



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

"CLONACION Y CARACTERIZACION DE UN cDNA
QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA GLICERALDEHIDO
3-FOSFATO DESHIDROGENASA DEL METACESTODU
DE *Tecoma solium*".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ALEJANDRO CASTELLANOS GONZALEZ.



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTOR DE TESIS:
ABRAHAM LANDA PIEDRA

FACULTAD DE CIENCIAS
MEXICO, D.F. SEPT. 2000

2000

28 1434



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
AUTÓNOMO DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"CLONACION Y CARACTERIZACION DE UN cDNA QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA
GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA DEL METACESTODO DE Taenia solium"

realizado por CASTELLANOS GONZALEZ ALEJANDRO

Con número de cuenta 9032109-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis DR. Abraham Lada Piedra
Propietario

Propietario DR. Víctor Manuel Valdés López

Propietario DR. Luis Felipe Jiménez García

Suplente M.I.B.B. Laura del Carmen Vargas Parada

Suplente DR. Guillermo Salgado Maldonado

FACULTAD DE CIENCIAS

Edna Ma. Suárez D.
Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. Edna Ma. Suárez Díaz
Coordinadora de Licenciatura

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. Esta tesis fue apoyada por DGAPA PAPIIT: IN 218198.

DEDICATORIA

Con todo el amor y cariño a la memoria de mi Papá
Profesor Constantino Castellanos Velasco.

Por que tus consejos siempre estuvieron llenos de amor y sabiduría.
Por que en los momentos difíciles con tu ejemplo me enseñaste a tener
carácter y valor para dar ese segundo esfuerzo que pocos pueden dar en
este juego de la vida.

Por su amor incondicional a mi Mamá, María del Socorro González. A mis
hermanos: Mario, Diana, Vianey y Jazmín. A mis sobrinos: Pedro, Yasmín G.
y Alexandra.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Dr. Abraham Landa Piedra, por ser un buen amigo y un excelente tutor en este difícil pero apasionante negocio.

A la Biol. Lucia Jiménez por su valiosa colaboración en la realización de esta Tesis.

Agradezco la revisión esta tesis a los Doctores: Víctor Manuel Valdés López, Luis Felipe Jiménez García, Guillermo Salgado Maldonado y a la M.I.B.B. Laura del Carmen Vargas Parada, cuyos comentarios y sugerencias ayudaron a la presentación del trabajo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Ana Lilia, Alicia, Diana Cuahutemoc, Norberto y Tanya, por las enseñanzas y los momentos gratos compartidos.

A la Lic. Laura Amilpa Olivera por su cariño y su comprensión.

Al Lic. Luis Antonio Gamiochipi González, por ser mi gran amigo incondicional.

Por los buenos tiempos a mis compañeros de carrera: Emilio Galván, Baldo, Pancho, Xavier, Josué (Pato), al Carlí, a Lenin, al Juanito (†), a los Rayas, y al Dr. Gen.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Morfología y ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	1
2. Importancia de la cisticercosis	2
3. Diagnóstico	3
4. Tratamiento	7
5. Control	7
6. Vacunación	8
II. ANTECEDENTES GAPDH	10
1. GAPDH	10
2. GAPDH otras funciones	11
3. GAPDH vacunación	11
III. OBJETIVO	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. MATERIALES	15
a) Reactivos	15
b) Biológicos	15

c) Síntesis de oligonucleótidos	15
2. MÉTODOS	15
a) Electroforesis y Purificación de fragmentos de DNA	15
c) Marcaje Radiactivo	16
d) Titulación, selección y aislamiento de clonas (tamizaje)	16
e) Obtención de DNA de las clonas seleccionadas	17
f) Preparación de DNA a partir de fagos	18
g) Digestión con endonucleasas de restricción	19
h) Secuenciación	19
V. RESULTADOS	21
VI. DISCUSIÓN	31
VII. ANEXO	38
VIII. BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE ABREVIATURAS

~	Aproximadamente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
ATP	Adenosin trifosfato
SM	Amortiguador para preservar bacteriofágos
TAE	Amortiguador de tris-acetato de sodio
TE	Amortiguador de tris-EDTA
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
Kg.	Kilogramos
hrs.	Horas
M	Molar
mg.	Miligramos
mM.	MiliMolar
min.	Minutos
µg.	Microgramos
µl.	Microlitros
NADPH	Nicotin adenin dinucleotido fostato.
ng.	Nanogramos
pb	Pares de bases
pH	Potencial de iones hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
seg.	Segundos
SCC	Solución de Citratos Salina
U	Unidades
1X	Una vez

RESUMEN

La cisticercosis humana es causada por el establecimiento de las formas larvales de *T. solium* en diversos órganos del humano. La neurocisticercosis es el padecimiento mas grave ocasionado por esta enfermedad y constituye un importante problema de salud pública en países del tercer mundo incluido México. Una de las estrategias más viables que se han planteado para resolver este problema es el desarrollo de una vacuna. Actualmente el desarrollo de vacunas y fármacos específicos contra parásitos están siendo enfocados al estudio de moléculas que realizan funciones importantes como la enzima glucolítica Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En el presente trabajo, se ha logrado, clonar y secuenciar un cDNA que codifica para la GAPDH de *T. solium* a partir de una biblioteca de cDNA construida en λ gt10. El cDNA codificó para una proteína de 335 aminoácidos con un peso de 37, 391 KDa.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Morfología y Ciclo de Vida de *Taenia solium*.

La *T. solium* (Lineaeus, 1758) es un organismo parásito de cuerpo aplanado y alargado que llega a medir entre 2 y 7 m de longitud. El cuerpo de la *Tenia* puede dividirse en tres regiones: (1) el escólex situado en el extremo anterior del cuerpo, el cual es piriforme, mide de 1 a 2 mm, se caracteriza por presentar un rostelo con doble hilera de ganchos y cuatro ventosas musculares como órganos de fijación. (2) La región del cuello, situada inmediatamente detrás del escólex, es un área no segmentada y poco diferenciada, más estrecha que el escólex y que el estróbilo propiamente dicho; es la zona que origina los proglótidos, o segmentos del cuerpo de estos gusanos (3). El estróbilo que constituye la mayor parte del cuerpo, y esta formado por una cadena de proglótidos (800 a 100) (Malagón, 1990). Los proglótidos situados son por lo general inmaduros; es decir aunque el aparato reproductor es visible no es funcional, los proglótidos posteriores a los inmaduros son ya sexualmente maduros, exhiben órganos sexuales masculinos y femeninos, mientras que los que se localizan más alejados del cuello están grávidos, esto es, llenos de huevos y sólo muestran un útero ramificado tubular; cada uno de los segmentos grávidos pueden contener hasta 50,000 huevos (Cheng, 1986). Estos organismos son hermafroditas y el tipo de reproducción es sexual con fecundación interna. Los huevos de *T. solium* miden de 30 a 40 nm, de diámetro y están contenidos en una delgada membrana hialina, que rodea una gruesa pared estriada, el embrióforo, que a su vez contiene a la oncosfera. El gusano adulto se ubica en el intestino delgado, en la porción superior del yeyuno, adherido y fijado por ganchos y ventosas al epitelio. Su alimento lo constituye el contenido intestinal del huésped. Por carecer de aparato digestivo, la captación y digestión del alimento se lleva a cabo en el sincicio celular del tegumento, el cual absorbe por difusión o transporte activo moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Malagón, 1990).

La teniosis es una enfermedad causada por el establecimiento de las formas adultas de *T. solium* en el intestino de su huésped definitivo, el hombre

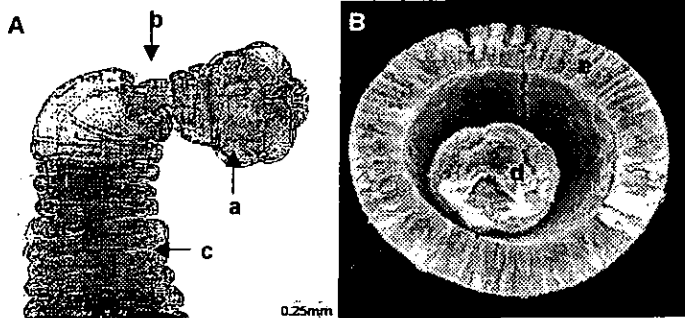
(Malagón, 1990). Los humanos adquieren la teniosis al ingerir carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos, las enzimas proteolíticas y sales biliares del sistema digestivo activan al parásito, el cual eclosiona y se adhiere a la pared del intestino delgado en donde aproximadamente en dos semanas se desarrolla el gusano adulto. Los proglótidos grávidos se desprenden de la Tenia y son expulsados al ambiente a través de la materia fecal donde se pudren. Una vez que ocurre esto los huevos se dispersan contaminando agua y alimentos. Cuando los cerdos ingieren los huevos, los jugos gástricos y sales biliares degradan el embrióforo activando a la oncosfera, la cual penetra la mucosa intestinal para ser transportada a diversos órganos a través del torrente sanguíneo. En 60 ó 70 días la oncosfera se transforma en una vesícula con un escólex invaginado, esta vesícula comúnmente llamada cisticerco corresponde al estadio larvario ó de metacestodo de *T. solium* (Ladette, *et al.*, 1982).

La cisticercosis es una infección causada por el establecimiento de las formas larvianas de *T. solium* en los tejidos de sus huéspedes intermediarios, el cerdo y el hombre (Malagón, 1990). Cabe señalar que en este caso el hombre actúa sólo como hospedero paraténico, ya que el parásito no puede continuar con su ciclo de vida. Los humanos adquieren la cisticercosis mediante la ingestión de huevos contenidos en agua o alimentos contaminados y no por comer carne de cerdo infectada con cisticercos (Botero, 1993).

2. Importancia de la cisticercosis.

La teniosis/cisticercosis es un padecimiento que constituye un serio problema de salud pública y es la causa de pérdidas económicas en países subdesarrollados (Aluja, 1982). Respecto a su distribución geográfica esta enfermedad ha sido reportada en México, Centro y Sudamérica, España, Polonia, el este de Europa, y algunos otros países tropicales incluyendo la India (Mahajan, 1982). En países desarrollados la frecuencia de la cisticercosis es extremadamente baja, sin embargo recientemente se ha reportado un incremento debido al traslado de inmigrantes de zonas endémicas como México y Centro América al sur de los Estados Unidos (Schantz, *et al.*, 1991).

