



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Aislamiento y caracterización del ADNc que codifica
para la isoforma de la Glutación S-transferasa de 26.5
kDa de *Taenia solium*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ANAYETZIN TORRES RIVERA



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Torres Rivera Anayetzin


FECHA: 30/enero/04

FIRMA: Torres Rivera Anayetzin

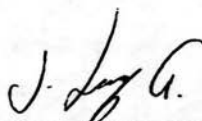
Jurado asignado

Presidente: Bertha Resendiz Vázquez
Vocal: Herminia de Jesús Loza Tavera
Secretario: Abraham Landa Piedra
1er. Suplente: Francisco Hernández Luis
2do. Suplente: Teresa de Jesús Olivera Flores


El trabajo de investigación que se presenta fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra.



Dr. Abraham Landa Piedra
Asesor del tema



Dra. Lucía Jiménez García
Supervisor técnico



Anayetzin Torres Rivera
Sustentante

El trabajo de investigación que se presenta fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el contrato 35333-M que corresponde al proyecto "Enzimas recombinantes para el diseño de una vacuna contra la cisticercosis por *Taenia solium*".

La alumna Anayetzin Torres Rivera (No. de cuenta: 9627777-5) recibió beca por parte de CONACyT (No. de registro: 5457)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Abraham Landa Piedra por la asesoría y tiempo dedicados a mi formación y al desarrollo de ésta tesis. A la Dra. Lucía Jiménez García por la supervisión y enseñanza de las técnicas utilizadas en el proyecto.

Mil gracias a todas las personas (mis amigos) del Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina por la generosidad y afecto que me han brindado.

Gracias al jurado del examen conformado por:

Presidente:	Bertha Resendiz Vázquez
Vocal:	Herminia de Jesús Loza Tavera
Secretario:	Abraham Landa Piedra
1er. Suplente	Francisco Hernández Luis
2do. Suplente	Teresa de Jesús Olivera Flores

DEDICATORIAS

A mi papá por todo el soporte dado a través de la carrera y de mi vida

A mi mamá (mi chiquita), por todos los cuidados, mimos y regañadas que me ayudaron a continuar hasta cumplir las metas.

A mi hermana, por los viejos tiempos...

A los niños escandalos y anexas de M.V.Z., que más que amigos son mi familia y que agradezco enormemente que compartan conmigo su espacio, su tiempo y su cariño, sin el cual me hubiera sido imposible aprender a... y continuar. Están totalmente correspondidos.

A mis profesores, que brindaron sin recelos los conocimientos que tenían.

Y por supuesto al súper equipo del Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina encabezado por el Dr. Landa y conformado por Alicia, Agustín, Alejandro, Felipe, José, Isela, Iaraset, Lucía, Martha, Mario, Noé, Patricia, Pola, Ricardo y Víctor, que siempre me apoyaron y me impulsaron a terminar ésta etapa.

INDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas	7
Resumen	8
I. Introducción	9
1.1 <i>Taenia solium</i>	9
1.1.1 Agente etiológico	9
1.1.2 Ciclo biológico de la <i>Taenia solium</i> y transmisión	12
1.1.3 Epidemiología	13
1.1.3.1 Teniosis	14
1.1.3.2 Cisticercosis humana	14
1.1.3.3 Cisticercosis porcina	14
1.1.4 Cuadro clínico	15
1.1.5 Diagnóstico	16
1.1.5.1 Estudios de neuroimagen	17
1.1.5.2 Pruebas inmunológicas	19
1.1.6 Tratamiento	19
1.1.6.1 Fármacos cestocidas	20
1.1.6.2 Tratamiento sintomático	21
1.1.6.3 Cirugía	21
1.1.7 Control de la cisticercosis	21
1.2 Respuesta inmunológica	22
1.3 Especies reactivas de oxígeno	23
1.4 Sistemas de detoxificación	24
1.5 Familia de enzimas que utilizan Glutación	25
1.6 La Glutación S-transferasa	26
II. Justificación del proyecto	30
III. Hipótesis	31
IV. Objetivos	32
4.1 Objetivos Generales	32
4.2 Objetivos particulares	32

V. Material y Métodos	33
5.1 Material biológico	33
5.2 Reactivos	33
5.3 Obtención de una sonda	34
5.4 Marcaje radioactivo	34
5.5 Aislamiento de clonas (tamizaje)	34
5.6 Purificación de ADN a partir de fagos	35
5.7 Reacciones en cadena de la Polimerasa (PCR)	36
5.8 Ligación	36
5.9 Transformación	36
5.10 Preparación grande de ADN plasmídico	36
5.11 Secuenciación	37
5.12 Digestiones con endonucleasas de restricción	37
5.13 Análisis tipo Southern	38
5.14 Análisis de la secuencia	38
VI. Resultados	39
6.1 Producción de la sonda	39
6.2 Aislamiento y obtención de clonas	40
6.3 Secuenciación	42
6.4 Análisis del gen de la GST26.5	43
VII. Discusión de Resultados	47
VIII. Conclusiones	51
IX. Anexo	52
X. Referencias	53
10.1 Hemerográficas	53
10.2 Bibliográficas	56
10.3 Electrónicas	57

Abreviaturas

2X: Dos veces la concentración
5X: Cinco veces la concentración
10X: Diez veces la concentración
 αP^{32} : Fósforo 32 alfa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario
ARE: Elementos de respuesta antioxidante
ARN: Ácido Ribonucleico
°C: Grados centígrados
c.b.p. = cuanto baste para
ddATP: Trifosfato de dideoxiadenosina
ddCTP: Trifosfato de dideoxicitosina
ddGTP: Trifosfato de dideoxiguanina
ddTTP: Trifosfato de dideoxitimina
ddNTPs: Trifosfato de dideoxinucleótidos
dNTPs: Trifosfato de desoxirribonucleotidos
EDTA: Etilendiaminetetracetato
GCL: Glutamato-cistein ligasa
GRE: Elementos de respuesta a glucocorticoides
GS: Glutación sintetasa
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
GST: Glutación S-transferasa
IgG: Inmunoglobulina clase G
IRM: Imagen por Resonancia Magnética
Kb: Kilobases
KDa: Kilodaltones
LCR: Líquido Cefalorraquídeo
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PAPS: 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato
RER: Retículo endoplásmico rugoso
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR: Reacción de la cadena de la polimerasa con Transcriptasa reversa
SAM: S-adenosilmetionina
SDS: Dodecil sulfato de Sodio
TC: Tomografía computarizada
Trx: Tioredoxina
UDPG: Ácido uridin-5-difosfo- α -D-glucorónico
UGT: Uridin-5-difosfato-glucoronil-transferasa ó UDP-glucoronil-transferasa
XRE: Elementos de respuesta a xenobióticos

Resumen

La *Taenia solium* es el agente etiológico de la cisticercosis y teniosis, dichas enfermedades representan un problema económico y de salud pública no sólo en países en vías de desarrollo, sino también en países desarrollados que han visto resurgir tales padecimientos debido a las migraciones. La neurocisticercosis representa la forma más letal de la cisticercosis y es causada por la larva de *T. solium*. Esta enfermedad produce grandes pérdidas económicas debido a toda la sintomatología y secuelas que acompañan a los pacientes, así como a los gastos de tratamiento. En contraste, la teniosis, enfermedad causada por el estadio adulto del parásito, sólo suele presentar ligeros síntomas clínicos, no obstante los individuos portadores del parásito son un riesgo debido a la producción y diseminación de huevos que pueden causar cisticercosis a los hospederos intermediarios, el hombre y el cerdo.

Debido a la alta infectividad de este parásito y a la amplia distribución mundial de estas enfermedades así como las pérdidas económicas que constituyen, el estudio sobre *T. solium*, que ha tomado diferentes ramas de investigación, se centra en la posibilidad de romper el ciclo de vida de este animal y erradicar así los problemas que genera. Una estrategia viable se basa en la posibilidad de inhibir cierto grupo de enzimas del metabolismo o del sistema de detoxificación que son esenciales para este parásito, entre éstas se encuentra la familia de la enzima glutatión S-transferasa, la cual se clasifica como una enzima perteneciente a la fase II del sistema de detoxificación.

