cu-ZnSOD) y 5 unidades de actividad para SOD de la fracción de pH  $6.3 \pm 0.25$  obtenida del cromatoenfoco en PBE-94.

#### 5.2.3.2 Inhibición por temperatura.

Seis diferentes alícuotas cada una con cinco unidades de actividad para SOD de la fracción de pH  $6.3 \pm 0.25$  PBE-94 se incubaron a  $100^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de incubación fue diferente para cada una de ellas, permaneciendo a esa temperatura 1 minuto o incrementándose minuto a minuto hasta 6. Otra muestra similar se mantuvo por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al término de cada periodo de incubación se realizó el ensayo enzimático. Muestras similares sin calentar se emplearon como controles positivos.

### 5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

Este sistema se empleó para analizar las diferentes fracciones de proteína obtenidas de los procedimientos cromatográficos de purificación de la enzima. Los PAGE-SDS se

realizaron siguiendo la técnica de Laemmli (48) con algunas modificaciones y en mini geles Protean III (Bio-Rad Laboratories U.S.A.): Las dimensiones de los mismos fueron de 11 cm x 8 cm x 0.5 mm, cada gel al 10% de concentración de acrilamida se formó con 1.65 ml de una solución concentrada de acrilamida- bisacrilamida (30% - 0.8%); 1.25 ml de tris-HCl 1.5 M pH 8.8; 1.7 ml de agua destilada y 100 µl de SDS al 10%, el gel se polimerizó con 33 µl de persulfato de amonio al 10% y 3.3 µl de TEMED. Cuando se prepararon geles al 12%, el volumen de la solución concentrada de acrilamida - bisacrilamida fue de 2.05 ml y el de agua destilada de 1.7 ml El gel concentrador de las proteínas se preparó al 7.5% de acrilamida con 0.4 ml de la solución concentrada de acrilamida - bisacrilamida; 0.75 ml. de tris 0.5 M, pH 6.8; 1.52 ml de agua destilada y 30 µl de SDS al 10%, el gel se polimerizó con 10 µl de persulfato de amonio al 10% y 1.5 µl de TEMED. El amortiguador de electroforesis empleado se formó con tris 0.002 M, glicina 0.15 M y 0.8% de SDS.

Aproximadamente 80 µg de proteína se depositaron por pozo del gel de cada una de las muestras proteicas que se analizaron, previamente las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 (v:v) con una solución amortiguadora de tris-HCl 0.05 M pH 6.8 que contenía 1% de SDS (p:v), EDTA 2 mM, 10% de glicerol, 2% de 2-β mercaptetanol (éste último si se requería reducir las proteínas a sus formas monoméricas) y azul de bromofenol, la mezcla se calentó a 100° C durante 2 minutos antes de colocarlas en el gel. Para separar las proteínas se suministró a la cámara de electroforesis una corriente eléctrica de 100 Volts (20 miliampers) con una fuente de poder Bio-Rad modelo 250/2.5 (Bio-Rad Laboratories USA.) durante 2.5 horas a temperatura ambiente. Al finalizar la electroforesis los geles se

tiñeron con Azul de Coomassie (metanol al 40 %, Azul de Coomassie R-250 0.025% y ácido acético 10%) durante 2 horas y se destiñeron con una solución al 10% de ácido acético y 10% de metanol.

Eventualmente, cuando la cantidad de proteína a separar por este sistema fue menos de 5 µg / pozo los geles se tiñeron con nitrato de plata como sigue: Las proteínas se fijaron con ácido tricloroacético al 20% durante una hora, luego de 5 lavados de 10 minutos cada uno con agua desionizada ultrapura, el gel se sumergió en una solución para teñir preparada en agua desionizada ultrapura que contenía 0.003% de NaOH 5.9 N, 0.015% de NH<sub>4</sub>OH 14 M y 5% de una solución de nitrato de plata 1 M. El gel fue lavado nuevamente como se mencionó anteriormente y se sumergió en la solución reveladora (0.0005% de formaldehído al 37.4% y citrato de sodio 0.17 M) durante el tiempo necesario hasta que aparecieran las bandas de proteína en el gel. La reacción de revelado se paró con metanol al 40% y ácido acético al 10%. Los geles se mantuvieron en esta última solución hasta secarlos.

#### 5.4 Cuantificación de proteínas.

Al extracto crudo y a todas las fracciones obtenidas de las diversas cromatografías se les determinó su concentración proteica mediante el método de Lowry (49). Se construyó una curva patrón con una solución stock de 1 mg/ml de albúmina sérica bovina en PBS. Se realizaron diluciones seriadas de este stock (1:2) en un volumen final de 1 ml de PBS. Por otro lado, de cada solución para analizar, su volumen elegido se aforó a 1 ml con PBS. A cada tubo de la curva y/o muestra se le agregaron 4 ml de solución de Lowry formada con el 98 % de una solución de carbonato de sodio anhidro al 2% en NaOH 0.1 N, 1 % de

tartrato de sodio y de potasio al 2% y el 1 % de sulfato cúprico al 1%. La mezcla se agitó y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Después a cada tubo se le agregaron 0.4 ml de reactivo de Folin diluido 1:2 con agua destilada, se agitó e incubó 30 minutos a TA. La absorbancia a una longitud de onda de 600 nm se registró en un espectrofotómetro Ultospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