Morfología de *Taenia solium*



C

Reino:	<i>Animalia</i>
Subreino:	<i>Metazoa</i>
Phylum:	<i>Platelmintes</i>
Clase:	<i>Cestoda</i>
Orden:	<i>Cyclophyllidea</i>
Superfamilia:	<i>Taenoidea</i>
Familia:	<i>Taeniidae</i>
Género:	<i>Taenia</i>
Especie:	<i>Taenia solium</i>

Figura 1.- La *Taenia solium*: A) Gusano adulto, donde se observan las tres regiones del cuerpo: a.-Escólex, b.-Cuello, c.-Estróbilo. B) Huevo, donde se observa: d.- Oncosfera, y e.-Embrióforo. C) Clasificación taxonómica

Ciclo de vida de *Taenia solium*

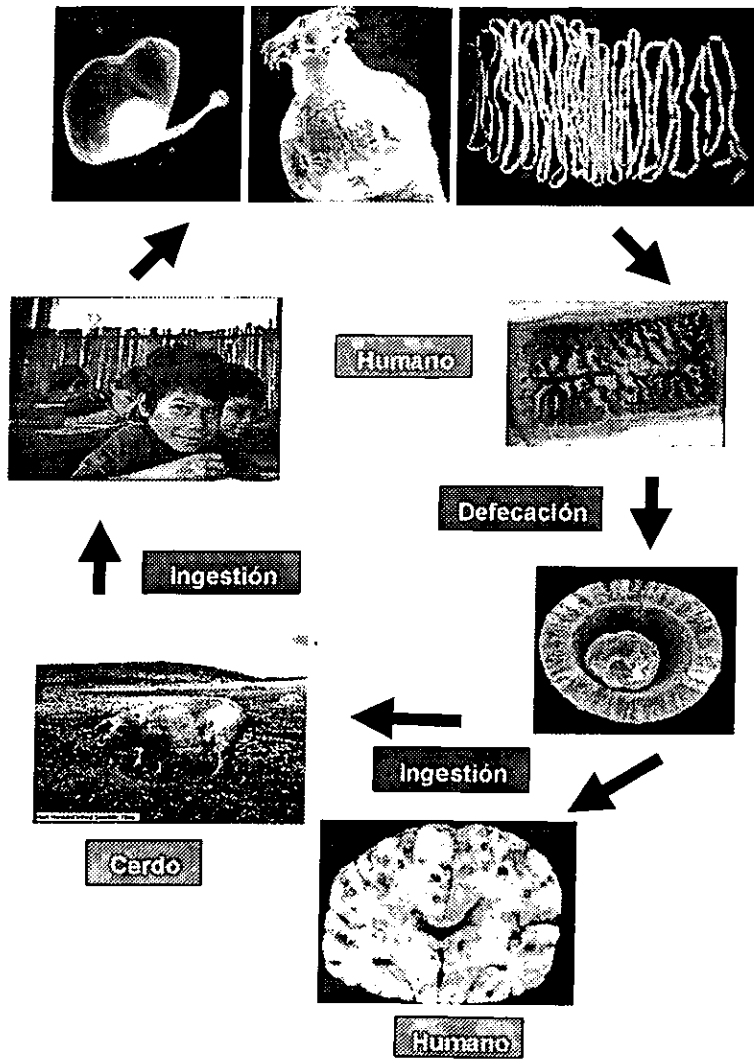


Figura 2.- Ciclo de vida de *T. solium*.

La neurocisticercosis (NCC) es la forma más grave de la cisticercosis humana, ya que cuando los metacestodos se localizan en el sistema nervioso central afectan la salud del individuo e incluso pueden producirle la muerte (Lombardo, *et al.*, 1982). México es considerado como un país de alta endemicidad con 1.9% de defunciones por cisticercosis cerebral, 3.5% de cisticercosis en necropsias (OMS, 1979) y 1.2% en pacientes seropositivos por inmunodiagnóstico (Ramos-Kuri *et al.*, 1992). Los síntomas causados varían dependiendo del estado y localización de los cisticercos. La NCC es una enfermedad que genera elevados costos en cuanto a su tratamiento que incluye gastos de hospitalización, medicamentos, etc. Tan solo en 1986 se gastaron 14.5 millones de dólares en atención a pacientes con NCC. Por otro lado, los pacientes que están en edad productiva dejan de generar ingresos al verse incapacitados por la sintomatología que genera esta enfermedad, por lo que causan pérdidas económicas para el país. (Flisser, 1988).

En la porcicultura (en cerdos criados en granjas) esta enfermedad provoca considerables pérdidas económicas ya que la carne infectada es decomisada y eliminada por las autoridades sanitarias, de tal manera que se pierde en promedio el 68.5% de la inversión a causa de la cisticercosis porcina (Acevedo, 1980). Cabe señalar que en países subdesarrollados no existe un adecuado control sanitario, por lo que no toda la carne infectada es detectada. Tan solo en México el 40% de la carne de cerdo proviene de áreas donde el control sanitario es pobre (Mazón-Rubio, 1991), existiendo solo un cierto control en los rastros de las grandes ciudades y quedando exentas de inspección la mayoría de las zonas rurales.

3. Diagnóstico.

El diagnóstico clínico, esta basado en la valoración de los síntomas que se presentan en pacientes sospechosos de NCC. Estos síntomas se pueden manifestar como crisis convulsivas, movimientos involuntarios, cefalea crónica, hipertensión intracraneal, etc. Esta sintomatología puede ser muy variada dependiendo del número y localización de los cisticercos (Escobar, *et al.*, 1972), de tal forma que el médico puede inferir su localización en base a los síntomas

presentes, sin embargo el diagnóstico clínico no es totalmente efectivo ya que los síntomas pueden confundirse con otros padecimientos, así pues este diagnóstico debe de ser confirmado con otra prueba diagnóstica.

Otras de las técnicas usadas en diagnóstico de la NCC son la resonancia magnética (Creasy, *et al.*, 1994) y la tomografía computarizada (Madrado, *et al.*, 1981). Estos métodos son capaces de detectar a los cisticercos, además de indicar su localización. Como desventajas podemos mencionar que este tipo de equipos no detectan la viabilidad de los cisticercos (lo cual es importante para el tipo de tratamiento), además la realización de este tipo de estudios implican un elevado costo económico y la intervención de personal capacitado para su aplicación. En el mismo sentido podemos añadir que este tipo de aparatos solo se encuentran en los grandes hospitales, por lo que esta forma de diagnóstico no puede ser utilizado masivamente (Laralde, *et al.*, 1986).

Las pruebas inmunológicas tienen por objeto la búsqueda de anticuerpos (anticisticerco) ó antígenos del parásito. Se han utilizado diferentes técnicas como la fijación del complemento (FC) (Nieto, *et al.*, 1956), inmunofluorescencia indirecta (IFI) (González, *et al.*, 1978), hemaglutinación (HA) (Laralde, *et al.*, 1986, Nascimento, *et al.*, 1987), inmunoelectroforesis (IEF) (Flisser, *et al.*, 1975), ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Coker-Vann, *et al.*, 1981, Espinoza, 1982., Laralde, *et al.*, 1986, Flisser *et al.*, 1990), inmunoelectrotransferencia (IET) (Tsang, *et al.*, 1989, Laralde, *et al.*, 1989). En la actualidad los métodos más difundidos son el ELISA y IET, los cuales presentan sensibilidad y especificidad variable, dependiendo del antígeno utilizado. Se ha empleado para estas pruebas extracto crudo, líquido ceforraquídeo, fluido vesicular, fracciones glicoproteicas obtenidas de extracto crudo, o bien antígenos purificados y recientemente antígenos recombinantes. Actualmente el método de Tsang es el más efectivo para el diagnóstico de la cisticercosis, ya que se obtiene hasta un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad. Entre los inconvenientes de estas técnicas destaca su elevado costo económico (Laralde, *et al.*, 1986).

4. Tratamiento

El tratamiento de esta enfermedad puede dividirse en tres categorías: sintomático, quirúrgico y farmacológico.

El tratamiento sintomático está enfocado a controlar los síntomas causados por la cisticercosis. Los pacientes son tratados con distintos fármacos como: antiepilépticos, analgésicos, esteroides, diuréticos y psicodrogas, dependiendo de los síntomas y localización de los cisticercos.

El tratamiento quirúrgico consiste en la extirpación directa del cisticerco mediante cirugía, sin embargo este tratamiento solo puede aplicarse cuando los cisticercos se encuentran en tejidos accesibles.

La quimioterapia o tratamiento farmacológico consiste en el suministro de fármacos antihelmínticos como el praziquantel o el albendazol. El praziquantel ha demostrado ser el medicamento más efectivo, ya que la neurocisticercosis humana puede ser controlada con una dosis única (2 ½ o 5 mg/kg) (Pawlowski, 1991). La teniosis humana también puede ser tratada efectivamente con el praziquantel, ya que una dosis de 10 mg/kg presenta una eficiencia del 100% (Espejo, 1977).

5. Control

Como medidas implementadas para el control de la cisticercosis, podemos mencionar dos estrategias: las educativas y las de intervención. Las primeras consisten en la realización de campañas educativas mediante las cuales la población tenga un conocimiento más claro de cómo se adquieren estas enfermedades (teniosis/cisticercosis), fomento de hábitos higiénicos, como el lavarse las manos, evitar la defecación al aire libre, lavar frutas y verduras, consumo de carne de cerdo bien cocida etc., o bien la construcción de sanitarios, drenaje, corrales para cerdos, etc. (Sarti, *et al.*, 1992)

Como medidas de intervención podemos mencionar el establecimiento de un control sanitario más estricto, uso periódico de cestocidas en áreas de alta prevalencia (Sarti, *et al.*, 2000). Un punto muy importante en el control de la

cisticercosis es la detección de individuos teniósicos, ya que estos, pueden infectar a un gran número de personas, debido a que el parásito adulto puede vivir y estar expulsando huevos durante muchos años sin que el individuo infectado presente síntomas. Así pues la detección y tratamiento de estos individuos permitiría detener el ciclo de vida de *T. solium*. De igual forma se ha propuesto fomentar la investigación en el área del diagnóstico y de la vacunación como medidas de control.

6. Vacunación.

Se ha propuesto que el desarrollo de una vacuna probablemente sea la forma más efectiva de interrumpir exitosamente la transmisión de la cisticercosis (Valdez, *et al.*, 1994). Muchas preparaciones antigénicas (extractos crudos) a partir de estadios oncosferales, larvarios y de adulto de diferentes céstodos han sido usados con éxito en ensayos de protección en contra de la cisticercosis (Molinari *et al.*, 1983, 1993; Nascimento *et al.*, 1995). Estudios subsecuentes han sido enfocados a la detección de fracciones y antígenos puros (Vivanco, *et al.*, 1999) capaces de conferir protección en contra de la cisticercosis. En modelos murinos se han identificado antígenos que inducen protección en contra de la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* (Valdez, *et al.*, 1994), algunos de estos antígenos también se han empleado en ensayos de protección en cisticercosis porcina (Sciutto, *et al.*, 1995). Otra estrategia empleada ha sido la detección de antígenos provenientes de estadios oncosferales, ya que se ha observado que son estos los que confieren un mayor porcentaje de protección (Ito, *et al.*, 1993). Como ejemplo podemos mencionar que en modelos murinos se ha logrado obtener alrededor de un 80% de protección en contra de *T. taeniaeformis* usando antígenos oncosferales (Cogle, *et al.*, 1991). La aplicación de las tecnologías de DNA recombinante han permitido la producción de antígenos recombinantes (Manoutcharian, *et al.*, 1996) y péptidos sintéticos útiles para la vacunación en contra de la cisticercosis, (Gevorkian, *et al.*, 1996). También se ha desarrollado a partir de oncosferas un antígeno recombinante (45 W) el cual ha sido utilizado exitosamente en la vacunación en contra de la cisticercosis ovina, este antígeno confiere un 94% de protección en ovinos infectados experimentalmente con *T. ovis* (Jonson, *et al.*, 1989). Este último

recientemente ha sido empleado para realizar estudios de vacunación en cisticercosis porcina causada por *T. solium* y se ha observado que confiere hasta un 78% de protección (Plancarte, *et al.*, 1999).

II. ANTECEDENTES.

1. GAPDH

La glucólisis es un proceso metabólico que apareció tempranamente en la historia de la vida y que ha sido altamente conservado a lo largo de la evolución de los organismos procariontes y eucariontes. En la glucólisis se llevan a cabo 10 reacciones enzimáticas mediante las cuales la glucosa es convertida a piruvato y NADH, generando dos moléculas de ATP. Esta vía es de vital importancia para los seres vivos ya que sus productos son la llave para la activación de otras vías metabólicas como la fosforilación oxidativa y el ciclo del ácido cítrico (Alberts, *et al.*, 1998).

La enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es un tetramero hidrosoluble (Fig. 4) con un peso molecular aproximado de 38 kDa y con un punto isoeléctrico aproximado de 8.2. La GAPDH cataliza la reacción 6 de la vía glucolítica (Fig. 3), este proceso consiste en la oxidación y fosforilación de GAP por NAD^+ y P. La enzima forma un enlace covalente con el carbono del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato. Después, el hidrógeno es eliminado del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato y se transfiere al transportador de hidrógeno NAD^+ . Este paso de oxidación genera un grupo carbonilo de un azúcar unido a la enzima mediante un enlace de alta energía. Entonces un ion fosfato de la solución rompe este enlace generando en su lugar un enlace azúcar-fosfato de alta energía. Durante esta reacción se lleva a cabo la síntesis de 1,3-bifosfoglicerato (BFG). Para la mayoría de las células animales la glucólisis únicamente es un prelude del ciclo del ácido piruvico y fosforilación oxidativa, ya que el ácido piruvico que se forma penetra rápidamente en las mitocondrias donde será oxidado completamente a CO_2 y H_2O . Sin embargo, en el caso de los organismos anaerobios y para algunos tejidos como el músculo esquelético que pueden verse sometidos a condiciones anaerobias, la glucólisis por sí sola se puede convertir en la fuente principal de ATP de la célula (Alberts, *et al.*, 1998).