Múltiples estudios han demostrado la relevancia de esta familia de enzimas, la cual es capaz de inactivar xenobióticos y sustancias endógenas de naturaleza electrofílica, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que al entrar en contacto con las estructuras celulares forman radicales como son los hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos, capaces de oxidar lípidos, proteínas, carbohidratos y otras macromoléculas propagando así el daño celular. En este caso, las ROS se forman vía células de la inmunidad y son arrojadas al parásito con el fin de destruirlo. Sin embargo, como lo señalan varias publicaciones, éstos están capacitados para combatir las ROS utilizando enzimas como la GST, la cual además se ha postulado como el principal sistema de detoxificación en helmintos.

En este trabajo se muestra el aislamiento y la caracterización del ADNc que codifica la GST de 26.5 kDa de *Taenia solium*.

I. Introducción

1.1 *Taenia solium*

1.1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Taenia solium

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminths

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Genero: *Taenia*

Especie: *solium*

La *Taenia solium* es un cestodo armado que posee en el escólex (órgano de fijación del parásito) una doble corona de ganchos, en número de 22 a 32, con un tamaño de 110 a 180 micras, además de cuatro ventosas en forma de copa [2]. El escólex mide 1mm de diámetro y todo el parásito completo de 2 a 5 m de longitud. Es en el escólex donde se encuentra el principal centro nervioso, de donde parten los ganglios neuronales del gusano para enervar todo el estróbilo mediante los nervios longitudinales, en donde fluctúan alrededor de 20 diferentes neuropéptidos (de tipo colinérgico, serotoninérgico y otros) que desarrollan una función sensorial tacto y quimiorreceptiva. La neuroanatomía de los cestodos se compone de nervios no mielinizados por lo que el estudio de los sistemas nerviosos central y periférico se han realizado a través de técnicas inmunocitológicas[46].

Después del escólex sigue el cuello que es corto, de aproximadamente la mitad del grosor del escólex, en el cuello se encuentran células pluripotenciales también conocidas como células "madre" que son las responsables de la formación de nuevos proglótidos[46].

Enseguida del cuello están los proglótidos que de acuerdo a su estado de madurez reproductiva y localización se clasifican en inmaduros, maduros y grávidos que en número de 800 a 1000 forman el estróbilo, cabe resaltar que los proglótidos maduros y grávidos son de tipo monoicos (hermafroditas). Los proglótidos grávidos miden 1cm de largo por 7 cm de ancho aproximadamente y se encuentran en la región distal (final) del estróbilo, asimismo pueden contener hasta 40,000 huevos en sus ramas uterinas, las cuales no exceden de 14. Cada huevo mide entre 30 a 40 micras de diámetro, son de paredes gruesas y radiadas, encierran en su interior al embrión hexacanto u oncosfera que es la forma infectante para el cerdo o para el hombre[2, 46, 48].



Figura 1A. Fotografía de *T. solium* donde puede apreciarse la corona de ganchos (rostelo, R) y ventosas (S) que componen el escólex y el cuello (N). [33]

La oncosfera madura es una larva globular de 30 μm de diámetro la cual está compuesta de algunos cientos de células diferenciadas (se aprecian músculos y parte del sistema nervioso y excretor), tiene seis ganchos y un par de glándulas de penetración que le ayudan en la migración [2].

El desarrollo postoncosférico a larva ocurre dentro del hospedero intermedio, que para el caso de *T. solium* es el cerdo, ahí la oncosfera cambia rápidamente de forma sólida a una vesícula llena de fluido opalescente con un escólex invaginado que se denomina metacestodo o cisticerco.

El metacestodo es la forma juvenil o larvaria del parásito y alcanza un tamaño aproximado de 5-8 mm x 3-6 mm en 60 a 70 días presentando una forma vesicular y ovoide llena de fluido vesicular con un pequeño escólex invaginado que revierte su posición cuando la pared vesicular se rompe, permitiendo la fijación del parásito y su posterior desarrollo [2].

Teniosis es el término utilizado para la enfermedad que es causada por el adulto mientras que cisticercosis hace referencia al estado larvario de la *Taenia*. El desarrollo del metacestodo o cisticerco hacia una forma adulta capaz de producir huevos toma aproximadamente 2 meses.

La *T. solium* como cualquier otro cestodo carece de tracto digestivo por lo que requiere absorber los nutrientes a través de su cubierta externa denominada tegumento. La estructura tegumental que recorre el cuerpo (estróbilo) del parásito está cubierta de microvellosidades llamadas microtrícas que aumentan el área de absorción del tegumento. Las microtrícas se encuentran cubiertas por un glicocálix en su membrana que potencia la permeabilidad hacia cationes y sales biliares pero también incrementa la actividad de la amilasa, tripsina, quimiotripsina y lipasa pancreática del hospedero.

Debajo de las microtricas se encuentra el citoplasma distal conformado por varias células subtegumentales que contienen gran cantidad de vesículas, cuerpos de alta densidad electrónica y numerosas mitocondrias, este citoplasma es continuo, es un sincicio que se conecta a otras estructuras a través del proceso internuncial, el cual corre a través de la pared muscular[46].

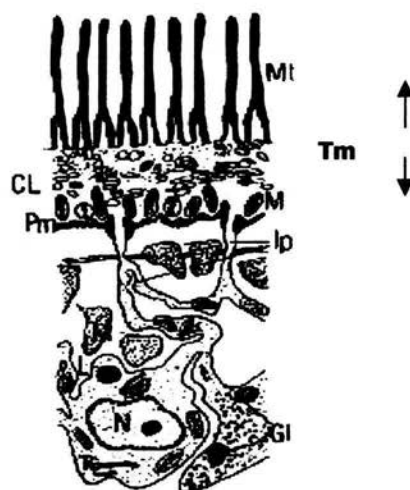


Figura 1B. Esquema del tegumento de *T. solium* donde se muestran la membrana tegumentaria (Tm), las microtricas (Mt), citoplasma (CL), mitocondrias (M), la membrana basal (Pm), el proceso internuncial (Ip), depósitos de glicógeno (Gl), núcleo (N), depósitos de lípidos (L). [33]

El sistema muscular esta compuesto de miofibrillas y miocitos, éstos últimos constituyen la masa de la parénquima del gusano y son la forma no contráctil del sistema. Los miocitos tiene núcleo, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas, un aparato de Golgi vesicular, mitocondrias y abundante glicógeno. Embebidas a través de la parénquima se encuentran las células en flama del protonefridio que alimenta los canales principales de excreción, éstos canales se encuentran en posición ventrolateral y dorsolateral a lo largo del estróbilo que desemboca en una vejiga con un poro que da hacia el exterior. Los ductos de excreción están alineados con las microvellosidades lo que sugiere que tiene una función de transporte no sólo de desechos sino también de fluidos con iones que permiten la osmorregulación, la cual se anota como otra función de la superficie tegumental. Es importante destacar que las células en flama contienen flagelos que proveen al sistema de la fuerza necesaria para la movilización de fluidos[46].

Una estructura que se encuentra en la mayoría de los tejidos de éste cestodo son los cuerpos o corpúsculos calcáreos que tienen un tamaño aproximado de 12 a 32 μm de diámetro y están constituidos por compuestos inorgánicos, principalmente carbonatos de calcio y magnesio, así como fosfato de calcio hidratado, embebidos en una matriz orgánica, ésta última organizada dentro de anillos concéntricos y una envoltura exterior. La matriz contiene proteínas, lípidos, glicógeno, mucopolisacáridos, fosfatasa alcalina, ARN y ADN. La función de los cuerpos calcáreos aún no está definida[46].

1.1.2 CICLO BIOLÓGICO DE LA *Taenia solium* Y TRANSMISIÓN

De las especies de cestodos que pueden invadir al hombre, la *T. solium* posee un ciclo sencillo que requiere sólo de dos huéspedes para realizarse: los humanos (los cuales son los únicos hospederos definitivos del adulto) y los cerdos, que junto con los humanos, pueden actuar como hospederos intermediarios de la larva, siendo el cerdo el intermediario natural mientras que el hombre actúa como hospedero accidental [2, 48].