#### 5.5 Producción de sueros.

A cuatro conejos de la raza New Zeland de 3 meses de edad se les tomó una muestra sanguínea de 3 ml y posteriormente se inmunizaron intramuscularmente cada uno con un solo inmunógeno. Cada uno recibió 2 estímulos antigénicos similares en total, separados por un intervalo de 15 días. La dosis de inmunógeno por estímulo fue de 300 µg de proteína en adyuvante completo de Freud (v:v). Los inmunógenos fueron: a) SOD de eritrocitos de bovino, b) mioglobina de músculo cardiaco de caballo, c) anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (Sigma Chemical, St. Louis MO. USA) y d) homogeneizado total de cisticercos de *T. solium*. veintiocho días después los conejos se sangraron, se separó el suero por centrifugación y se guardó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

#### 5.6. Inmunoelectrotransferencia. (IET).

Se realizó la técnica de IET siguiendo el método de Towbin y col. (50) La cantidad de proteína transferida a los geles de nitrocelulosa (NC) fue de 0.8 µg por mm lineal.

Al finalizar la IET la hoja de NC se marcó con una línea de referencia (LR) sobre el límite entre el gel concentrador y el gel separador y se cortó en tiras de 0.5 mm en sentido perpendicular a la LR.

#### 5.6.1 Revelado de las IET.

Los antígenos transferidos a la NC se revelaron por procedimientos inmunoenzimáticos. Se utilizó una tira de NC por suero a evaluar. En cajas Acutran con 8 canales se desarrollaron las incubaciones. En cada canal se depositó una tira, inmediatamente después se les adicionó 0.5 ml de suero de conejo normal o experimental diluido 1:100, 1:500, y 1:1000 en PBS Tween-20 más 5% de leche descremada (primer anticuerpo), excepto las muestras de las fracciones de mayor actividad obtenidas del cromatoenfoco PBE 94 las cuales fueron diluidas 1:25. Las tiras se incubaron por 1 hora, luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS Tween-20. Al término del ciclo de lavados las tiras se incubaron en 0.5 ml de un conjugado de suero de cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (segundo anticuerpo) (Zymed Laboratories. Inc. San Francisco., CA, EUA) diluido 1: 750 en solución de lavado en todos los ensayos. Una hora más tarde se realizó otro ciclo de lavados como se mencionó, adicionando 2 lavados más con PBS solo. El revelado de la reacción inmunológica se efectuó adicionando a cada tira 0.5 ml de diaminobenzidina (DAB) 50 mg/ml más 1.0  $\mu$ l/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % durante algunos minutos, hasta mostrar las bandas antigénicas en los experimentales y controles positivos y la ausencia de las mismas en las tiras controles negativos, incubadas con suero de conejo normal. La reacción se paró lavando las tiras con agua destilada. En todo momento las tiras

se mantuvieron en agitación lenta con movimiento de columpio a temperatura ambiente. Finalmente se secaron las tiras y se almacenaron protegidas de la luz.

#### 5.7 Secuencia de aminoácidos.

Una alícuota de 80  $\mu\text{g}$  de F-S elu y otra de aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de la fracción con mayor actividad enzimática para SOD obtenida del cromatograma PBE-94 se corrieron por electroforesis en PAGE al 12 %. Inmediatamente después las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, MA, USA) bajo las mismas condiciones de electrotransferencia descritas para membranas de NC. La membrana se tiñó con Azul de Commassie y a la banda revelada con un peso molecular de 16,000 daltons se le analizó su secuencia de aminoácidos mediante la técnica de Edman (51).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Purificación de la enzima.

#### 6.1.1 Parásitos.

Se obtuvieron cisticercos de diferentes cerdos infectados naturalmente, todos comprados en el estado de Morelos, México, desconociendo el sitio donde los animales se infectaron así como la duración de la infección.

#### 6.1.2 Homogeneizado.

Tanto el rendimiento, en términos de cantidad de proteína solubilizada como la diversidad de componentes presentes entre los homogeneizados fue parecida en los diferentes lotes de cisticercos (fig. 32 carriles B y C).

#### 6.1.3 Cromatografías secuenciales.

Se realizaron siempre en forma secuencial y en el siguiente orden: QAE-cellex, F-S y cromatoenfoco en PBE-94.

Las figuras 4-14 muestran los resultados de 11 cromatografías que se efectuaron en una columna de intercambio aniónico de QAE-cellex. Los valores de absorbancia a 280 nm de las fracciones que se colectaron indicaron que en el primer pico se encontraron las proteínas no adsorbidas a la resina. Los otros picos corresponden a aquellas proteínas eluidas por efecto del gradiente salino de NaCl.

Los valores de absorbancia a 550 nm definen a las muestras con actividad enzimática para SOD así, la enzima fue adsorbida por esta matriz. Este último trazo fue graficado en sentido inverso al de 280 nm debido al decremento de la absorbancia específica al inhibir SOD la reducción del citocromo c en el ensayo enzimático.

Las figuras 15-22 muestran los perfiles cromatográficos en F-S de las fracciones con actividad enzimática para SOD provenientes de las columnas de QAE-Cellex. En el primer pico de proteína de las gráficas se detectó la actividad para SOD, que al no haber sido retenida en este tipo de resina indicó que se trata de una proteína hidrosoluble. El segundo pico se obtuvo al eluir a las proteínas adsorbidas a los grupos fenilos de la resina con un amortiguador de fosfatos de 0.1 M. En esta región se pudo detectar también actividad enzimática para SOD aunque en una proporción mucho menor. En algunas cromatografías de F-S (figs. 19, 20, 21 y 22) se obtuvieron en las primeras fracciones altos valores de absorbancia debido a la turbidez dada probablemente por el contenido de lípidos ya que su contenido de proteína determinado por el método de Lowry fue insignificante.