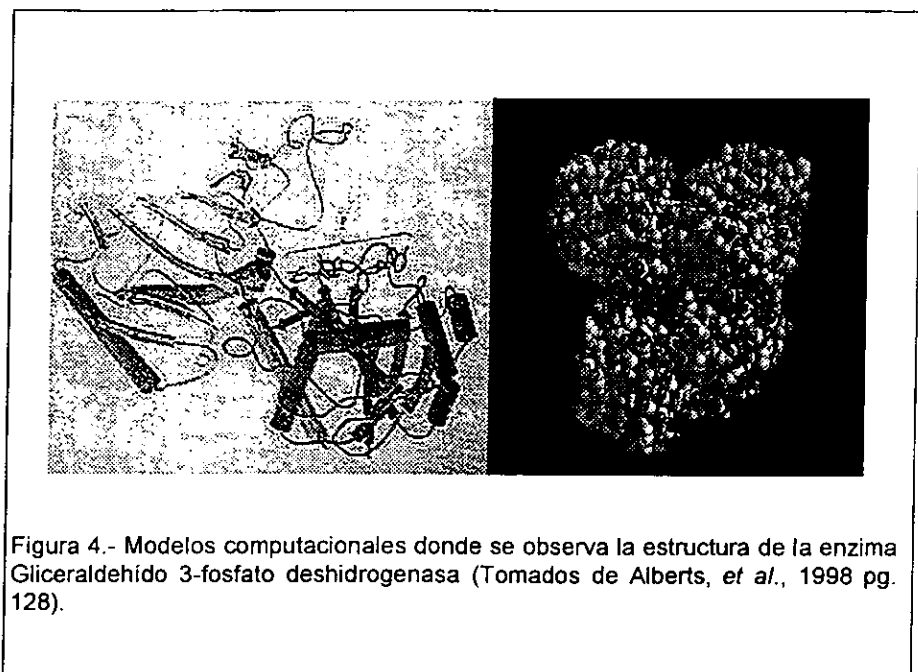
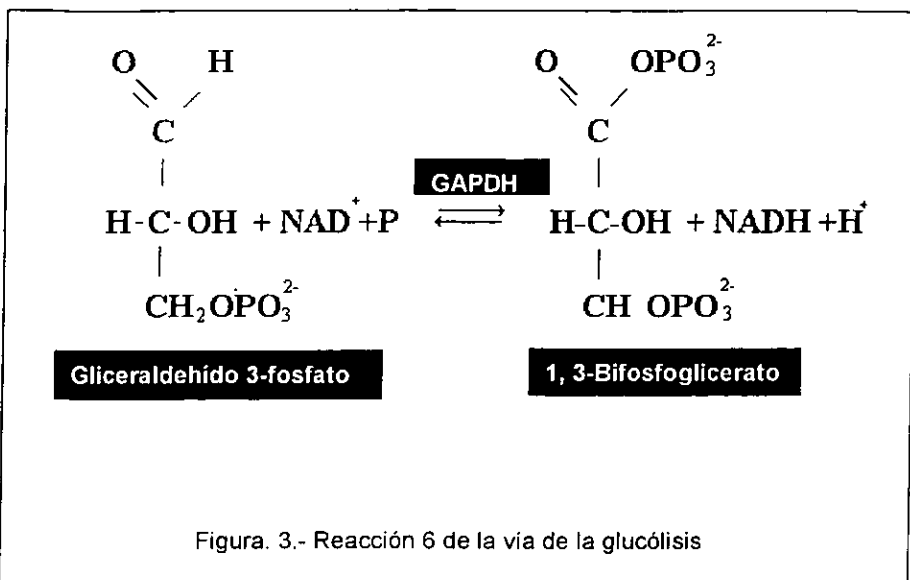
2. GAPDH otras funciones

En cuanto a su localización se sabe que esta proteína se encuentra principalmente en el citosol. Sin embargo, estudios de inmunolocalización realizados en *Schistosoma mansoni* han demostrado que esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en el tegumento de dicho parásito (Dessein, *et al.*, 1988). Además de la participación que la GAPDH tiene en la glucólisis, en tejidos de otras especies se ha demostrado que esta enzima realiza funciones no glucolíticas, como por ejemplo el acoplamiento y desacoplamiento de microtúbulos en células de cerebro humano (Huitorel, *et al.*, 1985) o el ensamblaje funcional de las tríadas en los túbulos transversos en músculo esquelético (Caswell, *et al.*, 1985). Otra función de particular interés descubierta en células cancerosas de pulmón, es el hecho de que la GAPDH es capaz de revertir la oxidación de los grupos tiol oxidados por el H_2O_2 (Brodie, *et al.*, 1987). Así pues se sospecha que la GAPDH podría estar desempeñando funciones protectoras como antioxidante (Waine, *et al.*, 1993).

3. GAPDH vacunación

En dos estudios epidemiológicos realizados con niños Brasileños y Kenianos resistentes a esquistosomiosis se encontró una correlación entre el elevado número de anticuerpos que reconocían un antígeno de 37kDa localizado en el tegumento del parásito y la resistencia de los individuos a la enfermedad (Butterworth, *et al.*, 1985; Dessein *et al.*, 1988). Este antígeno de *S. mansoni* fue clonado y secuenciado con lo cual se demostró que se trataba de la enzima GAPDH (Goudot-Crozel, *et al.*, 1989). La enzima recombinante GAPDH fue empleada en ensayos de vacunación en contra de la esquistosomiosis causada por *S. mansoni* y *S. japonicum*, indicando que ratones inmunizados con GAPDH eran menos susceptibles a la esquistosomiosis, respecto a los ratones que no fueron inmunizados. (Dessein, *et al.*, 1988). Por lo anterior, la GAPDH ha sido propuesta como un buen candidato en la vacunación en contra de la esquistosomiosis (Waine, *et al.*, 1993). Estudios de protección en tripanosomiosis en los que se utilizó a la GAPDH, junto con otras enzimas como la aldolasa,

mostraron conferir hasta un 100% de protección en ratones y ratas vacunados con dichos antígenos (Balaban, *et al.*, 1995). Estos estudios evidencian el potencial de la GAPDH como blanco inmunológico, de ahí la importancia de estudiar esta proteína en organismos parásitos como *T. solium*.



III. OBJETIVO.

El objetivo de presente trabajo fue la clonación y caracterización de un cDNA que codifica para la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa del cisticerco de *T. solium*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

a) Reactivos.

Las endonucleasas de restricción, la RNasa, la DNasa I, la transcriptasa reversa, así como otras enzimas utilizadas fueron obtenidas comercialmente de las compañías New England Biolabs y Gibco BRL. El estuche de CircumVent fue obtenido de New England Biolabs. El estuche para la amplificación de DNA (PCR) fue de la casa BIOTECOSA. La albúmina sérica bovina fracción V, el DNA de esperma de salmón tipo III fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El ficoll tipo 400 y la polivinilpirrolidona de Pharmacia Inc. Las membranas de nitrocelulosa (NC) de Millipore Corp. Los isótopos α -S³⁵-dATP y α -P³²-dCTP de Amersham Co. El resto de los reactivos fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

b) Biológicos.

Los metacestodos de *T. solium* fueron obtenidos por disección del músculo esquelético de cerdos infectados. Se utilizó la biblioteca de cDNA del metacéstodo de *T. solium* construida en el vector λ gt10 (previamente obtenida en el laboratorio). La cepa de *Escherichia coli* utilizada fue la C₆₀₀hfl⁻ (SupE44, thi1, leuB6, lacY1, tonA21, L-(rk1mk+)mcrA-,hfl-).

c) Síntesis de oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos fueron preparados en un sintetizador de DNA Biosearch modelo 8750 de la casa Pharmacia Inc.

2. MÉTODOS.

a). Electroforesis y Purificación de fragmentos de DNA.

Se utilizaron geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Para cada carril se cargaron 25 μ g de DNA mezclado con amortiguador de cargado 2X (ver apéndice) y fueron corridos en cámaras de electroforesis (Life-

Thecnologies) a 25 mA. durante 1hr. Los fragmentos de DNA fueron cortados, para ser tratados con una solución de NaI 6M, una vez que el gel fue disuelto, se adicionaron 5µl de "perlas de vidrio" y se agito en vortex. La mezcla se agitó durante 1 hr a 4° C, después se centrifugó a 10,000 rpm por 10 segundos y se desecho el sobrenadante. Las perlas fueron resuspendidas en 500µl de NaI 6M con ayuda de un vortex y centrifugados como antes. El exceso de NaI fue removido lavando tres veces con 500µl de una solución de lavado (ver apéndice). Finalmente las perlas fueron centrifugadas a 10,000 rpm y el sobrenadante remanente desechado. Las perlas fueron secadas a 37° C durante 15 min. y resuspendidas en 25µl de TE (ver apéndice). Se corrió un gel de agarosa 1% para determinar la concentración del DNA purificado (Vogelstein y Gillespie, 1979).

b). Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Para las reacciones de PCR, se utilizaron: 100 ng de cDNA, 5ng de DNA genómico (previamente obtenido en el laboratorio) y 5ng de DNA de las clonas de λgt10, 50pm de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 10µl de amortiguador de PCR 10X, 2 mM de nucleótidos (A, C, G, T), 2 mM de MgCl₂ y 5 U de la enzima Taq Polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 100µl. Las condiciones utilizadas para obtener el fragmento (cDNA) de GAPDH que se utilizó como sonda, así como los fragmentos clonados en el vector λgt10 y el fragmento de DNA genómico fueron las siguientes: un ciclo de (3 min.- 95°C, 1 min. -50°C, 2 min. - 72°C), 30 ciclos (1 min.- 95°C, 1 min.- 50°C, 5min.- 72°C), y un ciclo final (1 min.- 95°C, 5 min.- 50°C, 5min.- 72°C). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos contenidos en el vector λgt10 fueron comprados a la casa (New England Biolabs), y corresponden a secuencias que se encuentran flanqueando los sitios de clonación del vector. Los oligonucleótidos específicos GAPDH-5' y GAPDH-3' fueron diseñados a partir de dos regiones que presentan alta identidad en la secuencia de aminoácidos de varias GAPDHs obtenidas del bancos de datos públicos en internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Genbank>.

c). Marcaje Radiactivo.

El fragmento purificado de cDNA de ~500 pb obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos GAPDH-5' y GAPDH-3', fue marcado con α -P³²-dCTP utilizando el método de Random primer (Gibco-BRL). Para la reacción se usaron 25 ng de fragmento purificado diluido con dH₂O en un volumen de 20 μ l, el cual fue desnaturalizado 3 min. a 95°C. El fragmento desnaturalizado se mantuvo a 4°C y se le adicionaron 2 μ l de amortiguador de la reacción 10x (desoxinucleótidos A, G, T), 2 μ l de α P³²-dCTP, 1 μ de oligonucleótidos y 1 μ l de enzima Klenow, la mezcla de reacción se incubo 30 min. a 37°C. La sonda marcada fue pasada a través de una columna de sefrosa 4B con el objeto de separar la marca no incorporada. De la columna se obtuvieron 10 fracciones de ~500 μ l, de las cuales se seleccionaron la 2^{da} y 3^{ra}, ya que en estas fracciones se detecto mediante un contador Geiger la máxima señal radioactiva.

d). Titulación, selección y aislamiento de clonas (tamizaje).