La *T. solium* adulta habita en el tubo digestivo del ser humano, donde se mantiene firmemente adherido a la pared intestinal mediante sus ventosas y ganchos. Cada día, varios proglótidos grávidos (cinco en promedio) se separan del extremo distal de la *Taenia* y son expulsados con las heces. Cada proglótido contiene miles de huevos que se liberan en el ambiente y que pueden permanecer viables durante largo tiempo.

En lugares donde la eliminación de excretas es inadecuada, los cerdos se alimentan con heces humanas e ingieren los huevos de la *T. solium*. Una vez ingeridos por el cerdo, los huevos pierden su cubierta por acción de enzimas digestivas como la tripsina y las sales biliares, liberándose las oncosferas, que atraviesan la pared intestinal y entran al flujo sanguíneo desde donde son transportados a los tejidos del cerdo, principalmente músculos estriados y cerebro. En dichos tejidos, las oncosferas evolucionan y se transforman en larvas (cisticercos). Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida y contaminada con cisticercos, las larvas se evaginan en el intestino delgado, el escólex se adhiere a la pared intestinal y el parásito comienza a crecer y a formar proglótidos para dar forma a una *Taenia* adulta [2, 48].

Por otra parte, el hombre puede también convertirse en huésped intermediario de la *T. solium* al ingerir sus huevos; bajo estas circunstancias se desarrolla la cisticercosis humana. El mecanismo por el cual los huevos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos del hombre es similar al descrito en los cerdos. Las formas principales de contagio humano incluyen ingestión de comida y agua contaminada con huevos de *T. solium* y contaminación ano-mano-boca en individuos portadores del parásito los que pueden auto-infectarse o infectar a otras personas, sobretodo a sus contactos domésticos[2, 48].

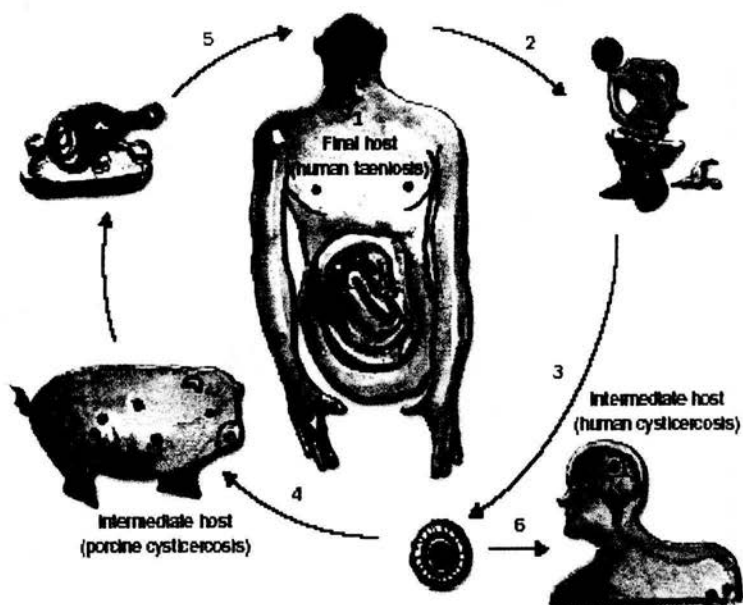


Figura 1C. Ciclo de vida de *Taenia solium*. (1) El parásito adulto habita en el intestino humano, su hospedero definitivo; (2) Los huevos de *T. solium* son excretados en las heces (3) y diseminados al ambiente; (4) El cerdo es infectado por los huevos del parásito; (5) El humano adquiere una infección intestinal por consumir carne de cerdo mal cocinada y con cisticercos; (6) Los humanos también pueden desarrollar cisticercosis al ingerir huevos de *T. solium* por contacto con portadores o por alimento contaminado [2]

1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La infección con *T. solium* se encuentra ampliamente distribuida por el mundo siendo endémica en los países en vías de desarrollo como en Latinoamérica, Asia y África, esto se debe principalmente a los deficientes sistemas de salubridad aunque también hay que anular los hábitos alimenticios y las costumbres religiosas.

En México y algunos otros países, los estudios y estadísticas del porcentaje de población humana y porcina afectada no son reales ya que no existe el seguimiento bien documentado de la incidencia y prevalencia de éste parásito, así que solo existen estimados provenientes de fuentes diversas como son las investigaciones científicas y las estadísticas oficiales derivadas de estudios hospitalarios y necropsias [30].

1.1.3.1 Teniosis

Las frecuencias de infecciones en México se sitúan entre 0.2 a 2.4% según lo indican diversos estudios científicos, en el caso de las estadísticas oficiales se notificaron en 1991 ocho mil casos [9, 30].

En otros países de Latinoamérica, como Perú, Bolivia, Ecuador y Guatemala el rango de infecciones va del 1 al 8.6% [9]. Para Asia el intervalo de personas infectadas es muy amplio, ya que puede ir del 0.1% como ocurre en China hasta el 50% como en Nepal [26]. En África es muy difícil siquiera hacer un estimado del número de teniosicos ya que no existen estadísticas actuales al respecto, sólo algunos conteos en pocos países, por ejemplo en Kenia donde se indica un aproximado del 2% en el reporte anual del Ministerio de Salud del 2001 de ese país [20].

1.1.3.2 Cisticercosis humana

Los estudios epidemiológicos realizados en diversas comunidades de México arrojan un intervalo que abarca del 3.7 al 12.2% de la población, mientras que para los países de Latinoamérica antes mencionados el rango es de 5 a 24 % [9].

En Asia se reporta que el 1.7 al 13% de la población está afectada, sin embargo esta cifra no es real ya que varios países, como la India y Corea, no existe información disponible [26]. África presenta un caso similar, en el continente presumiblemente el 10% de la población presenta esta afección [20].

1.1.3.3 Cisticercosis porcina

Para México se reporta una cifra de 1 al 35% de cerdos infectados que son criados en granjas familiares. En 1991 se reportó una tasa anual de infección del 0.22% en cerdos criados en ranchos industrializados [9, 30].

En el resto de los países Latinoamericanos, en especial Perú, se reporta hasta 61% de cisticercosis porcina [9]. Asia reporta en ciertas regiones, como en China, incidencias por encima del 40% [26], mientras que en África se reporta valores del 33% (Mozambique) [20].



Figura 1D. Zonas de distribución de teniosis/ cisticercosis. Las zonas marcadas en negro representan las zonas de alta prevalencia (zonas endémicas); las marcadas en gris son las zonas de prevalencia moderada; las zonas en un gris tenue son de baja prevalencia, donde los casos son importados; por último en las zonas en blanco no existe información disponible. Los recuadros sobre el territorio estadounidense representan las áreas endémicas de aquel país [2].

1.1.4 CUADRO CLÍNICO

La teniosis suele cursar de manera asintomática ya que se produce un daño mínimo a la mucosa intestinal, en cuanto a la cisticercosis la gama de síntomas depende de la localización del cisticerco, su cantidad y la respuesta inmune del hospedero. Aunque también puede cursar sin síntomas [30].

Para el caso de la cisticercosis las manifestaciones más comunes suelen ser fiebre, mialgias, cefaleas y eosinofilia, después de una invasión corta y diseminación aguda de cisticercos, si se enquistan en el músculo esquelético la mayor problemática proviene en la pérdida de funcionalidad de la parte afectada. Pero cuando se alojan en el Sistema Nervioso Central (SNC), pueden producir grandes complicaciones por el efecto de masa, respuesta inflamatoria u obstrucción de los orificios encefálicos o sistemas ventriculares causando hidrocefalia por bloqueo del fluido del líquido cefalorraquídeo, o convulsiones por la masa que ocupa en el cerebro, también se pueden presentar cambios en los sistemas sensoriales, hipertensión craneal que incluye vómito y papiledema, epilepsia focal o generalizada, ataxia, síntomas pseudo-apopléjicos, movimientos involuntarios e incluso demencia.

No todos los síntomas se presentan a la vez, depende de la localización del cisticerco y de su viabilidad. Por ejemplo, los ataques son el principal síntoma de un cisticerco coloidal o uno nodular ubicado en la parénquima, mientras que la hipertensión craneal y las anomalías de los nervios craneales son característicos de cisticercos ubicados en la aracnoides, cuando esta parte está afectada también se pueden producir trombosis e isquemia [2, 48].