La última cromatografía líquida efectuada en el proceso de purificación fue el cromatoenfoco en PBE-94 (figs. 23-31). Las muestras que se incluyeron correspondieron solo a las del primer pico de F-S con actividad enzimática para SOD. A 280 nm se pudo ver una gran fluctuación en la cantidad de proteína eludía a lo largo del cromatoenfoco, no obstante la escasa concentración de la misma a este nivel de purificación.

La actividad enzimática para SOD se detectó en un rango de pH de 5.7 a 6.7 con un pico de máxima actividad en las fracciones con  $\text{pH } 6.3 \pm 0.25$ .

#### 6.1 Cromatografía de filtración en Sephadex G-75-200.

La fig. 32 muestra que la actividad enzimática para SOD se ubica en la región donde eluyeron las proteínas de un peso molecular de alrededor de 30 KDa.

## 6.2 Cromatografía de afinidad a heparina.

La actividad enzimática para SOD se encontró en las proteínas que no mostraron afinidad a la heparina.

## 6.4 PAGE-SDS.

La electroforesis se utilizó exclusivamente para fines analíticos. En la fig. 33 se muestran diversas fracciones proteicas por duplicado, incluidas las del Sn-1 y las obtenidas de las cromatografías de QAE y de F-S, sucesivamente. Solo las muestras de la derecha de cada duplicado se redujeron con 2  $\beta$ -mercaptoetanol. En el carril A) pesos moleculares; B y C) Sn-1; D y E) proteínas que no se absorbieron a la resina de QAE; F y G) proteínas que si se adsorbieron a QAE con actividad enzimática para SOD y H e I) proteínas adsorbidas a la resina de QAE sin actividad para SOD. Simultaneamente para F-S los carriles J y K) muestran las proteínas no adsorbidas a la resina con actividad enzimática para SOD y el carril L) se refiere a las proteínas no reducidas con 2  $\beta$ -mercaptoetanol adsorbidas a los grupos fenilos.

En la fig. 34-B se muestra en PAGE-SDS la fracción con mayor actividad enzimática para SOD obtenida del cromatoenfoco en PBE-94 en condiciones no reducidas teñida con nitrato de plata con sus pesos moleculares (A). En la fig. 35 se muestra la misma fracción

en condiciones reducidas teñida con azul de Coomassie (B), los pesos moleculares usados como referencia (A) y SOD de eritrocitos de bovino como control (C).

#### 6.5 Secuencia de aminoácidos.

Se secuenció la banda de proteína con peso molecular de 15 a 16 KDa de F-S elu (fig. 33 carriles J y K). El resultado de este estudio mostró los aminoácidos GLSDGEWQLVLNVWG en la porción amino terminal. Al comparar esta secuencia con las reportadas en el banco de datos para proteínas Swiss-protein (Swiss Institute of Bioinformatics) resultó ser tener una alta homología con la mioglobina de mamíferos (Fig. 2).

También se secuenció la banda de proteína ubicada en la región de 15 KDa observada en la fracción de pH  $6.3 \pm 0.25$  con mayor actividad enzimática para SOD obtenida del cromatofoco en PBE-94 (fig 35, carril B), identificándose los siguientes aminoácidos: MKAVXVMRGEEGVKGVVHFTQ los cuales, al compararlos con las proteínas reportadas en el banco de datos nr (National Center for Biotechnology Information, U.S.A.) muestran una homología del 76% con la Cu-Zn SOD citosólica de *S. mansoni* (fig. 3).

#### 6.6 Unidades de actividad enzimática.

El cuadro 1 muestra el resumen de la purificación de SOD. Se observa que la enzima se logró purificar 2,071 veces a partir del extracto crudo, obteniendo 2,900 U/mg. de actividad específica mediante el procedimiento descrito.

#### 6.7 Ensayos de especificidad.

Se ha reportado que la mioglobina es capaz de inhibir la reducción del citocromo c (52). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la banda de 15 KDa de la fracción de F-S con actividad enzimática para SOD reveló mioglobina. Sin embargo no se detectó actividad similar a SOD en ensayos en solución con mioglobina liofilizada de corazón de caballo, pero si en el ensayo basado en la reducción del NBT en geles de enfoque isoeléctrico. La banda acromática de actividad enzimática ubicada en el punto isoeléctrico (pI) de 6.3 que aparece solo en las fracciones con actividad obtenidas de F-S y QAE-cellex (fig. 36). probablemente corresponde a la SOD citosólica identificada en el presente trabajo

#### 6.8 Ensayos de inhibición enzimática.

Cuando la fracción con mayor actividad enzimática para SOD obtenida del cromatoenfoco en PBE 94 se incubó con KCN la inhibición disminuyó, al igual que con SOD de eritrocitos de bovino, conforme a la concentración de KCN, de tal manera que cuando la SOD de eritrocitos de bovino, que contiene Cu-Zn en su sitio activo, se inhibió totalmente, la fracción de mayor actividad para SOD (pH  $6.3 \pm 0.25$ ) obtenida del cromatoenfoco en PBE-94 se inhibió un 80% (Cuadro 2) y cuando una muestra similar se calentó a 100° C durante 4 minutos perdió completamente su actividad. Esta misma fracción al incubarse a 37° C durante 30 minutos no perdió su actividad enzimática.