La biblioteca de cDNA construida en el vector λ gt10 clonada en Eco RI, previamente construida en el laboratorio fue titulada. Brevemente, la biblioteca original fue diluida 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶ en medio SM. Un volumen de 200 μ l de un cultivo de bacterias C₆₀₀ crecidas de toda la noche a 37°C en 5 ml de medio SOB (ver apéndice) fueron infectadas durante 15 minutos a 37°C con 10 μ l de cada una de las diluciones antes mencionadas. La solución de bacterias y fagos fue mezclada con 3ml de top-agar (fundido a 45°C), sembradas sobre cajas Petri conteniendo medio SOB-agarosa sólido e incubadas a 37°C durante 8hrs. La titulación de la biblioteca se realizo mediante el conteo directo de las placas líticas producidas por el fago sobre la caja de Petri y reportadas en # fagos/ml.

Una vez titulada la biblioteca se procedió a sembrar 50,000 fagos distribuidos en 4 cajas Petri de 180 mm conteniendo medio SOB sólido. El DNA de los fagos fue transferido a membranas de nitrocelulosa (Millipore Corp.), manteniendo las membranas en contacto con el césped de bacterias y fagos durante 10 minutos, terminado ese tiempo los filtros fueron marcados y orientados con tinta china en sus respectivas cajas. Este proceso se repitió con el

objeto de tener filtros duplicados. El DNA contenido en los filtros fue desnaturalizado en una solución de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M durante 5 minutos, y posteriormente neutralizado en una solución de Tris-HCl 1 M y NaCl 1.5 M, pH 8 durante 5 minutos. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y el DNA fijado con luz UV en un aparato Espectrolinker (1200seg x 100Mj x cm2).

Las membranas conteniendo el DNA de los fagos fueron incubadas a 50°C durante 3 horas en la solución de hibridación conteniendo citratos-salina 6x (SSC 6X), Denhart's 5x, SDS 0.5% y 100mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Posteriormente, se adicionó la sonda radioactiva a la solución antes mencionada. Las condiciones de hibridación fueron toda la noche en agitación a 55°C, y los filtros se lavaron 3 veces por 10 min. cada vez con solución de SSC 2x y SDS 0.1% a 55°C para remover la marca no incorporada específicamente a las membranas. Finalmente, las membranas se secaron a temperatura ambiente y fueron expuestas en placas de rayos-X durante 72 hrs. Las señales radioactivas obtenidas después de revelar las placas de rayos-X corresponden a las clonas que hibridan con la sonda de GAPDH. Estas clonas fueron aisladas con pipetas Pasteur estériles y depositadas en 1 ml de medio SM. El proceso de tamizaje se repitió por 2 veces más utilizando 1000 y 100 fagos por caja, respectivamente con el objetivo de purificar el fago. Las clonas que mantuvieron su positividad fueron guardadas en medio SM a 4°C.

e). Obtención de DNA de las clonas seleccionadas.

Aproximadamente, 5×10^{-6} fagos se utilizaron para infectar 200 μ l de bacterias *C₆₀₀hfl* a 37°C durante 15 minutos. La mezcla anterior fue sembrada como ya se menciona anteriormente pero sobre cajas con medio SOB-agarosa e incubada toda la noche a 37°C. Los fagos crecidos en la caja fueron recuperados con 5 ml de SM en agitación durante una hora a temperatura ambiente. A la mezcla recuperada se le adicionaron 200 μ l de cloroformo y fue agitada y centrifugada por 10 min. a 3,500 rpm. El sobrenadante obtenido conteniendo los fagos (plate stock) fue recuperado en un tubo nuevo y guardado a 4°C.

f). Preparación de DNA a partir de fagos.

El DNA de los fagos fue preparado a partir de 700 μl del sobrenadante conteniendo los fagos. Al volumen de fagos anterior se le adicionaron 700 μl de una solución de PEG 20% y se mantuvo a 4°C durante 1 hr. La mezcla anterior se centrifugo para así precipitar el fago, el cual fue resuspendido en 200 μl de SM. Entonces se adicionaron 2 μl de RNAsa (1mg/ml) y 2 μl de DNAsa (100ug/ml) e incubo a 37°C durante 30 min. La solución fue mezclada con un volumen igual de fenol saturado con TE y centrifugada para separar la fase acuosa. Esta fase acuosa fue tratada con cloroformo para remover el fenol residual y la fase acuosa obtenida de este proceso fue tratada con 200 μl de isopropanol y congelada a -70°C por 30 minutos. La mezcla anterior fue centrifugada a 15,000 rpm por 10 min. a 4°C, y se desechó el sobrenadante. La pastilla precipitada fue lavada con 200 μl de etanol frío al 70%, secada, resuspendida en 30 μl de TE y guardada a -20°C.

g). Digestión con endonucleasas de restricción.

Aproximadamente 500 ng de cada DNA fue digerido con diversas enzimas de restricción (Hind III, Eco RI, Xho I, Xba I, Pst I, Bam HI). Las digestiones se realizaron empleando 1 μl de cada enzima, 10 μl de amortiguador específico 10X para cada enzima, y 37 μl de agua para completar un volumen total de 50 μl . Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 6 hrs, después se precipitaron con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M a -70°C. Las reacciones se centrifugaron a 4°C y fueron resuspendidas en 25 μl de TE, para posteriormente ser corridas en un gel de agarosa.

h). Secuenciación

El fragmento de cDNA utilizado como sonda, el fragmento de DNA genómico, así como el fragmento obtenido de la clona 7.2 de $\lambda\text{gt}10$ fueron purificados por el método de perlas de vidrio y posteriormente secuenciados utilizando el estuche CircumVent versión 2.0 de la casa New England BioLabs, siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se hizo una mezcla con 200 ng del fragmento de PCR y 1.2 pmoles de primer, 1.5 μl de 10X amortiguador de secuencia, 1 μl de 30X tritón X-100, 2 μl de $\alpha\text{-S}^{35}\text{-dATP}$ y 1 μl (2 U) de la

enzima Vent_R(exo) DNA Polimerasa y dH₂O hasta completar un volumen total de 15 μ l. De la mezcla anterior se tomaron 3.2 μ l y se le adicionaron a 3 μ l de cada dideoxinucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) por separado contenidos en diferentes tubos Eppendorf. Los tubos fueron colocados en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 20 ciclos de 95°C -20 seg., 55°C - 20 seg. y 72°C - 20 seg. Finalmente, la reacción se detuvo añadiendo 4 μ l de solución de terminación y las reacciones se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La electroforesis para la secuencia se realizó en geles de acrilamida al 6%, con un grosor de 4mm, a 55 Watts en una cámara de secuencia modelo S2 (Gibco BRL), se utilizaron 3 μ l de cada una de las reacciones por pozo. Pasado el tiempo de corrida, se procedió a fijar el gel en una solución de ácido acético y metanol al 10% durante 15 min. El gel fue secado y expuesto a placas de autoradiografía X-OMAT (Kodak) durante 24 hrs. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas en el programa computacional PCgene (Intelligenetic Corp.).

V. RESULTADOS.

Mediante la técnica de la (PCR) se lograron obtener dos fragmentos de DNA de aproximadamente ~500pb (Fig. 5). Los cuales fueron amplificados a partir de cDNA y DNA genómico de cisticerco utilizando un par de oligonucleótidos específicos el GAPDH-5' (AAC-GCCTCC-TGT-ACN-ACN-AA) y GAPDH-3' (TGG-TAC-GAC-AAC-GAA/G-TAC/T-GG), diseñados a partir de secuencias de aminoácidos de regiones altamente conservadas (5'-NASCTTN y 3'-WYDNEYG) para la enzima GAPDH de distintos organismos. El fragmento de ~500 pb obtenido a partir del templado de cDNA fue purificado por medio de la técnica de perlas de vidrio (Vogelstein y Gillespie, 1979) y secuenciado por medio de la PCR utilizando el estuche de CircumVent y el oligonucleótido GAPDH-5'. Como se muestra en la figura 6, este fragmento consta de 513 pb que traducidas a aminoácidos resultan ser una región del fragmento de un gen que codifica para la GAPDH de *T. solium*. En la misma figura, también se observa un fragmento de ~500 pb obtenido al utilizar DNA genómico del parásito como templado y con las mismas condiciones. Este fragmento también fue secuenciado (Fig. 6) demostrando que se trataba de la misma región antes mencionada de la GAPDH.

Una vez demostrado que ambos fragmentos codificaban para una región de la GAPDH, se marco radiactivamente con dCTP-P³² el fragmento de ~500 pb que provenía del cDNA de *T. solium*, para posteriormente ser utilizado como sonda y tamizar una biblioteca de cDNA del metacéstodo de *T. solium*. Después de realizar tres rondas de tamizajes (1°, 2° y 3°), se obtuvieron 14 clonas. La figura 7, muestra una autoradiografía de cinco filtros del tamizaje secundario, en donde se observan cinco de las clonas detectadas en los filtros de nitrocelulosa. Los puntos oscuros indican las clonas que hibridaron con la sonda, en cada filtro se observan varias señales radioactivas. Cabe mencionar que todos los filtros fueron realizados por duplicado.

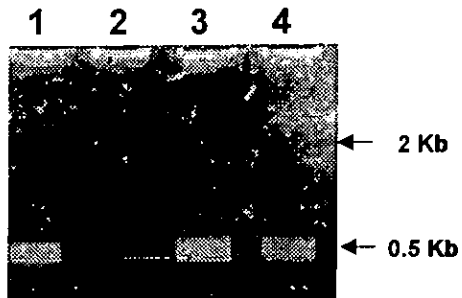


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1) Control positivo de un fragmento clonado en M13 del estuche de PCR amplificado con oligonucleótidos del vector M13. En los siguientes carriles se utilizaron todos los reactivos de la PCR incluyendo los oligonucleótidos GAPDH-5', GAPDH-3', 2) sin cDNA, 3) cDNA y 4) DNA genómico del metacestodo de *T. solium*.

cDNA	1	NASCTTN CLA PLAKVINDNFGIAEGHDTVHSYTATQKWVD
Gen	1	NASCTTN CLA PLAKVINDNFGIAEGHDTVHSYTATQKWVD
cDNA	41	GPSKKAWRDGRTAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLT
Gen	41	GPSKKAWRDGRTAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLT
cDNA	81	GMAFRVPTPNVSVDLTCKLAKPATYEQIKA AVKTASEPP
Gen	81	GMAFRVPTPNVSVDLTCKLAKPATYEQIKA AVKTASEPP
cDNA	121	RLKGILEYTEDQWSTDFLSTTCSSTFDARAGIALNDTFV
Gen	121	RLKGILEYTEDQWSTDFLSTTCSSTFDARAGIALNDTFV
cDNA	161	KLIAWYDNECG
Gen	161	KLIAWYDNECG

Figura 6.- Secuencia de aminoácidos traducida a partir de las secuencias de nucleótidos del fragmento de PCR de ~500 pb de cDNA del metacestodo de *T. solium*, y del fragmento de PCR del DNA genómico de *T. solium*. En negritas se observan las regiones conservadas de aminoácidos que contienen la secuencia de los oligonucleótidos GAPDH-5' y GAPDH-3' con la cual fue amplificado dicho fragmento.