1.1.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico para la teniosis se realiza por la identificación de proglótidos excretados, o por el análisis de los huevos, o por antígenos coproparasitológicos e incluso por algunas técnicas moleculares como la PCR. La desventaja para la aplicación de varias de estas pruebas consiste en la obtención de proglótidos o huevos, además de que estas técnicas no han demostrado ser lo suficientemente específicas y sensibles [30, 46].

Si se trata de neurocisticercosis, la interpretación correcta de los exámenes de neuroimagen e inmunológicos permite un diagnóstico acertado. Fuera del neuroeje, los cisticercos pueden localizarse en el globo ocular donde son visualizados mediante examen oftalmoscópico y en los músculos esqueléticos o el tejido celular subcutáneo, donde pueden identificarse mediante radiografías simples o incluso la palpación. Sin embargo el diagnóstico no es muy sencillo ya que los síntomas no son específicos lo que provoca que los estudios que se requieren para la detección de los cisticercos no sean pedidos en muchas ocasiones por los médicos generando dictámenes erróneos. Además los estudios de neuroimagen como la tomografía computarizada (TC) y la imagen por resonancia magnética (IRM) no son accesibles a la mayoría de la población [48].

El parásito al alojarse dentro del SNC ocasiona quistes parasitarios, granulomas, calcificaciones, cambios del tamaño y la morfología de cavidades ventriculares, edema alrededor de los quistes, infartos cerebrales, quistes intraventriculares y combinaciones de estas, así que las observaciones al microscopio demuestran la proliferación de eosinófilos y macrófagos (que inician el ataque contra el parásito), y células típicas de reacciones granulomatosas, como células gigantes multinucleadas y epiteloides. Además se observan linfocitos y células plasmáticas en tejidos más alejados [2, 48].

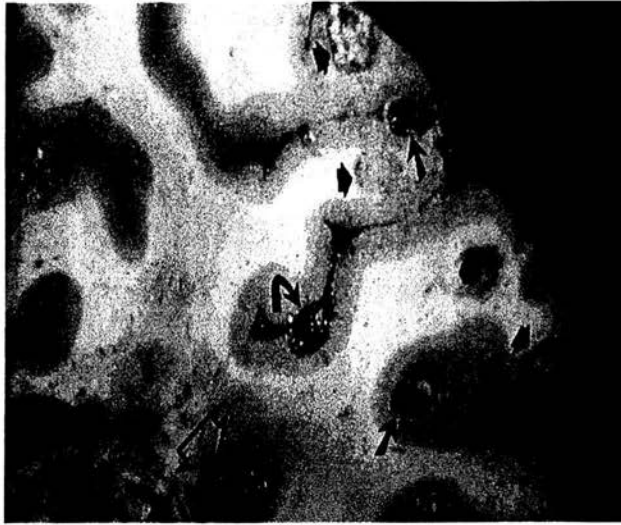


Figura 1F. Aspecto macroscópico de cisticercos parenquimatosos en diversos estadios evolutivos: quistes vesiculares (flecha recta), quistes coloidales (flecha curva), granulomas (cabeza de flecha) y calcificaciones (flecha abierta). [48]

1.1.5.1 Estudios de neuroimagen

La TC y la IRM son las principales herramientas en el diagnóstico de la neurocisticercosis, ya que permiten visualizar el número y localización de los parásitos así como su estado evolutivo. De hecho, los hallazgos de TC e IRM en la neurocisticercosis dependen fundamentalmente del grado de viabilidad de los cisticercos. De estos hallazgos, los más característicos son las lesiones quísticas bien definidas en las que es posible identificar el escólex en su interior y las calcificaciones puntiformes múltiples, para lo cual la IRM y la TC muestran resoluciones distintas. Por el contrario, las lesiones anulares (únicas o múltiples) no son específicas y representan un problema diagnóstico. Diversas entidades, incluyendo abscesos cerebrales, tuberculomas y neoplasias primarias o secundarias del sistema nervioso pueden cursar con lesiones similares en TC o IRM. En algunos de estos casos, ni siquiera la práctica de estos exámenes complementarios tales como angiografía o estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) permiten un diagnóstico certero [48].

Como se menciona anteriormente, existen otros estudios que complementan el diagnóstico con neuroimagen como lo son los cambios en el LCR, por ejemplo, una pleiocitosis mononuclear moderada (entre 0.2 a 0.3×10^3 cel/L), una concentración alta de proteínas (cuando el rango normal es de 0.5 a 2.0 g/L) y una concentración normal de glucosa son signos relacionados con una localización extraparenquimal de cisticercos. Estas anomalías del LCR son señales de aracnoiditis o meningitis crónica, que en ocasiones es difícil de distinguir de las infecciones granulomatosas causadas por otros agentes etiológicos.

En el caso de cisticercos ventriculares, éstos se visualizan como lesiones quísticas que distorsionan el sistema ventricular y producen hidrocefalia asimétrica. Estos quistes suelen ser isodensos con el LCR y no se aprecian bien con la TC, por lo que suele ser necesaria una IRM que permite una mejor visualización de estas lesiones ya que el escólex puede ser identificado [2].

En términos generales, la IRM es mejor que la TC para el diagnóstico de la cisticercosis, especialmente en pacientes con lesiones quísticas en la base del cráneo, tallo cerebral, cavidades ventriculares y médula espinal. Sin embargo, una limitación importante de la IRM es su mala resolución para detectar pequeñas calcificaciones parenquimatosas, para lo cual es mejor una TC. Debido a que muchos pacientes con neurocisticercosis presentan calcificaciones como única evidencia de la enfermedad, la práctica exclusiva del IRM puede condicionar errores diagnósticos por lo que la TC debería ser el método de imagen de elección para el estudio de pacientes con probable neurocisticercosis y la IRM se reservaría para aquellos casos con TC en los que el aspecto tomográfico de las lesiones no sea concluyente [2, 48].

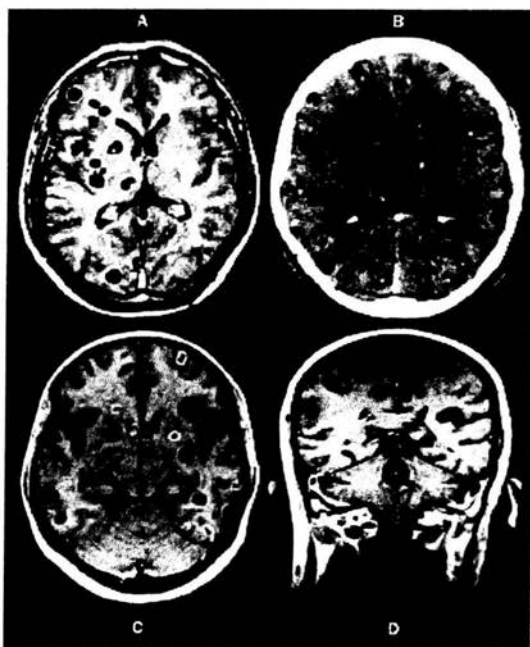


Figura 1G. Aspecto típico del cisticercos. (A) IRM mostrando cisticercos viables, algunos con escólex; (B) TC mostrando calcificaciones y muchos cisticercos activos con escolies (fase vesicular); (C) IRM de cisticercos viables y en fase transicional (fase coloidal y nodular-granular); (D) IRM de cuatro cisticercos ventriculares donde se visualiza el escólex. [2]

1.1.5.2 Pruebas inmunológicas

Existen varias pruebas destinadas a la detección de anticuerpos anticisticercos en suero, saliva y LCR, entre las que destacan la reacción de fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET). Estas pruebas son un complemento importante de los estudios de neuroimagen, pero nunca deben ser utilizadas en forma aislada para confirmar o descartar el diagnóstico de neurocisticercosis debido al elevado porcentaje de resultados falsos positivos y falsos negativos. De las pruebas serológicas la más sensible es la IET que utiliza una fracción de glicoproteínas unidas a una matriz de nitrocelulosa [37]. A pesar de que se ha sugerido que esta IET es 100% específica y 98% sensible para el diagnóstico, en los casos de pacientes con un solo cisticercos cerebral o con cisticercos calcificados la sensibilidad disminuye a 25% o simplemente no se detecta. Además, es importante recordar que los pacientes con teniosis presentan resultados positivos en sangre, sin que eso signifique que tengan cisticercosis (ya sea muscular o cerebral). Algo similar ocurre con el ELISA, cuya certeza diagnóstica en suero es muy baja [2, 3, 48]. La práctica de pruebas inmunológicas en LCR suele ser más confiable que en suero, sin embargo, la positividad de dichas pruebas se relaciona directamente con la viabilidad y la localización de los cisticercos. Tanto la reacción de complemento como el ELISA son muy sensibles en la neurocisticercosis meníngea, esta sensibilidad declina considerablemente en la neurocisticercosis parenquimatosa, particularmente si las lesiones se encuentran calcificadas.