#### 6.9 IET.

##### 6.9.1 Fracción con actividad obtenida de QAE-cellex.

La figura 37 muestra el resultado de la IET una fracción de QAE-Cellex con actividad enzimática para SOD revelada con: a) suero de conejo normal; b) suero de conejo anti SOD de eritrocitos de bovino y c) suero de conejo anti mioglobina de corazón de caballo (diluidos 1:1000). En la tira b se observan las bandas antígeno-anticuerpo en diferentes pesos moleculares, incluida la de 15 KDa.

#### 6.9.2 Fracción con mayor actividad obtenida de F-S

La fig. 38 presenta el resultado de la reacción antígeno-anticuerpo entre la fracción con mayor actividad para SOD obtenida de F-S transferida a una membrana de NC a partir de PAGE-SDS en condiciones reducidas y diversos anticuerpos de conejo utilizados a 3 diluciones diferentes. Las tiras A-C no presentaron ninguna reacción frente al suero de conejo normal. Los anticuerpos heterólogos contra SOD de eritrocitos de bovino (D-F) y los anticuerpos contra mioglobina de corazón de caballo (G-I) reaccionaron en la región de 15-16 KDa con una ligera diferencia en la movilidad electroforética en este rango. El suero anti homogeneizado total de cisticercos de *T. solium* (J-L) reaccionó con diversas bandas pero destacó la misma banda mostrada por los otros 2 anticuerpos. El efecto de la dilución del suero en la reacción inmunoenzimática fue claramente demostrado en todos los anticuerpos que fueron positivos.

La fig. 39 muestra la misma F-S elu transferida a NC a partir de PAGE-SDS en condiciones no reducidas, es posible apreciar una banda de actividad antígeno-anticuerpo en la región de 30 KDa, además de la banda ubicada en la región de 15 KDa.

#### 6.9.3 Fracción con mayor actividad obtenida del cromatofoco en PBE-94

La figura 40 muestra el resultado de la reacción antígeno-anticuerpo entre la fracción de pH  $6.3 \pm 0.25$  obtenida del cromatoenfoco en PBE-94 y diversos anticuerpos de conejo diluidos 1:25. El suero de conejo normal, no obstante su baja dilución, no mostró ninguna banda reactiva (a). Anticuerpos contra SOD de eritrocitos de bovino presentaron la misma reacción en la región 15 kDa (b) que la obtenida en F-S elu y en la fracción de mayor actividad obtenida de QAE-cellex. Contrariamente, anticuerpos contra mioglobina de corazón de caballo no produjeron ningún reconocimiento inmune en esta fracción (c).

#### 6.9.4 Diversas fracciones obtenidas del cromatoenfoco en PBE-94.

La fig. 41 muestra el resultado de la reacción antígeno-anticuerpo en diversas fracciones obtenidas del cromatoenfoco en PBE-94 y los mismos anticuerpos de conejo empleados en las IET anteriores. La fracción con un pH 6.40 a 6.50 solo fue positiva frente anticuerpos contra SOD de eritrocitos de bovino (A3), la fracción con un pH de 6.60 a 6.70 fue negativa para todos los anticuerpos (B1-3), la fracción con un pH de 6.75 a 6.85 y la fracción 6.90 a 7.0 fueron positivas solo para anticuerpos heterólogos contra mioglobina de corazón de caballo (C y D).

## 7. DISCUSIÓN

El concepto de evasión inmune fue descrito a finales del siglo 19 por Paul Ehrlich al demostrar la variación antigénica en tripanosomiasis africana. En los años 60's se reforzó esta idea con la observación de que los parásitos sobreviven en huéspedes inmunologicamente competentes, gracias en parte a que presentan antígenos de reacción cruzada con sus huéspedes (53). También se pensó que otras consecuencias por compartir antígenos entre parásitos y huéspedes son la susceptibilidad de este último a la infección (54) y el desarrollo del polimorfismo antigénico (55,56). Las investigaciones sobre la evasión inmune parasitaria posteriores a las mencionadas han crecido, abarcando ejemplos como la inducción de células supresoras (57,58), proteasas parasitarias (59), enzimas que inactivan mediadores químicos de la hipersensibilidad inmediata (60), inhibidores de proteasas del huésped (61,62), inhibición del complemento (63) y enzimas antioxidantes (21). Estas últimas son capaces de inactivar a diversas especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas durante la "explosión respiratoria" al activarse las células de la respuesta inflamatoria por la presencia de agentes extraños como son los parásitos.

Las formas oncosferales de *T. solium* son las que originan a los cisticercos, para que esto suceda ellas tendrán que establecer contacto con los componentes inmunes del huésped y salir libradas de su efecto. En la boca del huésped hay principalmente proteasas e inmunoglobulinas de la clase IgA secretora e IgG exudada de suero. Por las dimensiones del parásito es poco probable que los anticuerpos de esta área puedan neutralizarlos y quizá la concentración de proteasas sea insuficiente para actuar eficientemente. En el estómago la acidez que presenta este medio es útil para romper los tabiques que forman la cubierta oncosferal, pero no se sabe si también pudiera ser un impedimento para el establecimiento

de la infección, sobre todo en aquellas oncosferas sin membranas. No es sino hasta que se encuentra el huevo de *T. solium* libre de sus cubiertas (embrión hexacanto) e inmediatamente por detrás del epitelio intestinal; donde existe una concentración de células fagocíticas importante cuando el parásito, por su condición "desnuda" estaría en un punto crítico para su sobrevivencia (63). Estas células fagocíticas durante la "explosión respiratoria" producen, a partir de la reducción del oxígeno y la formación del anión superóxido, una serie de especies reactivas químicamente inestables. Como ejemplos de productos primarios derivados de esta reacción se encuentran los peróxidos de hidrógeno y el ión hidroxilo, los secundarios, los peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos y los terciarios los carbonilos. Todos estos productos son tóxicos para las membranas lipídicas celulares, proteínas y ácidos nucleicos.