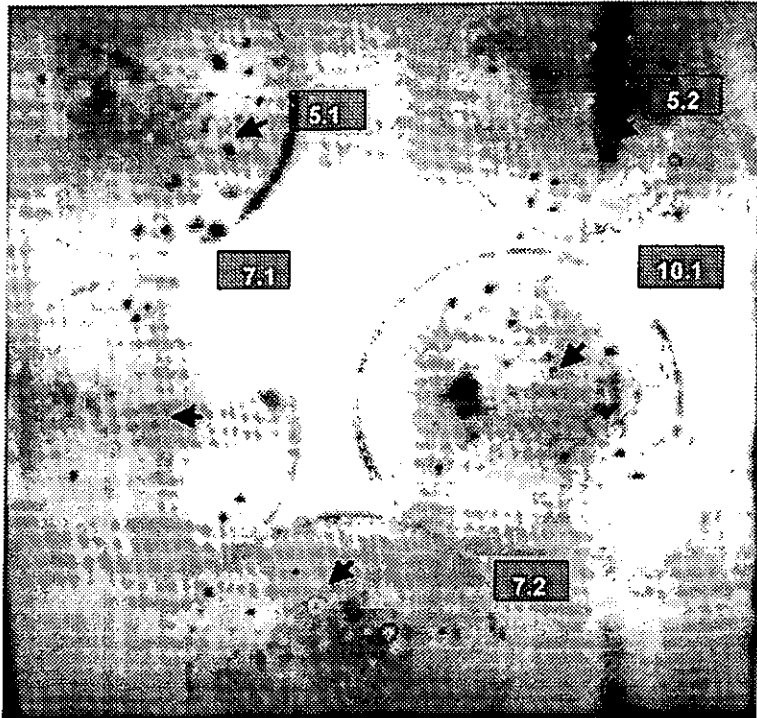


Figura 7. Autorradiografía de un tamizaje (secundario), utilizando como sonda el fragmento de ~500 pb de la GAPDH de *T. solium*. Las clones positivas (manchas oscuras) en los filtros de nitrocelulosa corresponden a las clones: 5.1, 5.2, 10.1, 7.1 y 7.2. Las flechas indican clones positivas.

Mediante la PCR y utilizando como templado el DNA de los fagos se determinaron los tamaños de los insertos contenidos en cada clona. Para estas amplificaciones se utilizaron oligonucleótidos comerciales del fago λ gt10 que flanquean la región del sitio de clonación de este vector. Cabe mencionar que de las 14 clonas solo se probaron 10 y de estas se lograron amplificar ocho insertos, solamente 2 clonas no amplificaron ningún inserto. Los tamaños de los insertos de las 8 clonas positivas fueron los siguientes: clona 10.1 (~1.2 Kb), clona 10.2 (~1.5 Kb), clona 5.1 (~1.5 Kb), clona 5.2 (~800 pb), clona 7.2 (~1.5 Kb), clona 7.1 (~1.5 Kb), clona 1.1 (~1.4 Kb), clona 1.2 (~800 pb). En la figura 8, se muestran los tamaños de los insertos de las ocho clonas.

A partir del DNA de las 8 clonas obtenidas se procedió a realizar digestiones con las siguientes enzimas de restricción: Eco RI, Xho I, Pst I, Bam HI, Hind III, Sal I, Bgl I, Nde I, Not I, y Nco I. con el fin de determinar el patrón de restricción de cada clona. Debido a que todas las clonas presentaron un patrón idéntico, se eligió para su caracterización a la clona 7.2 debido a su mayor tamaño. En la figura 9, se observa el mapa de restricción de la clona 7.2, corregido con la secuencia nucleotídica y un programa computacional. Cabe señalar que las enzimas Eco RI, Xho I, Pst I, Bam HI no cortan la secuencia de la clona.

La figura 10, muestra la secuencia completa de nucleótidos y de aminoácidos de la clona 7.2 (~1.5 Kb) realizada por PCR utilizando el estuche de CircumVent. La secuencia del cDNA en su región 5' mostró las bases (GTGTTGGT) antes de encontrar el marco abierto de lectura que comienza en el primer codón que codifica para metionina (ATG) en la posición marcada como 1 y continua hasta la posición 1006 donde se encuentra el codón de terminación (TAA). El fragmento presenta en total 1,161 pb (295 A; 298 C; 262 G; 306 T), que codifican para una proteína de 37,391 Da. Dentro de la secuencia se identificó el fragmento utilizado como sonda (513pb) el cual se encuentra en la región comprendida entre el nucleótido 442 al 954. Respecto a los sitios esenciales para

la actividad enzimática de la GAPDH (previamente reportados en la literatura) se muestran subrayados dentro de la secuencia (Dessein, *et al.*, 1988). Asimismo la señal de poliadenilación contenida en la región 3' del cDNA resulto ser la más característica observada en los RNA mensajeros (RNAm).

Otros análisis computacionales realizados sobre la secuencia de aminoácidos realizados con el programa PC/Gene, mostraron los sitios característicos y esenciales para la actividad de la enzima, los cuales se encuentran localizados en los aminoácidos: C-151, Y-319 (transferencia de carga), C-151, H-177 (función nucleófila), N-315, D-34 (sitio de ligando NAD) S-150, T-152, R-195, T-209 (sitio de ligando de fosfato inorgánico), T-182 y R-233 (sitio de ligando GAP). Asimismo, un alineamiento múltiple de aminoácidos (Fig. 11) de la secuencia obtenida de la GAPDH de *T. solium* con enzimas GAPDH de otros organismos tales como el *Schistosoma*, el Cerdo, el Humano, el Ratón y la *Leishmania*, mostró una identidad de aminoácidos promedio de 41.6% entre todas las GAPDH analizadas. Las regiones idénticas, los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de la GAPDH y las regiones utilizadas para diseñar los oligonucleótidos GAPDH-5' y GAPDH-3' se señalan en la figura 11. Asimismo, la secuencia de aminoácidos de la GAPDH de *T. solium* presento los siguientes porcentajes de identidad con respecto al Humano, 74.7%, al Cerdo, 74.4%, al Ratón, 74.4%, al *Schistosoma* 74.7%, y a la *Leishmania* 51.19%. Con las secuencias antes mencionadas se elaboró un dendrograma de tipo radial (Fig. 12) en el programa Tree View.

Los análisis antes mencionados confirman que la secuencia nucleotídica de la clona 7.2, codifica para una enzima GAPDH del cisticerco.

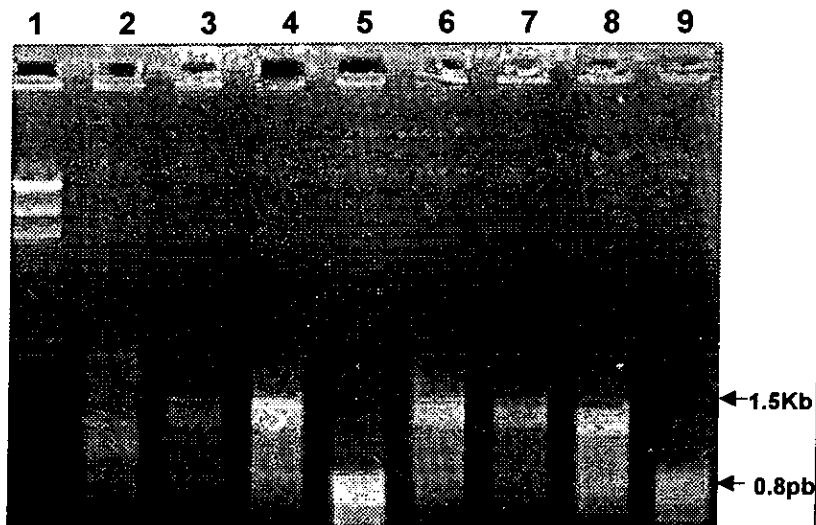
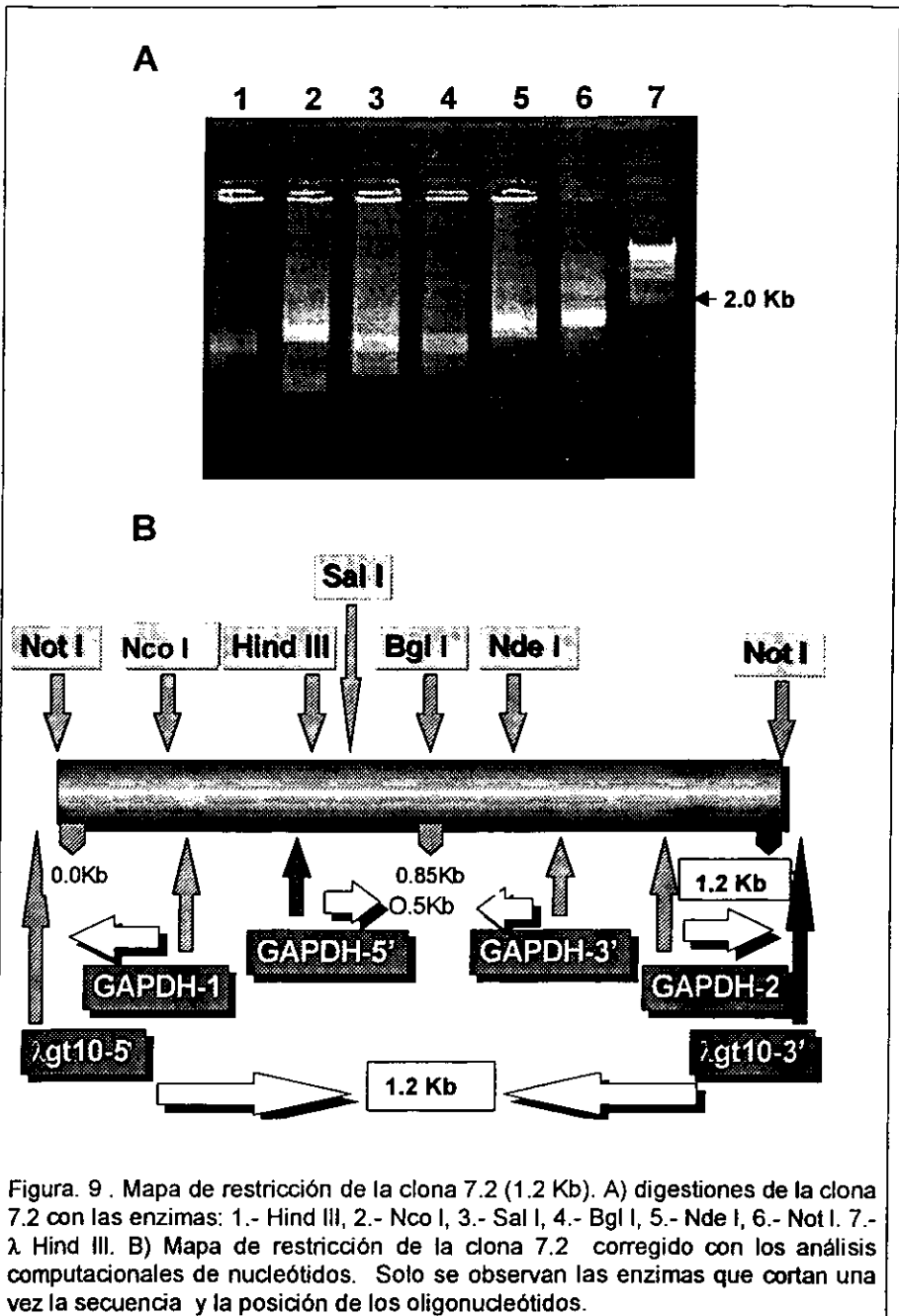


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando el tamaño de los insertos contenidos en clonas de fagos positivos: 1) DNA del fago λ digerido con la endonucleasa Hind III, 2) Clona 10.1 (~1.2Kb), 3) Clona 10.2 (~1.5Kb), 4) Clona 5.1 (~1.5Kb), 5) clona 5.2(~800 pb), 6) Clona 7.2 (1.5Kb), 7) Clona 7.1 (1.5Kb), 8) Clona 1.1 (~1.4Kb), 9) clona 1.2 (~800 pb). Los insertos de las clonas fueron amplificados utilizando la PCR y oligonucleótidos de λ gt10 comerciales.