En la actualidad los sistemas de ELISA e IET para el diagnóstico de la cisticercosis (muscular y/o cerebral) siguen procesos de mejoramiento a través de la búsqueda de nuevos antígenos más fáciles de purificar y más específicos [3,22].

1.1.6 TRATAMIENTO

El fármaco de elección para el tratamiento de la teniosis es la niclosamida, la cual actúa sobre los proglótidos haciéndolos susceptibles a la proteólisis por las enzimas del hospedero, esto ha generado controversias por la posibilidad de causar cisticercosis por liberación de los huevos de los proglótidos digeridos hacia la luz intestinal, por lo que su uso ha sido descontinuado en algunos países donde ahora se utiliza el prazicuantel en dosis única de 10 mg/Kg [30]. Este fármaco tampoco es muy seguro, ya que en dosis más altas produce reacciones indeseables cuando hay cisticercos alojados en el SNC. También puede usarse el albendazol y la niclosamida en combinación, con los que se obtienen buenos resultados [31].

Para el caso de la cisticercosis, y en específico de la neurocisticercosis, debido al pleomorfismo clínico que presenta, no es posible que un solo esquema de tratamiento sea útil en todos los casos, por lo tanto, la caracterización precisa de la enfermedad, en lo que respecta a viabilidad y localización de las lesiones, es de fundamental importancia con el objeto de planificar un tratamiento adecuado.

1.1.6.1 Fármacos cestocidas

El praziquantel es una pirazino-isoquinolina que modula los canales dependientes de calcio influyendo así en la permeabilidad del tegumento y en su destrucción, este fármaco ha sido utilizado principalmente para el tratamiento de la neurocisticercosis humana. Estudios posteriores demostraron que el praziquantel condiciona la desaparición del 60% al 70% de los cisticercos parenquimatosos luego de un curso de 15 días de tratamiento a dosis de 50 mg/kg/día. El albendazol es un carbamato bencimidazólico con potente efecto cestocida cuya acción se ejerce sobre la tubulina, inmovilizando y matando al parásito. Este fármaco inicialmente se utilizó en dosis de 15 mg/kg/día durante 30 días; sin embargo, estudios posteriores demostraron que la duración del tratamiento podía ser reducida a 8 días con iguales resultados. El albendazol destruye el 75% a 90% de los cisticercos parenquimatosos y es más utilizado que el praziquantel por su menor costo, un aspecto importante ya que la cisticercosis usualmente afecta a gente de bajos recursos económicos [2, 30, 31, 33, 48].

Existen formas de neurocisticercosis que no deben recibir tratamiento antihelmíntico, entre ellas se encuentra la encefalitis cisticercosa, ya que el uso de dichos fármacos puede exacerbar el edema cerebral que acompaña esta forma de la enfermedad y condicionar aumento en la presión intracraneal. Los enfermos con quistes parenquimatosos o subaracnoideos pueden recibir los fármacos una vez que la hidrocefalia ha sido resuelta mediante la implantación de un sistema de derivación ventricular. En los pacientes con quistes gigantes y en aquellos con quistes ventriculares, el tratamiento debe individualizarse y su beneficio debe ser comparado con los potenciales riesgos inherentes a su empleo. Finalmente, los pacientes con cisticercos calcificados no deben recibir tratamiento [2, 48].



Figura 1H. De izquierda a derecha se muestran las estructuras del praziquantel, la nicosamida y el albendazol, respectivamente [49]

1.1.6.2 Tratamiento sintomático

Los fármacos antiepilépticos son utilizados en pacientes con epilepsia secundaria por calcificaciones, la administración de un fármaco antiepiléptico de primera línea (carbamazepina, fenitoína o fenobarbital) usualmente produce un control adecuado de las crisis. Sin embargo, los pacientes con quistes viables deben recibir primero un tratamiento con fármacos cestocidas para lograr un control posterior de crisis con fármacos antiepilépticos [2, 48].

Los corticosteroides son fármacos frecuentemente utilizados en el tratamiento de la encefalitis, donde usualmente son necesarias dosis altas de dexametasona (24-32 mg/día) para reducir el edema cerebral que acompaña a esta forma de la enfermedad; en estos casos suele ser necesaria la administración concomitante de diuréticos osmóticos (manitol, 2 mg/kg/día o glicerol) para lograr un adecuado control de síntomas. Los corticosteroides a dosis altas son también de utilidad en pacientes con angioitis con el objeto de reducir el riesgo de infartos recurrentes. De igual manera, los corticosteroides se encuentran indicados en pacientes con aracnoiditis para reducir el riesgo de hidrocefalia o de lesiones irreversibles de nervios craneales [2, 48].

Existen indicaciones absolutas para el uso simultáneo de corticosteroides y antihelmínticos, incluyendo pacientes con quistes subaracnoideos gigantes, quistes ventriculares y quistes localizados en la médula espinal. En la mayoría de estos casos, los corticosteroides deben ser administrados antes, durante y después del tratamiento antihelmíntico con el objeto de disminuir el riesgo de infartos cerebrales, hidrocefalia o edema medular, respectivamente [2, 48].

1.1.6.3 Cirugía

Los pacientes con hidrocefalia secundaria por aracnoiditis usualmente requieren la implantación de un sistema de derivación ventricular ya que en pacientes con neurocisticercosis existe una inversión del flujo de LCR que permite la entrada de células inflamatorias y membranas parasitarias al interior de los ventrículos provocando el edema y en muchas ocasiones la falla en la derivación.

Por otra parte, los cisticercos ventriculares móviles pueden ser removidos por exéresis quirúrgica o por aspiración endoscópica. Siempre hay que considerar la posibilidad de que el quiste haya migrado en el interior del sistema ventricular desde el momento del diagnóstico, por lo que es necesario la práctica de estudios de neuroimagen inmediatamente antes de la cirugía [48].

1.1.7 CONTROL DE LA CISTICERCOSIS

Debido a que el cisticerco de *T. solium* representa la forma más peligrosa del parásito para el ser humano, se han tratado diferentes vías de interrupción del ciclo de vida con el fin de evitar el desarrollo del metacestodo basados en que el ciclo necesita sólo de dos hospederos, el hombre y el cerdo (hasta el momento no se ha detectado

reservorios silvestres o vectores de transmisión), además de contar con fármacos que resultan eficaces en la eliminación del estadio adulto de la *Taenia*. Las estrategias llevadas a cabo son: 1) la quimioterapia comunitaria, 2) campañas educativas y 3) desarrollo de una vacuna [30, 31].

En cuanto a la quimioterapia comunitaria se han demostrado en diversos estados de la República Mexicana (Sinaloa, Guerrero, Morelos), así como en países latinoamericanos como Ecuador y Perú que la administración de una dosis única de prazicuantel o albendazol disminuye temporalmente los casos de teniosis en la población y la de cisticercosis en ganado porcino. Después de un año o dos de haber sido administrado el tratamiento el número de teniosicos y cisticercosos en población humana y porcina volvía a incrementarse en igual o mayor magnitud que la anterior a la administración [2, 30, 31, 33].