En este trabajo se purificó una proteína con actividad enzimática para SOD a partir de cisticercos de *T. solium* mediante cromatografías líquidas de intercambio aniónico, hidrofobicidad y cromatofoco en PBE-94 (SOD *T. s.*). En las figuras (figs. 4-14) se observa la reproducibilidad obtenida en las cromatografías de intercambio aniónico, en este tipo de cromatografía los valores de absorbancia a 280 nm definieron una primera curva característica de las proteínas que no se absorbieron a los grupos amino cuaternarios cargados positivamente, la siguiente curva se formó con las proteínas cargadas negativamente que se desprendieron de la resina por efecto de la creciente concentración de cloruro de sodio que se hizo pasar por la columna, además de una tercera curva pequeña muy probablemente de proteínas con cargas muy negativas. Valores de absorbancia a 550 nm permitieron situar a la enzima en las proteínas que se absorben a la QAE-cellex en la parte ascendente de la curva de proteína leída a 280 nm. En las cromatografías de

hidrofóbicidad en F-S (figs. 15-22) el comportamiento de las proteínas tuvo fluctuaciones irregulares a 280 nm. Probablemente este comportamiento se debió a una agregación de las proteínas desde el inicio de la cromatografía ya que la muestra proteica a separar se encuentra en la concentración de mayor molaridad de fosfatos que se emplea en esta columna. No obstante esta diversidad de curvas a 280 nm, la mayor actividad de la enzima se obtuvo en todas las ocasiones en el primer pico que corresponde a las proteínas hidrofílicas, es decir, debido al carácter hidrofílico, la SOD de *T. s.* nunca interactuó con los grupos fenilos de la resina, sin embargo en las gráficas de estas cromatografías siempre se detectó una pequeña actividad enzimática en las proteínas hidrofóbicas, sugiriendo la posibilidad de alguna forma isomérica u otro miembro de la familia de SOD, como la EC-SOD la cual se ha reportado es hidrofóbica en mamíferos (37) y en *S. mansoni* (40) o bien que alguna parte de la enzima purificada en el presente trabajo haya quedado atrapada en las proteínas hidrofóbicas agregadas en la resina y se eluyó junto con estas. El análisis por PAGE-SDS en condiciones desnaturalizantes de las fracciones obtenidas de las cromatografías de QAE-cellex y F-S mostraron una banda de 15 a 16 KDa en aquellas muestras con actividad específica para SOD (fig. 32; F, G y J, K). Por coincidir este peso molecular con la forma monomérica de la SOD citosólica reportada en la literatura se secuenció una muestra proveniente de la columna de F-S y el resultado de este estudio indicó la presencia de mioglobina. El uso de anticuerpos heteroespecíficos contra SOD y contra mioglobina, los cuales no muestran reacción cruzada entre sí, permitió demostrar que estas proteínas co-migran en la región de 15-16 KDa en la cromatografía F-S (fig. 37).

El procedimiento de cromatografía permitió separar, en función de su punto isoeléctrico, la mioglobina de la fracción con mayor actividad enzimática para SOD

obtenida de F-S. En todas las cromatografías de este tipo se obtuvieron los mismos resultados (figs 23-31). Mediante PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie se observa una sola banda en condiciones reducidas con un peso molecular de 15 KDa (fig. 35-B), este peso molecular se ubica en el rango de 15 a 18 KDa dentro del cual se han descrito la mayoría de las formas monoméricas de Cu-Zn SOD citosólicas, incluidas las de algunos parásitos (64,65).

Los ensayos de inhibición sugieren que SOD *T. s.* posee cobre y zinc en su sitio activo, ya que su actividad se inhibe un 80% cuando se incuba durante 2 minutos en 10 mM de KCN,

bovino con la SOD de procariontes varía entre 27% (*E. coli*) y 37% (*P. leiognathi*) (32). En estos aminoácidos conservados podría encontrarse el epítoto responsable de la reacción cruzada observada entre SOD de eritrocitos de bovino con algunas especies de bacterias como *M. hyopneumoniae* (32), sin embargo, no se ha observado reacción cruzada de SOD de eritrocitos de bovino con SOD de algunos helmintos como *T. spiralis* (65). La reacción cruzada observada entre SOD de eritrocitos de bovino y SOD *T. s.* en el presente trabajo sugieren que el epítoto de reconocimiento podría estar en los aminoácidos ubicados cerca del sitio activo, sin embargo, es necesario el conocimiento de la secuencia completa de aminoácidos de SOD *T. s.* para explicar esta reacción cruzada.