GTGTTGGT

1 ATG AAG CCT CAA GTC GGG ATC AAT GGT TTC GGT CGT ATC GGT CGT CTT
16 M K P Q V G I N G F G R I G R L
49 GTA TTG CGC GCT GCT GTC GCC TCC AAC ACT GTA GAT GTT GTT GCA GTC
32 V L R A A V A S N T V D V V A V
97 AAT GAT CCC TTC ATT GAT TTG GAA TAT ATG GTC TAT ATG TTT AAG TAT
48 N D P F I D L E Y M V Y M F K Y
145 GAT TCC ACT CAT GGC CGA TTC AAG GGC GTC GTC AAG GTT GAA GGC GGC
64 D S T H G R F K G V V K V E G G
193 AAG TTG ATT ATT GAC AAG CAC AAG ATC ACC GTC TTC CAA GAT ATG AAT
80 K L I I D N H K I T V F Q D M N
241 GCC AAT GCA ATC CCA TGG TCT CAG GCT GGC GTT GAA TAC ATT GTT GAG
96 A N A I P W S Q A G V E Y I V E
289 TCC ACT GGC ATC AAT ACC ACC ATC GAG AAG GGT TCA GCT CAC TTC CAC
112 S T G I N T T I E K A S A H F H
337 GGT GGT GCC AAG AAG GTC ATC TCG GCT CCT TCT GCT GAT GCT CCC
128 G G A K K V I I S A P S A D A P
385 ATG TTC GTA GTT GGT GTG AAC CAG GAT AAG TAC GAT CCC TCT ATG AAA
144 M F V V G V N Q D K Y D P S M K
433 GTC GTG TCC AAC GCT TCC TGC ACA ACC AAC TGT CTG GCT CCG CTC GCA
160 V V S N A S C T T N C L A P L A
481 AAG GTC ATT AAT GAT AAC TTC GGC ATT GCT GAA GGC CAT GAC ACT GTG
176 K V I N D N F G I A E G H D T V
529 CAC TCC TAC ACT GCC ACC CAG AAG GTT GTT GAT GGT CCT TCC AAG AAG
192 H S Y T A T Q K V V D G P S K K A
577 GCC TGG CGT GAT GGC CGC ACC GCC GCT CAG AAC ATC ATC OCT GCC TCC
208 A W R D G R T A A Q N I I P A S
625 ACC GGT GCA GCC AAG GCT GTT GGT AAG GTC ATT CCC GAG CTT AAT GGG
224 T G A A K A V G K V I P E L N A
673 AAG CTT ACC GGC ATG GCT TTC CGT GTG CCC ACT CCC AAT GTC TCT GTT
240 K L T G M A F R V P T P N V S V
721 GTC GAC TTG ACC TGT AAA TTG GCC AAG CCA GCC ACC TAC GAA CAG ATT
256 V D L T C K L A K P A T Y E Q I
769 AAG GCT GCC GTT AAG ACC GCC TCT GAG CCG CCT CGC CTG AAG GGC ATT
272 K A A V K T A S E P P R L K G I
817 CTT GAA TAC ACT GAG GAT CAG GTT GTC AGC ACC GAC TTC CTC TCC ACT
288 L E Y T E D Q V V S T D F L S T
865 ACA TGC TCC TCT ACT TTC GAT GCT GGT GCC GGC ATT GCC CTC AAC GAT
304 T C S S T F D A R A G I A L N D
913 ACT TTT GTT AAG CTC ATT GGC TGG TAC GAT AAT GAG TGT GGC TAT AGC
320 T F V G K L I A W Y D N E C G Y S
961 TGG CGT GTT GAT ATC AAC CAT ATG TTC AAG AAG GAT CAT TAA
336 W R V V D L I N H M F K K D H -
GGCTTTCCTGGAGAGGGGTTAAACAACCTGGCTAGTGTGTTTGTGGCAATACAATCCATGTCAAGT
AATCACTGCTTGACCGGAACCCCACTATCATAGCAATAAAGTTAAAAGTCTCAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura. 10 Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos de la clona 7.2. Subrayados se encuentran los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de la GAPDH. En negritas se observan los aminoácidos utilizados para diseñar los oligonucleótidos con los cuales se amplificó el fragmento de ~500 pb. La secuencia consenso de poliadenilación de los RNAm se marca en recuadro.

```

HUMANO -----MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSSGK
CERDO -----VKVGVDFGFRIGRLVTRAAFNSSGK
RATON -----MKVGVVNGFGRIGRLVTRAAICSGK
ESQUISTOSOMA -----MSRAKVGINGFGRIGRLVTRAAFLKNT
LEISHMANIA -----MAPIKVGINGFGRIGRMVFOAICDQGL
TSOLIUM -----MKPQVGINGFGRIGRLVTRAAVASNT

HUMANO ----VDIVAINDPFIDLNYMVMFYQDSTHGKPHGTVKAE-----NGKLVIN--GNP
CERDO ----VDIVAINDPFIDLNYMVMFYQDSTHGKPHGTVKAE-----DGKLVID--GKA
RATON ----VEIVAINDPFIDLNYMVMFYQDSTHGKPHGTVKAE-----NGKLVIN--GKP
ESQUISTOSOMA ----VDVSVNDPFIDLEYMVMYIKRDSTHGTFEPGEVSTE-----NGKLVN--GKL
LEISHMANIA IGTETIDVAVVDMSTNAEYFAYQMKHDTVHGRPKYTVAEVKSPPSVETADVLVNVN--GHR
TSOLIUM ----VDVAVNDPFIDLEYMVMFYQDSTHGKPHGTVKAE-----GGKLIID--NHK

HUMANO ---ITI FOERDPSKIKWGDAGAAYVVESTGVFTTMEKAGAHLOGG-AKRVIISAPSAD--
CERDO ---ITI FOERDPANIKWGDAGTAYVVESTGVFTTMEKAGAHKGG-AKRVIISAPSAD--
RATON ---ITIFQERDPTNIKWGEAGAAYVVESTGVFTTMEKAGAHKGG-AKRVIISAPSAD--
ESQUISTOSOMA ---ISVHCERDPANIPWDKDGAEYVVESTGVFTTIDKAQAHIKNNRAKQVVISAPSAD--
LEISHMANIA ---IKCVKAQRNPADLFWGKLGVDYVVESTGLTFDKLKAEGHIKGG-AKVVVISAPASGG--
TSOLIUM ---ITVQEMNANAI FWSQAGAAYVVESTGINTTIEKASAHFHGG-AKVVVISAPSAD--

HUMANO APMFVGVNHEKYDNS-LKIVSNASCTTNCLAPLAKVIHDN-FGIVEGLMTTVHAITATQ
CERDO APMFVGVNHEKYDNS-LKIVSNASCTTNCLAPLAKVIHDN-FGIVEGLMTTVHAITATQ
RATON APMFVGVNHEKYDNS-LKIVSNASCTTNCLAPLAKVIHDN-FGIVEGLMTTVHAITATQ
ESQUISTOSOMA APMFVGVNENSYEKS-MSVVSNASCTTNCLAPLAKVIHDN-FEIVEGLMTTVHSFTATQ
LEISHMANIA AKTIVMVGYNQHEYS PASHHVVSNASCTTNCLAPIVHVLTKENFGIETGLMTTIHSYATQ
TSOLIUM APMFVGVNQDKYDPS-MKVVSNASCTTNCLAPLAKVINDN-FGLAEGLMTTVHSYATQ

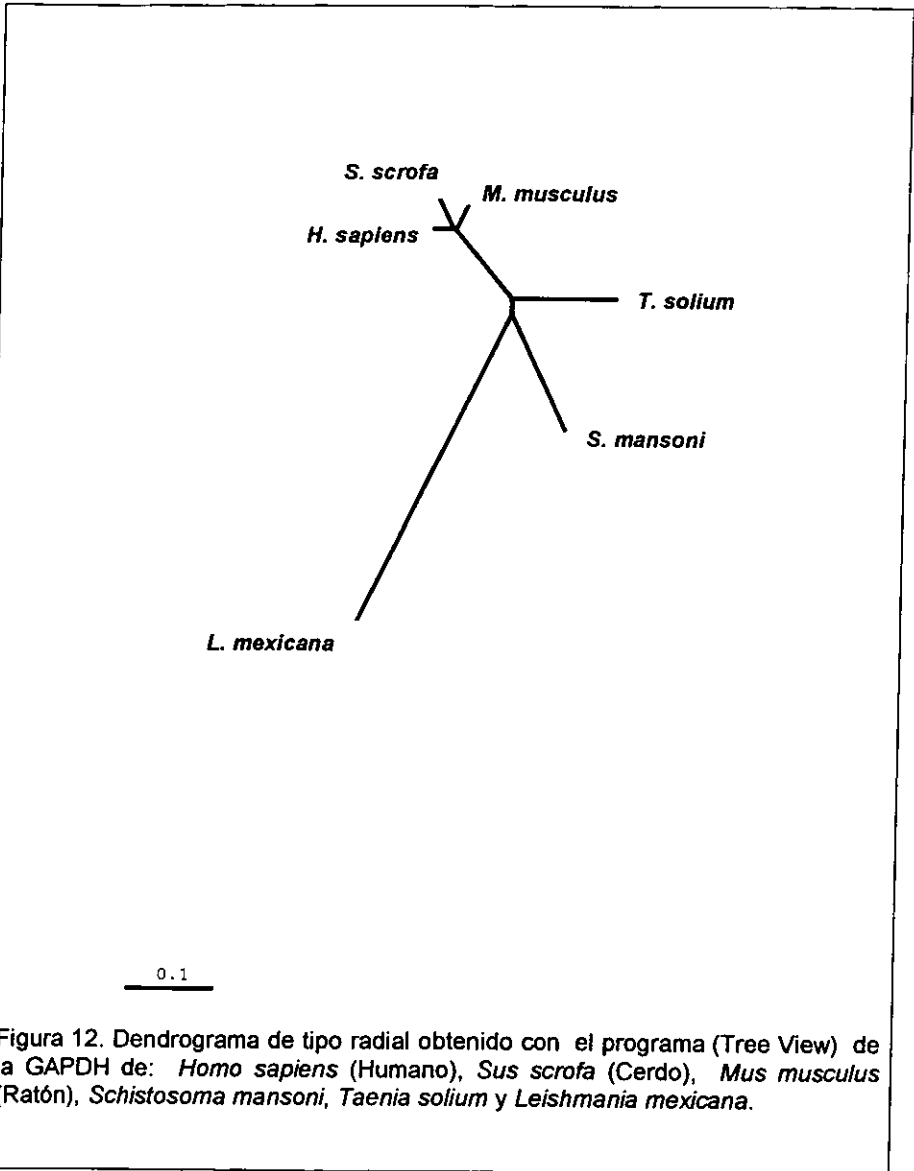
HUMANO KTVVDPGSGK-LWRDGRGAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMFRVPTPNVSVVD
CERDO KTVVDPGSGK-LWRDGRGAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNDGKLTGMFRVPTPNVSVVD
RATON KTVVDPGSGK-LWRDGRGAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMFRVPTPNVSVVD
ESQUISTOSOMA KVVDPGSSK-LWRDGRGAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMFRVPTPNVSVVD
LEISHMANIA KTVVGVSLK-LWRGGRAAAVNIIPSTTGAAKAVGVIPTSTGKLTGMFRVPTPNVSVVD
TSOLIUM KVVDPGSK-AWRDGRGAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMFRVPTPNVSVVD

HUMANO LTCRLEK-PARYDDIKKVVQAASEGP-LKGILGYTEHQVSSDFNSDTHSSSTFDAGA
CERDO LTCRLEK-PARYDDIKKVVQAASEGP-LKGILGYTEHQVSSDFNSDTHSSSTFDAGA
RATON LTCRLEK-PARYDDIKKVVQAASEGP-LKGILGYTEHQVSSDFNSDTHSSSTFDAGA
ESQUISTOSOMA LTCRLGK-GASYEEIKAAVKAASGP-LKGILEYTEDEVVSSDFVSGTSSSI FDKA
LEISHMANIA LTFRATR-DTSIQEIDKAIKGAQTY-MKGILGFTDEELVSSADFINDNRSSVYDSKA
TSOLIUM LTCRLAK-PATYEQIKAAVKTASESPRLKGILEYTEHQVSSDFLSTTCSSTFDASA

HUMANO GIALND----HFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE-----
CERDO GIALND----HFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMMVMASKE-----
RATON GIALND----NFVKLISWYDNEYGYSNRVVDLMMAYMASKE-----
ESQUISTOSOMA GISLNN----NFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLITHMKVDHA-----
LEISHMANIA TLQNNLPGEKRFKVVSWYDNEWAYSHRVVDLVRYMAAKDAASSKM-----
TSOLIUM GIALND----TFVKLIWYDNECGYSNRVVDLINHMKKDH-----

```

Figura 11. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la enzima GAPDH de *T. solium* con otras GAPDH de diferentes organismos obtenidas del banco de datos de GenBank. Los aminoácidos idénticos para todas las GAPDH se marcan en negritas, los - indican ausencia de aminoácidos.