En las comunidades de la República Mexicana donde se implementaron campañas de educación se encontró una importante reducción de casos de teniosis y cisticercosis porcina. También existe el reporte en una comunidad donde se administró un antihelmíntico (prazicuantel) y montó una campaña de educación que demostró mejores resultados en el control de la cisticercosis porcina y la cantidad de teniosicos aún después de cuatro años de haberse realizado [30, 31, 33].

El desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina parece una estrategia viable si se toma en consideración los estudios con otros ténidos en roedores, ovinos y bovinos, que han demostrado que se puede generar un buen nivel de protección contra la enfermedad. Este hecho ha motivado el desarrollo de vacunas utilizando extractos completos de cisticerco, antígenos purificados de extractos del metacestodo, péptidos sintéticos o proteínas recombinantes [2, 18, 19, 24, 30]. Los análisis de las investigaciones realizadas demuestran que las vacunas proveen un alto grado de inmunización. Sin embargo, al contemplar aspectos como el costo de la vacuna, el bajo nivel económico de los propietarios de cerdos, así como los gastos logísticos de distribución y aplicación de una vacuna en forma masiva, la posibilidad de realizar campañas de vacunación parece aún lejana [31, 33].

1.2 RESPUESTA INMUNOLÓGICA

La respuesta inmunológica en contra de *T. solium* tiene componentes tanto de la respuesta celular como de la humoral, ya que encontramos una participación activa de células T CD4⁺ y de inmunoglobulinas de la clase IgE [2, 15]. La respuesta de los linfocitos T CD4⁺ a su vez está dividida por las subpoblaciones T_H1 y T_H2 las cuales generan diferentes patrones en el tipo de respuesta debido a la heterogeneidad de citocinas que secretan. En el caso de la infección causada por *T. solium* y otros helmintos existe un predominio de la respuesta tipo T_H2. Este tipo de células producen principalmente IL4, IL5 e IL13 las cuales inducen diferentes señales que estimulan o inhiben la acción de otras citocinas o de otras células, por ejemplo, la IL4 estimula la producción de IgE y la proliferación de mastocitos, mientras que IL5 estimula el desarrollo y la activación de los eosinófilos, los cuales pueden destruir con mayor

eficacia que otros leucocitos a los helmintos, ya que la proteína básica de los gránulos de los eosinófilos puede ser más tóxica que las enzimas proteolíticas y los ROS generados por neutrófilos y macrófagos, también IL5 estimula la producción de IgG4, por su parte IL13 inhibe la activación de macrófagos [44].

Aunque la respuesta tipo T_H2 se presenta constantemente para las infecciones causadas por helmintos, cuando éstos producen reacciones inflamatorias, los componentes detectados pertenecen a los de la subpoblación T_H1 , esto está bien documentado en los casos de cisticercos que generaron granulomas [2, 15, 33]. Además existen datos de estudios realizados con cestodos murinos que indican que la respuesta T_H1 se asocia al efecto protector contra el cisticerco, mientras que la respuesta T_H2 permite al parásito su desarrollo y reproducción [37]. Probablemente sea esta la causa de que la respuesta montada por el hospedero no sea suficiente para eliminar al parásito el cual ha desarrollado mecanismos de evasión, como el mantenerse en sitios de privilegio inmunológico, regular el tipo de respuesta inmune del hospedero o generar elementos de respuesta en contra de las defensas de éste, con el fin de prolongar su estancia el mayor tiempo posible [15].

1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El término refiere a las especies químicas con distinto grado de oxidación que van a donar uno o más electrones produciendo intermediarios parcialmente reducidos que provocan un daño parcial o total a las células, además de amplificar las lesiones mediante reacciones en cadena, y tal como el vocablo nos lo indica el oxígeno está involucrado en la generación de estos compuestos. Si bien para los organismos aeróbicos el oxígeno cobra elevada importancia ya que al actuar como aceptor final de electrones proporciona la energía necesaria para producir ATP, éste es un compuesto tóxico con dos electrones desapareados capaces de aceptar electrones, lo que explica la formación de especies de oxígeno reactivas por ruptura o excitación del O_2 . En la célula, el cambio redox del oxígeno se da durante la respiración y durante el metabolismo generando iones, radicales y compuestos tales como el ión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\bullet), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros. También existen especies oxidantes reactivas asociadas con nitrógeno como el radical óxido nítrico (NO^\bullet) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) que en conjunto con las especies anteriores son capaces de generar más electrófilos potenciado así el daño celular [12, 45, 50].

Las ROS lesionan a las células porque cambian la conformación, estructura y funcionalidad de polisacáridos, lípidos, proteínas e inclusive ADN, su interacción con estos componentes forma una gran cantidad de moléculas oxidadas y oxidantes, así como radicales que terminan por desajustar el equilibrio entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes, dando paso al fenómeno conocido como estrés oxidativo.

Para los helmintos los ambientes de oxígeno son realmente pobres, sin embargo se encuentran expuestos a estrés oxidativo por los diversos mecanismos de defensa que monta el hospedero en contra de ellos, como es la liberación de ROS por parte de algunas células de la inmunidad (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos por citar algunos) [44, 45].

1.4 SISTEMAS DE DETOXIFICACIÓN

Los helmintos, como *T. solium*, al igual que otros organismos han desarrollado defensas contra las especies oxidantes reactivas (de oxígeno o nitrógeno) y contra diversos xenobióticos (como lo son los fármacos antihelmínticos entre otros), las que pueden clasificarse de tipo enzimático y tipo no enzimático [12, 47].

Dentro del tipo no enzimático se encuentran los compuestos de bajo peso molecular como la vitamina E, ácido ascórbico, piruvato, urato y glutatión (GSH) que actúan sobre las ROS impidiendo su propagación en la célula [47].

En el caso del mecanismo enzimático, las vías del metabolismo de ROS y xenobióticos (ya sean exógenos o endógenos), se han dividido en dos fases. La fase I, conocida también como reacciones de funcionalidad, se distingue por hacer una biotransformación de los grupos funcionales susceptibles, sobre todo en los xenobióticos, mediante oxidación, reducción o hidrólisis, haciendo más polares a estos compuestos. De las tres clases de reacciones antes mencionadas, las de oxidación son más comunes en el metabolismo de los xenobióticos y aunque en otros organismos la familia de los citocromos P450 llevan a cabo esta catálisis, en *T. solium* no existe tal variedad de mono-oxigenasas. Sin embargo, el parásito cuenta con otras enzimas que llevan a cabo la oxidación de los xenobióticos y ROS como son superóxido dismutasa, xantina oxidasa y monoamino oxidasa. Cabe señalar que *T. solium* carece también de actividad catalasa [42, 47].

Las reacciones de reducción son escasas siendo los grupos carbonilo, azo y nitro susceptibles a estas reacciones para formar grupos hidroxilos y aminos. Las enzimas encargadas de estas reacciones son azoreductasa, nitroreductasa, aldehído y cetona reductasas [38]. Las reacciones de hidrólisis son llevadas a cabo por o- y N-deacetilasa, arilsulfatasa, fosfatasa alcalinas y probablemente por alguna epóxido hidrolasa [47].

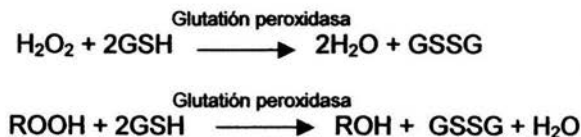
En la fase II se cataliza la adición de pequeñas moléculas a los xenobióticos generando nuevos enlaces covalentes, por ello las reacciones se denominan como "reacciones de conjugación", siendo el GSH, Tiorredoxina (Trx), Ácido uridin-5-difosfo- α -D-glucorónico (UDPG), acetiles, S-adenosilmetionina (SAM) y 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato (PAPS) los cosustratos (endógenos) más comunes. Las enzimas que catalizan tales conjugaciones son Glutatión S-transferasa (GST), Tiorredoxina-Peroxidasa (TPX), Uridin-5-difosfato-glucoronil-transferasa ó UDP-glucoronil-transferasa (UGT), N-acetil transferasa, metil-transferasa y sulfo-transferasa, respectivamente. Para *T. solium* las reacciones de conjugación con glutatión son las de mayor importancia, no sólo por la abundancia de enzimas, en especial la GST, sino también por la versatilidad que ofrecen y porque se ha postulado como el principal sistema detoxificante en helmintos [42, 47].