Puesto que se ha demostrado la capacidad de los cisticercos para adquirir proteínas del huésped, se consideró la posibilidad de que las larvas adquirieran la enzima SOD del huésped de la misma manera, sin embargo, el pI reportado para la SOD de cerdo es de 5.8 (66), diferente al encontrado mediante el mismo procedimiento de cromatofoco en SOD *T. s.* obtenida en el presente trabajo, por lo que se descarta la posibilidad de que la enzima purificada sea de cerdo.

Se han descrito tres formas de SOD codificadas por distinto gen: la MnSOD y FeSOD son codificadas por un mismo gen, la Cu-ZnSOD citosólica y la Cu-ZnSOD extracelular glicosilada son codificadas por genes distintos. La sensibilidad mostrada al KCN, así como la masa molecular tanto en su forma nativa, determinada mediante cromatografía de filtración, como el monómero determinado por PAGE-SDS, indican que probablemente se trata de una Cu-ZnSOD citosólica ya que la masa molecular del monómero de la SOD extracelular (la cual posee Cu-Zn en su sitio activo) de mamíferos es de 30 KDa (37) y la encontrada en *S. mansoni* es de 20 KDa (40). Sin embargo, a pesar de que no fue posible

identificar una forma glicosilada de SOD mediante cromatografía de afinidad en heparina, no es posible descartar la presencia de una forma extracelular de SOD en *T. solium* ya que W. Leid (36) encontró actividad enzimática tanto en el líquido vesicular que rodea al parásito como en el medio de cultivo de *T. taeniaeformis*.

Por otro lado, aunque no se exploró la posibilidad de identificar MnSOD o FeSOD, es posible que alguna de ellas este presente, ya que solo se logró inhibir un 80% la actividad enzimática cuando se incubó con KCN, y es posible que el 20% de la actividad residual presente sea atribuible a una de estas formas de SOD, las cuales no son sensibles al KCN.

Mioglobina es una proteína cuya función es transportar oxígeno en la célula muscular. Su estructura se describe como una proteína soluble en agua, con los grupos R hidrofílicos de sus aminoácidos orientados hacia el exterior. No se ha informado la presencia de mioglobina en céstodos, en nemátodos existen varias formas entre las que se incluye una monomérica con un peso molecular de entre 14-17 KDa, con funciones similares a la mioglobina de vertebrados (71). En el presente trabajo, a partir de 2 lotes diferentes de cisticercos de *T. solium* de cerdos se logró identificar en la fracción hidrofílica de F-S la presencia de mioglobina. Inclusive se lograron secuenciar 15 aminoácidos a partir del amino terminal de la proteína ubicada en la banda de 15-16 KDa. Por IET empleando suero de conejo anti-mioglobina de corazón de caballo se reforzó la existencia de esta proteína en los cisticercos, es probable que el cisticerco la adquiriera a partir del huésped ya que se ha demostrado la presencia de globulinas e IgG del huésped en el fluido vesicular de cisticercos de *T. solium* (54) pero no habría que descartar que se trata de la mioglobina del céstodo. Por otro lado, mioglobina es capaz, al igual que SOD, de inhibir la reducción de citocromo c y aunque no se investigó la capacidad que tiene para lograr este efecto en los

ensayos en solución basados en la inhibición de la reducción del citocromo c, si se demostró la inhibición de la reducción del NBT empleando mioglobina liofilizada de corazón de caballo en ensayos en geles nativos. (fig. 34).

Estudios histopatológicos de tejido musculoesquelético de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* han demostrado la presencia de una respuesta inflamatoria alrededor del parásito con infiltración de macrófagos y eosinófilos (72,73), sin embargo, el daño inducido a las larvas por las sustancias tóxicas, como las derivadas de la reducción parcial del oxígeno secretadas por estas células es prácticamente nulo o inaparente, siendo que estudios *in vitro* han demostrado que estas sustancias son tóxicas en larvas de *S. mansoni*. En el presente trabajo se demostró la presencia de la enzima SOD en cisticercos de *T. solium*, estudios posteriores deberán enfocarse a identificar si esta enzima ejerce un papel inmunoprotector contra el daño oxidativo derivado del anión superóxido secretado por las células fagocíticas como se ha demostrado en algunas bacterias y helmintos.