VI. DISCUSIÓN.

Diversos investigadores han propuesto varias formas para solucionar el problema de la cisticercosis, como el diseñar campañas educativas (Sarti, *et al.*, 1992), las cuales han tenido como objetivo el reforzamiento de hábitos higiénicos y dar información acerca de la parasitosis a poblaciones de zonas endémicas, sin embargo, factores socioeconómicos y culturales han impedido que estas campañas tengan el impacto esperado, ya que cuando se han implementado, solo se observan resultados a corto plazo, mientras que a mediano y a largo plazo se ha observado que los niveles de cisticercosis regresan al estado inicial. Las campañas educativas tienen como inconveniente el elevado costo económico y humano que implica el llevarlas a cabo. Otra estrategia propuesta es la de implementar un control sanitario más estricto en los rastros, sobre todo por el tipo de porcicultura que se practica en México. Esto resulta muy complicado, ya que al rededor del 40% de los cerdos que se producen carecen totalmente de un control sanitario, ya que son cerdos que provienen de zonas rurales y rancherías, donde son criados al aire libre quedando exentos de inspección sanitaria. (Manzón-Rubio, 1991). Por otro lado, el control sanitario que existe en las granjas es deficiente si se compara con el que existe en países del primer mundo. Otra estrategia que se ha realizado son las campañas de desparasitación con fármacos antihelmínticos como el praziquantel para desparasitar a los humanos de la *T. solium* adulta (Sarti, *et al.*, 2000). Esto resulta caro y se deben tomar en cuenta los efectos secundarios del suministro de estos fármacos, ya que en algunos pacientes cisticercosos pueden provocar reacciones adversas que causan daño al paciente (Sarti, *et al.*, 1992). Además se ha observado que algunos parásitos como el *Schistosoma* son capaces de generar resistencia en contra de estos fármacos, y por último debemos mencionar que este tipo de compuestos no previenen la reinfección.

El diagnóstico de individuos teniósicos sería un punto muy importante, ya que si bien esta enfermedad no es considerada como un problema de salud pública, contribuye a la dispersión de la cisticercosis y continuidad del ciclo de vida del parásito. El diagnóstico de los individuos teniósicos resulta complicado, ya que estos son pacientes asintomáticos, por lo que el diagnóstico en ocasiones

llega a ser fortuito. Entre las técnicas diagnósticas que se han empleado son las morfológicas y las inmunológicas, estas últimas las más difundidas, pero hasta la fecha no existe un método diagnóstico 100% eficaz, ya que estos métodos presentan problemas tanto de sensibilidad como de especificidad. Además, cuando estos métodos han sido llevados a poblaciones abiertas, sus porcentajes de efectividad tienden a decrecer (Larralde, *et al.*, 1986).

Debido a lo antes mencionado, investigadores han propuesto que el desarrollo de una vacuna podría ser una manera eficaz de erradicar el problema de la cisticercosis (Valdez, *et al.*, 1994), ya que además de conferir inmunidad al huésped, tienen la ventaja de prevenir reinfecciones posteriores. En la cisticercosis, se ha observado que los parásitos son capaces de conferir inmunidad concomitante en el hospedero, es decir que los individuos que han sido infectados previamente, son capaces de protegerse de infecciones posteriores. En los estudios de protección en contra de la cisticercosis se han utilizado para inmunizar extractos crudos de oncosferas, cisticercos y adultos (Molinari, *et al.*, 1983, 1993, Ito, *et al.*, 1993), en los cuales se ha observado que todos son capaces de conferir protección en contra de la cisticercosis. Hasta la fecha los antígenos más eficaces son los extractos provenientes de oncosferas (Ito, *et al.*, 1993). También se han utilizado fracciones semipurificadas provenientes de extractos crudos y proteínas nativas purificadas (Vibanco, *et al.*, 1999) con buenos resultados, pero, estas tienen el inconveniente que para utilizarlas en ensayos de vacunación se tiene que disponer de gran cantidad de parásitos, para producir estos antígenos. Lo que resulta impráctico en el caso de utilizar esto como una estrategia de vacunación. También se han empleado, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos provenientes de otros tenidos mostrando niveles de protección de alrededor del 73% en cerdos (Johnson, *et al.*, 1989, Manoutcharian *et al.*, 1996, Gevorkian, *et al.*, 1996, Plancarte, *et al.*, 1999). Las proteínas recombinantes tienen la ventaja de que se pueden producir en grandes cantidades reduciendo los costos de obtención y purificación del antígeno deseado. Por otro lado, el disponer de gran cantidad de material permite estandarizar, las dosis de antígeno y el uso de diferentes adyuvantes. Actualmente el desarrollo de una vacuna en helmintos está siendo enfocada a la

identificación de moléculas que sean vitales para el parásito, que además sean capaces de conferir protección a largo plazo en contra de la respuesta inmune del huésped.

La enzima GAPDH ha sido empleada con éxito en ensayos de vacunación en contra de la Tripanosomiasis, ya que cuando esta enzima junto con la aldolasa es utilizada para inmunizar ratas confieren hasta un 100% de protección, al reto con tripanosomas (Balaban, *et al.*, 1995). En este mismo sentido la enzima ha sido utilizada en esquistosomiasis mostrando un 30% de protección en ratones inmunizados (Waine, *et al.*, 1993, Argiro, *et al.*, 2000). Por otro lado la GAPDH también se ha empleado exitosamente en el diseño de drogas selectivas en contra parásitos como *Trypanosoma* (Aronov, *et al.*, 1998). Además, estudios epidemiológicos realizados con niños africanos y brasileños mostraron que existían individuos resistentes a la esquistosomiasis (Dessein, *et al.*, 1988). Análisis posteriores revelaron que estos niños poseían un elevado número de anticuerpos que reconocían a una proteína de 37 kDa, la cual correspondió a la GAPDH (Dessein, *et al.*, 1988).

La importancia de la función que la GAPDH desarrolla en el metabolismo de la vía glucolítica, se da mediante la generación de ATP, NADPH y piruvato, elementos importantes para otras vía metabólicas como la fosforilación oxidativa, en procariontes y eucariontes. Además esta enzima en condiciones anaerobias se convierte en la fuente más importante para la generación de ATP en parásitos anaerobios y facultativos como lo son los cisticercos (Cervantes-Vazquez, *et al.*, 1990). Otras funciones de particular relevancia de esta proteína es el hecho de que esta enzima puede llevar a cabo oxidación reversible de tioles oxidados por el H_2O_2 (Brodie, *et al.*, 1987). Esto adquiere importancia, ya que se sabe que uno de los mecanismos de protección en los mamíferos en contra de los parásitos consiste en que macrófagos y neutrófilos producen radicales libres de oxígeno como el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O y el OH^{\cdot} en el proceso denominado explosión respiratoria. Estas moléculas son altamente reactivas y tienen la característica de oxidar moléculas como lípidos, proteínas y DNA. Las proteínas con características

antioxidantes son capaces de proteger a las moléculas de parásitos de daños oxidativos (Selkirk, et al., 1998). Por otro lado, estudios de inmunolocalización demostraron que esta enzima se encontraba distribuida ampliamente en el tegumento del *Schistosoma* (Goudot-Crozel, et al. 1989), lo cual refuerza la idea de que esta enzima podría estar realizando una función protectora. Debido a la importancia de esta enzima en el metabolismo se ha sugerido que podría ser un buen candidato para realizar estudios de vacunación y el diseño de drogas en contra de *T. solium*.

Esto nos motivó a clonar el gen que codifica para la enzima GAPDH de *T. solium*. Por lo que nuestro objetivo inicial fue clonar y caracterizar el gen que codifica para la GAPDH de *T. solium*, como parte de un proyecto mayor que consiste en caracterizar moléculas del metabolismo energético, para evaluar su capacidad protectora en contra de la cisticercosis.

La primera estrategia para aislar el gene de la GAPDH consistió en la identificación y búsqueda de secuencias de cDNAs que codifican para dicha enzima en bancos de datos como GenBank y otros. Los organismos elegidos fueron el humano, el cerdo, el ratón, el *schistosoma* y *leishmania*. Cabe señalar que los dos primeros participan directamente en el ciclo de vida de *T. solium*. Por otro lado el ratón que si bien no es directamente parasitado por la *T. solium*, ha sido utilizado como modelo de laboratorio. Por otro lado, los dos organismos restantes *Leishmania* y *Schistosoma* son parásitos del humano. Cabe señalar el *Schistosoma* está relacionado filogenéticamente con *T. solium*. Por lo antes mencionado era importante tomarlos en cuenta en el diseño de oligonucleótidos que permitiesen amplificar una región de la enzima de *T. solium*.

Continuando con la estrategia se realizaron los análisis de alineamiento e identidad de las secuencias previamente mencionadas, lo que permitió encontrar varios sitios conservados en la estructura primaria de la enzima. Se escogieron los sitios más conservados (NASCTTN y WYDNEYG) para el diseño de dos oligonucleótidos GAPDH-5' y GAPDH-3', respectivamente. El cDNA de cisticercos y DNA genómico de *T. solium* fueron utilizados como plantillas para la PCR.

Esto permitió obtener dos fragmentos de ~500 pb, los que se aproximaban al tamaño esperado según la posición de los oligonucleótidos diseñados. Ambos fragmentos fueron secuenciados mediante la técnica de CircumVent. Al comparar la secuencia de los fragmentos de cDNA y de DNA genómico se observó que ambas eran idénticas, por lo que se pudo establecer que al menos en esa parte del DNA genómico no existían intrones. La secuencia del cDNA fue alineada con varias secuencias reportadas en GenBank, mostrando un elevado porcentaje de identidad con las GAPDHs. Esto nos permitió comprobar que efectivamente teníamos una región de un cDNA que correspondía a una GAPDH de *T. solium*. Por lo que el fragmento de cDNA fue utilizado como sonda para aislar el gen completo de la GAPDH de *T. solium*. De los tamizajes realizados se aislaron 8 clonas de una biblioteca de cDNA de cisticerco clonada en el vector λ gt10. Puesto que se sembraron alrededor de 40, 000 bacteriófagos y se obtuvieron solo 8 clonas, se pudo determinar que este gen está representado en un 0.02%. De estas 8 clonas 6 contenían un inserto de ~1.5 kb y 2 un inserto de ~800 pb. El mapa de restricción realizado para cada una de las clonas mostró que todas las clonas presentaban el mismo patrón, lo que sugería que se trataba de la misma clona o clonas muy relacionadas.

Por tal motivo y por su tamaño de ~1.5 kb la clona 7.2 fue elegida para su caracterización, ya que era probable que contuviese la secuencia completa de la GAPDH. La clona 7.2 fue secuenciada por medio de la PCR utilizando el estuche de CircumVent. El tamaño real de la clona resultó de 1.161 pb, con una región codificante de 1009 pb que traducida a aminoácidos representa a una proteína de 37,391 Da. Los análisis de la secuencia nos confirmaron que la clona codificaba para una GAPDH, ya que se identificaron todos los sitios esenciales para la actividad característica de esta enzima. Cabe señalar que no encontramos variaciones en cuanto al número, posición y tipo de aminoácidos que componen los sitios característicos de la enzima con respecto a otras GAPDHs, lo cual concuerda con la literatura ya que se sabe que estos sitios son altamente conservados a través de la evolución. Otro análisis realizado consistió en la comparación del porcentaje de identidad mediante alineaciones de aminoácidos con enzimas GAPDHs de varias especies, lo que reveló la presencia de regiones

idénticas que se muestran en la Fig. 11. Estas identidades son de importancia evolutiva, ya que se han conservado a través del tiempo y en base a estas se pueden realizar estudios filogenéticos que permitan establecer diferencias entre especies muy cercanas o relaciones con otros grupos como tremátodos o nemátodos. Puesto que existen pocos marcadores para la realización de estudios filogenéticos en los helmintos, nosotros pensamos que la GAPDH podría ser utilizada como marcador para estos estudios, ya que tiene las características de ser una enzima constitutiva que se presenta desde organismos procariontes hasta organismos eucariontes.