1.5 FAMILIA DE ENZIMAS QUE UTILIZAN EL GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) es un tripéptido compuesto de γ -glutamato, glicina y cisteína que posee un papel importante en la defensa antioxidante, en el metabolismo de xenobióticos, en la diferenciación y proliferación celular y en la expresión de algunos genes, lo que explica su abundancia dentro de la célula, en cantidades de 1-5 mM [6]. La parte más importante del GSH es la cisteína, que posee el grupo tiol necesario para las reacciones redox con las que el GSH hace más polar a las moléculas a las que se conjuga, permitiéndole a la célula su excreción [6, 39].

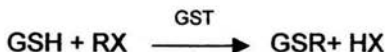
Existen diversas condiciones por las que la cantidad de GSH en la célula decae, por ejemplo, la presencia de metales pesados, concentraciones altas de glucosa, presencia de ROS, además de productos reactivos del metabolismo, así que para regenerarlo se recurre a la reducción de GSSG mediante NADPH (reacción catalizada por glutatión reductasa) o bien a la síntesis *de novo* (donde intervienen la Glutamato-cistein ligasa (GCL) y la Glutatión sintetasa (GS)) [6]. El GSH casi no reacciona directamente con las moléculas a las que se une, actúa como cofactor de una serie de enzimas que se encargan de catalizar su conjugación con diversos xenobióticos. Entre las enzimas que utilizan GSH como cofactor se encuentran: glutatión peroxidasa, glutaredoxinas y GST [6, 39, 47].

La glutatión peroxidasa se encarga de reducir H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos (ROOH) en agua y el respectivo alcohol [6], no obstante esta enzima no se encuentra en *T. solium*:



Las glutaredoxinas son enzimas recién descubiertas, y muestran actividad de peroxidasa y actividad transferasa y no hay estudios que reporten su presencia en este cestodo [4, 23].

Las GST es una familia de enzimas que en general se encargan de catalizar la conjugación de GSH a una gran variedad de xenobióticos a fin de inactivarlos [1, 7,39]:



1.6 LA GLUTATION S-TRANSFERASA

Las glutatión S-transferasas (GSTs; E.C. 2.5.1.18) son una familia de enzimas que promueve la inactivación, degradación y excreción de una amplia diversidad de xenobióticos, de origen endógeno o exógeno catalizando el ataque nucleofílico de GSH a sustratos electrofílicos. Estas enzimas se encuentran principalmente en dos áreas, las membranas y el citosol, siendo las GST citosólicas más abundantes que las microsomales, además de ser las más estudiadas [1, 7, 21]. Cabe mencionar que recientemente se ha reportado una GST extracelular asociada a la mucosa intestinal [29].

Las GST representan en diversos organismos, incluyendo *T. solium*, el 3-4% de la proteína soluble total, indicando su alto nivel de expresión y lo necesario que es para la célula, por lo que estudios actuales han demostrado que las GST no sólo actúan en el metabolismo de detoxificación, sino también en la formación de canales iónicos y su modulación, transporte de moléculas, además de su unión a algunas cinasas modulando las cascadas de señalización [1, 7, 43].

Estas enzimas existen como proteínas diméricas, formando homodímeros o heterodímeros que poseen subunidades con masa aproximada de 25kDa por cada monómero. Cada subunidad tiene un sitio G en el dominio N-terminal que sirve como lugar de unión al glutatión y un sitio de unión de electrófilos o sitio H en el dominio C-terminal. También puede reconocerse un sitio entre la interfase dimérica que quizás sea utilizado como sitio de unión para el transporte de moléculas o de los conjugados de GSH como son la bomba para conjugados de glutatión dependiente de ATP, o para el transporte de aniones orgánicos multiespecífico, por mencionar algunos ejemplos [1, 7].

El dominio N-terminal tiene un plegamiento y una topología parecidas a las tioredoxinas que consiste en cuatro hojas β y tres hélices α en una sucesión β - α - β - α - β - α donde el núcleo del dominio se conforma por el motivo $\beta\alpha\beta$ que se relaciona con la unión a cisteínas, mientras que el motivo $\beta\beta\alpha$ se relaciona con el reconocimiento y unión de la porción γ -glutamil del GSH, este elemento estructural es muy importante ya que una de las diferencias entre las GST surge a partir de los residuos de aminoácidos de la hélice $\alpha 3$ en interacción con los de la hoja $\beta 4$ de éste motivo, ya que utilizando el grupo hidroxilo de aminoácidos como la serina (clase Theta), tirosina (clases Mu, Pi, Sigma) o un coordinado entre tirosina y arginina (clase Alpha) realiza la activación del grupo sulfhidril de la cisteína del GSH. Además en la hélice $\alpha 3$ se reconoce la secuencia de aminoácidos SNAIL/TRAIL que sirve como motivo característico de las GST sobre otras proteínas. En su conjunto éste dominio, que tiene aproximadamente de 1 a 80 residuos de aminoácidos, se encuentra muy conservado en la familia de las GST.

En el caso del dominio C-terminal, éste se estructura por hélices α , que en número pueden ir de cinco (como en las clases Pi y Mu) hasta siete (como en Omega). La cifra de residuos en promedio es de 87 a 210 aminoácidos, que contribuyen en la diversidad de interacciones y afinidades por los sustratos y por ende en las diferencias que existen entre los sitios H de las GST [1, 7, 34].



Figura 11. Monómero de una GST de *Fasciola hepática*. De color negro se muestra el sitio de unión a electrófilos o dominio C-terminal; en gris se representa el sitio de unión a GSH o dominio N-terminal; las esferas representan los ligandos utilizados para la cristalización de la proteína. [34]

También entre los dominios I (N-terminal) y II (C-terminal) se presentan interacciones que caracterizan a ciertos grupos de GST, por ejemplo, las clases Pi, Mu y Alpha contienen en el dominio II residuos de fenilalanina que sobresalen de la cadena e interactúan con la hélice $\alpha 2$ y con la hoja $\beta 3$ del dominio I formando una especie de "llave-cerradura" en la interfase del monómero. Por el contrario las clases Sigma y Theta no contienen estos residuos, pero forman una interacción de tipo hidrofílico que establece un puente entre las subunidades. Aparte de estas particularidades ciertas clases poseen estructuras que las identifican, los casos que ejemplifican lo anterior es el lazo de la clase Mu (localizado entre la hoja $\beta 2$ y la hélice $\alpha 2$ del dominio I) y la hélice extra, hélice $\alpha 9$, de la clase Alpha (localizada en el dominio II), ambas estructuras aumentan la estabilidad del dímero y la velocidad de unión de GSH [1, 7, 34].

Tomando en cuenta las características de los monómeros, las funciones de las GSTs podrían establecerse como: 1) Unión de GSH y activación del grupo sulfhidril; 2) unión del sustrato; 3) establecimiento de las condiciones que permitan la conjugación de GSH y xenobiótico. Dado que las especies electrófilas son muchas y muy variadas, el tipo de reacción que se da con el GSH también es diverso, así que entre las catálisis identificadas se encuentran la sustitución nucleofílica aromática, la apertura de anillos de epóxidos, la adiciones reversibles tipo Michael a cetonas y aldehídos α, β insaturados así como isomerizaciones, y con ellas pueden desactivarse una gran diversidad de compuestos, aunque también pueden formarse especies reactivas como los intermediarios de ión episulfonio cuando se conjuga GSH con haloalquenos [1, 7].