## 8. LITERATURA CITADA

1. White, A.C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clinical Infectious Diseases*. 1997; 24: 101-113.
2. De La Fuente, J. A., Sepúlveda, A. J. Diez problemas relevantes de salud pública en México. México, D. F. Fondo de Cultura Económica. 1999.
3. Dixon, H. B. F. Lipscomb, F. M. Cysticercosis: and analysis and follow up 450 cases. *Privy Council Med. Res.* 1961; 299: 1-58.
4. Medina, M. T., Rosas, E., Rubio-Donnadieu, F. & Sotelo, J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in México. *Archives of Internal Med.* 1990; 150: 325-327.
5. Sotelo, J., Del Brutto, O. & Roman, G. Cisticercosis. In Remington, J. and Swartz, M. Eds. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. Boston. Blackwell Sci. 1996.
6. Alarcón, T. Cisticercosis del Sistema Nervioso. Guayaquil, Ecuador. Abad Cía. Ltd. 1999.
7. Mahajan, R. C. Geographical distribution of human cisticercosis. In Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P. Larralde, C., Ridaura, C. and Beltran, F. eds. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. New York. New York Academic Press. 1982: 39-48.
8. Simanjuntak, D. N., Mangono, S. S., Okamoto, M., Ito, A. Teniosis/Cisticercosis in Indonesia as an Emergin Disease. *Parasitol. Today*. 1997; 13(9): 321-323.
9. Aarata, A. A., Hopkins, D. R., Ruiz-Tiben, E. Pawlowski, Z. S. International Task Force for Disease Eradication. *J. A. M. A.* 1992; 268: 1841.
10. Lightowlers, M. W., Flisser, A., Gauci, C. G., Heath, D. D., Tensen, O., Rolfe, R. Vaccination against Cysticercosis and Hydatid disease. *Parasitol. Today*. 2000; 16: 191-196.
11. Molinari, J. L., Meza, R., Suarez, B., Palacios, S., Tato, P. Immunity in hogs to the Cysticercosis. *Exp. Parasitol.* 1983; 55: 340-357.
12. Lightowlers, M. W. Eradication of *Taenia solium* Cysticercosis: a role for vaccination of pig. *Parasitol. Today*. 1999; 29: 811-817.
13. Lanzer, M., Gross, U. and Moll, H. Mechanisms of parasite persistence and immune evasion. *Parasitol. Today* 1997; 13: 1-3.
14. Wesley, K., Tamashiro M. R. and Alan L. Scott. Proteolytic cleavage of IgG and other protein sustrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes. *J. Parasitol.* 1987; 73: 149-154.
15. Leid, W., Suquet, C. M. and Tanigoshi, L. Parasite defense mechanisms for evasion of host attack. A review. *Vet. Parasitol.* 1987; 25: 147-162.
16. Leid, W., R., Grant, R. F. and Suquet, C. M. Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a *Taenia taeniformis* proteinase inhibitor, teniaestatin. *Parasite immunol.* 1987; 9: 195-204.
17. Lacette, J. P., Landa, A., Arcos, L. Willms, K., Davis, A and Shoemaker, C. B. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 44: 287-296.
18. Arechavaleta, F. Molinari, J. L. and Tato, P. A *taenia solium* metacestode factor nonespecific inhibits cytokine production. *Parasitol. Res.* 1998; 84: 117-122.

19. Sher, A., Hall, B.F., y Vadas, A. Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med. 1978. 148: 46-57.
20. Maizels, R. M., Don A. P. Bundy, Murray, E. S., Smith, D. F. and Anderson, R. M. immunological modulation and evasion by helminth parasites in human population. Nature. 1993; 365: 797-805.
21. Callahan, H. L. Crouch, R. K. and James, E. R. Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanisms against host oxidants? Parasitol. Today. 1988; 4: 218-225.
22. Stites P., D., ETR I., Abba y Fudemberg H. Inmunología Básica y Clínica. 7° ed. México, D. F. El Manual Moderno. 1993.
23. Josephy, P. D. Mannervik, B. and Ortiz. de M., P. superoxide and superoxide dismutase. In: Molecular Toxicology. New York. Oxford University Press 1997: 54-80.
24. Clark, A., R. The human neutrophil respiratory burst oxidase. J. Inf. Dis. 1990; 161: 1140-1147.
25. Rosen, G. M., Sovitj, P., Ramos, C. L., Myron S. C. and Bradley E. B. Free radicals and phagocytic cells. FASEB J. 1995; 9: 200-209.
26. DoCampo, R. antioxidant mechanisms. In: Joseph Marrow, J. and Miklos Müller eds. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. New York. New York Academic Press. 1995: 147-160.
27. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual Rev. Biochem. 1995; 64: 97-112.
28. McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am. J. of Med. 2000; 108: 652-659.
29. Flint, D. H., Tuminello, J. F. and Emptage, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing Hydro-lyases by radical superoxide. J. Biol. Chem. 1993; 268: 22369-22376.
30. Vibanco P., N. La enzima Glutación S-Transferasa de *Taenia solium*, su caracterización y evaluación en protección (tesis doctoral) México, D. F. México: Facultad de Medicina. UNAM. 2000
31. LoVerde, P. T. Do antioxidants play a role in Schistosome host-parasite interactions? Parasitol. Today. 1998; 14: 284-289.
32. Jia-Ron C., Chung-Nan W., Tin-Yun H., Ivan-Chen C. and Shioh-Suey L. identification of the copper-zinc superoxide dismutase activity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 2000; 73: 301-310.
33. Benov L., T. and Fridovich, I. *Escherichia coli* expresses a copper and zinc-containing superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 1994; 269: 25310-25314
34. Beck B. L., Tabatabai, L., B. and Mayfield, E. A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu-Zn superoxide dismutase. Biochemistry 1991; 29: 372-376.
35. Céline B. B., Deloron, P., Viscogliosi, E., Delgado, P., Camus, D. And Dive, D. Cloning and characterization of iron-containing superoxide dismutase from the human malaria species *Plasmodium ovale*, *P. malariae* and *P. vivax*. Parasitol. Res. 1999; 85: 1018-1024.
36. Leid, W., Suquet, C. M. A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. Mol. Biochem. Parasitol. 1986; 8: 301-311.