Los análisis (Fig. 12) muestran que existen diferencias (~26%) en la secuencia primaria de la GAPDH de *T. solium* con respecto a organismos superiores como mamíferos, en este caso ratón, cerdo y el hombre, estos dos últimos hospederos del metacestodo de *T. solium*. La importancia de estas diferencias radica en que estas pueden ser utilizadas como blancos para vacunación, evitando reacciones autoinmunes o en el diseño de fármacos específicos. Por otro lado, el disponer del gen completo nos permitirá desarrollar otras herramientas moleculares para realizar estudios de tipo bioquímico de la proteína recombinante como determinar su actividad, sus características estructurales y bioquímicas. En el mismo sentido, también permitirá desarrollar sondas como anticuerpos y DNAs para determinar su localización y expresión en los diferentes estadios del parásito, así como en otros parásitos por medio de inmunoelectrotransferencia (reacciones cruzadas) y ensayos de hibridación. Asimismo, permitiría realizar estudios de protección en modelos murinos de *T. crassiceps* -ratón ó *T. taeniaeformis* -rata enfocados al desarrollo de una vacuna en cerdos, o bien estudios de diagnóstico para la cisticercosis humana y porcina. La estructura primaria, y otro tipo de estudios como la cristalización y mutagenésis nos proporcionarán información acerca de las regiones importantes para la función de esta enzima.

Finalmente, es importante mencionar que este es el primer reporte de la clonación del gene que codifica para una GAPDH en cestodos y el aislamiento del segundo gene que codifica para una enzima glucolítica en *T. solium*.

VII. ANEXO.

1.- Amortiguador de cargado (DNA).

EDTA	0.2M
Azul de Bromofenol	0.1%
Xileno cianol FF	0.25%
Ficol en H2O	15%

2.-Amortiguador TE.

Tris-HCL pH 8.0	10.0mM.
EDTA pH 8.0	1.0nM

3.-Amortiguador TAE (50X)

Tris-base	242.0ml
Ácido acetico glacial	57.1ml
EDTA 0.5M pH8	100.0ml

4.-Medio de cultivo SOBm

Bacto-triptona	20.0gr
Extracto de levadura	5.0gr
NaCl	0.5gr
MgSO4 7H2O	10mM
KCL	2.5mM

5.- Medio de cultivo SM

Bacto-triptona	10gr.
Extracto de levadura	5.0gr.
NaCl	10.0gr.

6.- SCC (Solución de Citratos Salina)

NaCl	17.3gr
Citrato de Sodio	88.2gr

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10N y ajustar el volumen a 1 litro con agua desionizada. Esterilizar en autoclave.

7.- Gel de Agarosa 1%.

Agarosa	0.5gr
Amortiguador TAE	50ml
Bromuro de etidio	4µl

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Acevedo-Hernandez A.** Economic Impact of porcine cysticercosis. In: Cysticercosis. Present state of Knowledge and perspectives; Academic Press, New York, 1982. p 63.
- Alberts, B.,** Bray., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD. Molecular Biology of the Cell. Garland publishing. 1998. p 70-71.
- Aluja, S. A.** Frecuency of porcine cysticercosis in Mexico. In Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives.(eds). Academic Press, New York, 1982 p. 53-62.
- Argiro, L;** Henri, S; Dessein, H; Kouriba, B; Dessein, A.; et. al., Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorbition with GM-CSF on alum. Vaccine. 2000 Apr 3;18(19):2033-8.
- Argiro L,** Kohlstadt S, Henri S, Dessein H, Matabiau V, Paris P, Bourgois A, Dessein AJ. Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH. Vaccine. 2000 Apr 3;18(19):2039-48.
- Aronov AM,** Verlinde CL, Hol WG, Gelb MH. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. J Med Chem. 1998 Nov 19;41(24):4790-9.
- Balaban N,** Waithaka HK, Njogu AR, Goldman R. Intracellular antigens (microtubule-associated protein copurified with glycosoma enzymes)--possible vaccines against trypanosomiasis. J Infect Dis. 1995 Sep;172(3):845-50.
- Botero D,** Tanowitz HB, Weiss LM, Wittner M. Taeniasis and cysticercosis. Infect Dis Clin North Am. 1993 Sep;7(3):683-97. Review.
- Brodie AE,** Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. Biochem Biophys Res Commun. 1987 Oct 14;148(1):120-5.
- Butterworth AE,** Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH, et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(3):393-408.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Caswell AH**, Corbett AM. Interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with isolated microsomal subfractions of skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1985 Jun 10;260(11):6892-8.
- Cervantes-Vazquez M**, Correa D, Merchant M, Hicks JJ, Lactette JP. Respiratory changes associated with the in vitro evagination of *Taenia solium* cysticerci. *J Parasitol*. 1990 Feb;76(1):108-12.
- Cheng, T**. Parasitology General. Academic press college. 1986.
- Coker-Vann MR**, Subianto DB, Brown P, Diwan AR, Desowitz R, Garruto RM, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC ELISA antibodies to cysticerci of *Taenia solium* in human populations in New Guinea, Oceania, and Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981 Dec;12(4):499-505.
- Cogle WG**, Lightowers MW, Bogh HO, Rickard MD, Johnson KS. Molecular cloning of *Taenia taeniaeformis* oncosphere antigen genes. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Mar;45(1):137-46.
- Creasy JL**, Alarcon JJ. Magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. *Top Magn Reson Imaging* 1994 Winter;6(1):59-68.
- Dessein AJ**, Begley M, Demeure C, Caillol D, Fueri J, dos Reis MG, Andrade ZA, Prata A, Bina JC. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. *J Immunol*. 1988 Apr 15;140(8):2727-36.
- Escobar A**, Nieto D. Parasite diseases, in pathology of nervous system. Minckler J,(ed). New York Mc Graw Hill;1972, p 2507-2515.
- Espejo H**. Treatment of infections by *Hymenolepis nana*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* and *Diphyllobothrium pacificum* with praziquantel. *BoI Chil Parasitol* 1977 Jan-Jun;32(1-2):39-40.
- Espinoza B**, Flisser, Plancarte A, Larralde C. Immunodiagnosis of human cysticercosis: ELISA and immunoelectrophoresis. In *Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives*.(eds). Academic Press, New York, 1982. p. 163-170.
- Flisser A**, Tarrab R, Willms K, Larralde C. Immunoelectrophoresis and double immunodiffusion in the diagnosis of human cerebral cysticercosis. *Arch Invest Med (Mex)* 1975;6(1):1-12

- Flisser A.** Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today*. 1988 p 131-137.
- Flisser A,** Plancarte A, Correa D, Rodriguez-Del-Rosal E, Feldman M, Sandoval M, Torres A, Meza A, Parkhouse RM, Harrison LJ, *et al.* New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65 Suppl 1:95-8.
- Gevorkian G,** Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciuotto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett*. 1996 Mar;49(3):185-9.
- González, D.,** Sandoval, M., Trujillo, V. Reaccion de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. *Arch. Invest. Méd.* 1978. Vol. 9 p. 51-58.
- Goudot-Crozal, V.,** Cailloü, D., Djabali, M., Dessein, J., 1989. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD Glycerinaldehyde-3p-Dehydrogenase. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):2065-80.
- Huitorel P,** Pantaloni D. Bundling of microtubules by glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem*. 1985 Jul 15;150(2):265-9.
- Ito A,** Hashimoto A. Vaccination with hatched but non activated, non-viable oncospheres of *taenia taeniformis* in rats. *J. Helmintho*; 67 2p. 165-8, 1993.
- Johnson KS,** Harrison GB, Lightowers MW, O'Hoy KL, Cogle WG, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG, Heath DD, Rickard MD. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 1989 Apr 13;338(6216):585-7.
- Laclette JP,** Ornelas, Y., Merchant, MT., Willms, K. Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. . In: *Cysticercosis. Present state of Knowledge and perspectives*; Academic Press, New York , 1982. p 337.
- Larralde C,** Laclette JP, Owen CS, Madrazo I, Sandoval M, Bojalil R, Sciuotto E, Contreras L, Arzate J, Diaz ML, *et al* . Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Sep;35(5):965-73

- Laralde C**, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, Coltorti E
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 Mar;40(3):282-90.
- Lombardo L**. Cerebral cysticercosis in Mexico. Diagnosis. *Gac Med Mex*. 1982 Jan;118(1):4-13.
- Madrazo I**, Renteria JA, Paredes G, Olhagaray B. Diagnosis of intraventricular and cisternal cysticercosis by computerized tomography with positive intraventricular contrast medium. *J Neurosurg* 1981 Dec;55(6):947-51.
- Mahan R. C**. Geographical Distribution of Human Cysticercosis. *Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives*; .(eds). Academic Press, New York, , 1982. p. 39.
- Malagón, F**. Elementos del binomio Taeniasis/Cisticercosis: Una síntesis. Flisser A., Malagón F., eds *Cisticercosis Humana y Porcina*. 1989 .Limusa Noriega; p 3-6.
- Manoutcharian K**, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol*. 1996 Apr;82(2):250-4.
- Mazón-Rubio, J**. La porcicultura mexicana ante el TLC. 1991. *Desarrollo Porcícola* 32:13-16.
- Molinari JL**, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P, Retana A *Taenia solium*: immunity in hogs to the *Cysticercus*. *Exp Parasitol* 1983 Jun;55(3):340-57.
- Molinari JL**, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepúlveda J, Palet A Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 1993 Oct;49(4):502-12.
- Nascimento E**, Nogueira PM, Tavares CA. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with escolex protein antigens. *Parasitol Res* 1987;73(5):446-50.
- Nascimento E**, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995 Mar;45(1-2):127-37.

- OMS.** Zonosis Parasitarias. Informe de un comité de expertos. Serie de informes técnicos No. 637.
- Pawlowski ZS** . Control of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis by focus-oriented chemotherapy of taeniasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991 Dec;22 Suppl:284-6.
- Plancarte A**, Flisser A, Gauci CG, Lightowers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. Int J Parasitol. 1999 Apr;29(4):643-7.
- Sarti E**, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Lopez AS, Roberts J, Flisser A Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. Am J Trop Med Hyg 1992 Jun;46(6):677-85
- Sarti E**, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000 Jan-Feb;94(1):85-
- Schantz PM**, McAuley J Current status of food-borne parasitic zoonoses in the United States. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991 Dec;22 Suppl:65-71.
- Sciutto E**, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernandez M, Villalobos MN, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezensky T, et al. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. Vet Parasitol. 1995 Nov;60(1-2):53-67.
- Ramos-Kuri M**, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. Arch Neurol 1992 Jun;49(6):633-6.
- Tsang VC**, Brand JA, Boyer AE An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis 1989 Jan;159(1):50-9.

Valdez F, Hernandez M, Govezensky T, Fragoso G, Sciutto E Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J Parasitol* 1994 Dec;80(6):931-6.

Vibanco-Perez N, Jimenez L, Merchant MT, Landa A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol*. 1999 Jun;85(3):448-53.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Feb;76(2):615-9.

Waine GJ, Becker M, Yang W, Kalinna B, McManus DP. Cloning, molecular characterization, and functional activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against schistosomiasis japonica. *Infect Immun*. 1993 Nov;61(11):4716-23.