37. MacKlud L., S. Human Coper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc. Ncl. Acad. Sc. USA. 1982; 19: 7634-7638.
38. Oury, T. D., Crapo, D., Valnicková, Ž. and Enghild, J. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimmers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. Biochem J. 1996; 317: 51-57.
39. Beaman, B. L., Scates, S. M., Moring, S. E., Deem, R. and Misra, H. P. Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. J. Biol. Chem. 1983; 258: 91-96.
40. Zhi Hong, Kosman, D. J. Thakur, A., Rekosh, D. and LoVerde, P. T. Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. Inf. Immun. 1992; 60:3641-3651.
41. Zhi Hong, LoVerde, P. T., Thakur, A., Hammarskjöld, M.L. and Rekosh, D. *Schistosoma mansoni*: A Cu/Zn superoxide dismutase is glycosilade when expressed in mammalians cells and localizes to a subtegumental region in adult schistosomes. Exp. Parasitol. 1993; 76: 101-114.
42. James, E. R., McLean, D. C. and Perler, F. Molecular cloning of an *Onchocerca volvulus* extracellular Cu-Zn superoxide dismutase. Inf. Immun. 1994; 62: 713-716.
43. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases and related matters. J. Biol. Chem. 1997; 272: 18515-18517.
44. McCord, J. and Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 1969; 244: 6049-6055.
45. Galleano, M., Alvarez, S., Malanga, G. Oxigen radicals in biochemistry, biophysics and medicine. International training course. 1994 March 7-18; Buenos Aires, Argentina, International Cell Research Organization 1994: 25-28.
46. Bauchamp, C. O. and Fridovich, I. Speroxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrilamide gels. Anal. Biochem. 1971; 44: 276-287.
47. Robertson E. F., Dannelly H. K., Malloy P. J., Reeves H. C. Rapid isoelectric focusing in vertical polyacrilamide minigel system. Anal. Biochem 1987. 167: 290-294
48. Lammelli , V. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
49. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
50. Towbin, H., Gordon, J. Immunoblotting and Immunobinding. Current status and outlook. J. Immunol. Methods. 1984; 72: 313-340.
51. Edman, P., Begg, G. A. Protein Sequenator. Eur. J. Biochem. 1967; 1: 80-91.
52. McCord, J. and Fridovich, I. The Reduction of Citochrome c by Milk Xanthine Oxidase. J. Biol. Chem. 1968; 243: 5763-5760.
53. Sprent, J.F.A. Evolutionary aspects of immunity in zooparasitic infections. In "Immunity to Parasitic Animals"( G.J. Jackson, R. Herman, y I. Singer, eds.). Appleton-Century-Crofts, New York. 1969. 1: 3-62.
54. Jenkin, C.R. Heterophile antigens and their significance in the host-parasite relationship. Adv. Immunol. 1963. 3: 351-376.

55. Damian, R. A theory of immunoselection for eclipsed antigens of parasites and its implications for the problem of antigenic polymorphisms in man. *J. Parasitol.* 1962. 48: 16.
56. Damian, R. Molecular mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Nat.* 1964. 98: 129-149.
57. Cohen, S. In: Porter, R. y Knight, J., ed. *Parasites in the immunized host: mechanisms of survival*, Blackwell Scientific Publications. London. 1974.
58. Agabain, N., Goodman, H. y Nogueira, N. *Molecular Strategies of Parasite Invasion*. UCLA. Symposia on molecular and cellular Biology. New Series Vol. 42 Alan R. Liss, Inc. New York, 1987.
59. Chapman, C.B. y Mitchell, G. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes release by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1983. 11: 165-178.
60. Hajdu, E., Matskasi, I., y Juhasz, S. *Fasciola hepatica*: Studies on protease inhibitor activity. *Parasitol. Hungarica.* 1979. 12: 21-30.
61. Santoro, F., Bernal, J., y Capron, A. Complement activation by parasites. A review. *Acta Trop.* 1979. 36: 5-14.
62. Williams, J.F. Recent advances in the immunology of cestode infections. *J. Parasitol.* 1979. 65: 337-349.
63. Musoke, A. J., y Williams, J.F. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. V. Sequence of appearance of protective immunoglobulins and the mechanism of 7S $\lambda$ 2a antibodies. *Immunology.* 1975. 29: 855-866.
64. Piacenza, I., R. Radi, F. Gofñi and C. Carmona. CuZn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 1998; 117: 555-562.
65. Rhoads, M. L., *Trichinella spiralis*: Identification and purification of superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* 1983; 56: 41-54.
66. Marmochi, F., Argase, E., Rigo, A., Mavelli, I. and Rotilio, G. A comparative study of bovine, porcine and yeast superoxide dismutases. *Mol. Cell. Biochem.* 1983; 51: 161-164.
67. Sanchez-Moreno, M., Monteoliva, M., Fatuo, A. and García-Ruiz, M. A. Superoxide dismutase from *Ascaris suum*. *Parasitology* 1988; 97: 345-353.
68. Callahan, H. L., Crouch, R. K. and James, E. R. *Dirofilaria immitis* superoxide dismutase: Purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 49: 245-251.
69. Hadas, E., Stankewicz, M. superoxide dismutase and total antioxidant status of larvae and adults of *Trichistrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 1998; 10: 121-124.
70. Paul J. M. and Barrett, J. Peroxide metabolism in the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. *Int. J. Parasitol.* 1980; 10: 121-124.
71. Blaxter, M. L. Nemo-globins: Divergent nematode globins. *Parasitol. Today* 1993; 9: 253-260.
72. De Aluja, A. S., Martínez M., J.J., Villalobos, A. N. M. *Taenia solium* cisticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. *Vet. Parasitol.* 1998; 76: 71-79.

73. Willms, K., Merchant, M.T. Díaz, S., Arcos, L. Host-Parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. In: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridauro, C and Beltrán, F. Eds.. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York. New York Academic Press. 1982: 397-411.