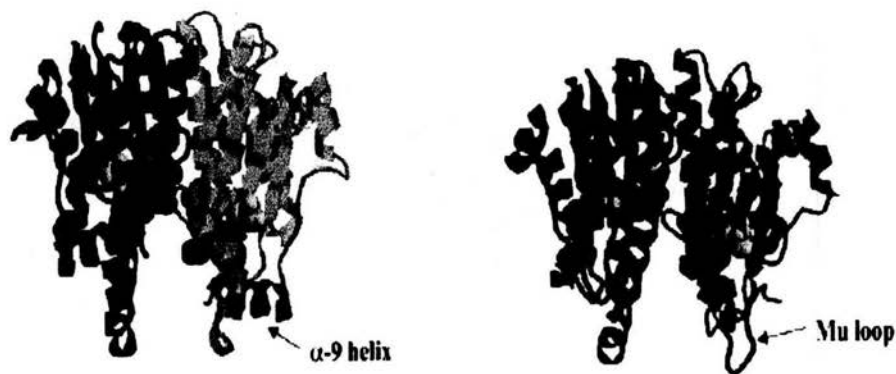


Figura 1J. Representación de dos clases de GST. De lado izquierdo se muestra una GST humana clase alfa donde puede distinguirse la hélice α -9 característica de este subtipo. Del lado derecho se encuentra una GST humana clase mu con el lazo o "mu-loop" característico de esta variedad. [34]

Sin embargo son los xenobióticos los que van a regular e inducir la expresión de las GST a través de mecanismos como los elementos de respuesta antioxidante (ARE), los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) que en humanos y ratones se ha visto que activan factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (κ B), la cinasa p38 y el factor de transcripción de la cremallera de leucina (Nrf2) [6, 7, 13].

Las propiedades de las GSTs ya mencionadas –estructura primaria, estructura terciaria y cuaternaria– aunadas a las propiedades cinéticas (especificidad al sustrato, sensibilidad al inhibidor), su localización en el genoma, la estructura de los genes que las codifican (secuencia nucleotídica, número y tamaño de intrones y exones) y la respuesta inmunológica que producen han permitido el reconocimiento, diferenciación y ordenamiento de diversas GST en las siguientes clases: alpha (α), mu (μ), pi (π), theta (θ), zeta (ζ), omega (ω), sigma (σ), kappa (κ) –ésta última hallada en mitocondrias– phi (ϕ), tau (τ), delta (δ) y beta (β) [1, 7, 21, 34, 35, 42]. Las primeras GST de mamíferos se ordenaron como alpha (α), mu (μ), pi (π) y theta (θ), pero el avance en los conocimientos permitió reconocer la existencia de GST de clase zeta (ζ), omega (ω), sigma (σ) y kappa (κ). En plantas las GST se describieron como phi (ϕ), tau (τ), en insectos se detalló la clase delta (δ) y en bacterias la clase beta (β). No obstante varias GST de diversas especies tienen mucha semejanza y pueden agruparse dentro de una misma clase. Por ejemplo, aunque la clase theta (θ) se ubique dentro de la clasificación de mamíferos, insectos (como *L. cuprina*) o plantas (como *A. thaliana*) poseen GSTs que comparten las características de la clase theta de mamíferos y por lo tanto han sido clasificadas como tal [34, 43].

Lo mismo sucede con otros organismos, como los helmintos, los cuales poseen GST que han sido clasificados de acuerdo a las similitudes que guardan con las GST de mamíferos [34, 41, 42, 43], para ello, este ordenamiento utiliza la nomenclatura siguiente: una letra minúscula que precede la abreviatura GST y que indica la especie de donde proviene la enzima (por ejemplo: h para humano, r para rata, m para ratón); después de GST viene una letra mayúscula que indica la clase a la que pertenece (A para alpha; M para mu; P para Pi, etc.), después en números arábigos la subfamilia (1, 2, 3...) y por último con letras minúsculas las variantes alélicas que puedan existir (a, b, c...), así que cuando se escribe hGSTP1a-1a se hace referencia al homodímero de GST humana de la clase Pi de la subfamilia 1 de la variante alélica a.

En *T. solium* se ha caracterizado una GST de clase mu (SGSTM1) de 25.5 kDa con una secuencia N-terminal: MAPTLAYWD. En este mismo estudio se reconoce la presencia de otra GST (SGSTM2) de 26.5 kDa. La secuencia N-terminal de esta enzima es: MNKYKFAYWN. Tales datos sugieren la presencia de dos GST distintas. Además en este estudio se demuestra que la GST de 26.5 kDa es más abundante que la GST de 25.5 kDa [41, 42]. También se determinó que ambas GSTs son capaces de conjugar el GSH a sustratos tóxicos como hidropéroxidos lipídicos y carbonilos reactivos que resultan compuestos dañinos para los organismos, quedando demostrada la importancia de las GSTs en el proceso de detoxificación. Por tal motivo, el conocer la forma de regulación de los genes y las características bioquímicas que poseen, nos permitirá diseñar y montar estrategias específicas para inhibir o modificar la expresión y el funcionamiento de estas enzimas, aumentando la susceptibilidad de *T. solium*.

En este trabajo se aisló y caracterizó el ADNc que codifica la isoforma de 26.5 kDa, como una primera aproximación hacia un estudio bioquímico detallado de esta GST.

II. Justificación del proyecto

La *Taenia solium* representa un serio problema económico y de salud pública, ya que es responsable de causar la cisticercosis y la teniosis, dichas enfermedades tienen una amplia distribución mundial por lo que encontrar los mecanismos de erradicación se ha convertido en objeto de intensos estudios en varios países de todos los continentes.

Este parásito cuenta con poderosas enzimas que le permiten la supervivencia dentro del hospedero, y la GST es una de ellas. Así que basándonos en la ya demostrada importancia de esta familia de enzimas para todos los seres vivos, incluidos los cestodos como *T. solium*, el conocimiento de la genética de la enzima del helminto nos permitirá establecer estrategias para comenzar a determinar las vías de ataque (vacunación y diseño de fármacos) con el fin de impedir la propagación e instalación de este parásito en sus hospederos.

III. Hipótesis

En *Taenia solium* existen dos formas de la enzima glutatión S-transferasa, una de 25.5 kDa (ya caracterizada) y otra de 26.5 kDa. Por lo tanto, proponemos que la isoforma de 26.5 kDa debe ser codificada por un gen diferente al que codifica la isoforma de 25.5 kDa.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

La clonación y caracterización molecular del ADNc que codifica a la Glutación S-transferasa (GST) de 26.5 kDa de *T. solium*.

4.2 Objetivos particulares

- Producción de una sonda de nucleótidos para la GST de 26.5 kDa
- Aislamiento del ADNc que codifica esta isoforma de GST.
- Analizar la secuencia de nucleótidos del ADNc
- Determinar el número de genes
- Comparar la secuencia de aminoácidos de la GST de 26.5 kDa de *T. solium* con GSTs de otras especies y determinar su identidad.

V. Material y Métodos

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las bacterias utilizadas pertenecen a la especie *Escherichia coli* siendo las cepas C600hfl [F^e14⁻ (McrA)hsdR(r_k⁻m_k⁻)glnV44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 fhuA21 mcrB hflA150] y TOP10 [F⁻ mcrA Δ(mrr-hdsRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 dROS recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG] de la casa Invitrogen las utilizadas.

El ARN total obtenido por la técnica de trisol y almacenado a -70°C, así como la biblioteca de ADNc construida en el fago λgt10, fueron preparados con antelación en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM [14].

5.2 REACTIVOS

Los oligonucleótidos: GST26-1, GST26-2 fueron diseñados a partir de una secuencia amino-terminal (KYKFAYWN) y una secuencia interna (PNLPYLI) obtenidas por secuenciación de aminoácidos a la enzima nativa utilizando la metodología de degradación de Edman hecha previamente en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM [40, 41]. Mientras que los oligonucleótidos para amplificar el ADNc completo fueron el GST26-X1 y el GST26-X2 que se sintetizaron a partir de los siete primeros y los siete últimos aminoácidos de la clona que codifica para la GST de 26.5 kDa. Los oligonucleótidos que flanquean la región de clonación del fago λgt10 denominados λgt10-forward y λgt10-reverse fueron comprados a la casa comercial Pharmacia. Para las reacciones de PCR se utilizó el estuche producido por Biotecnologías Universitarias. El estuche para la reacción de RT-PCR fue el Superscript One-Step RT-PCR de la casa Invitrogen. Las endonucleasas de restricción *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I, y *Bgl* II fueron obtenidas en la casa comercial GIBCO BRL. También de esta casa proviene el estuche RedPrime DNA Labeling System con el cual se realizó el marcaje radiactivo de las sondas. El ADN de cisticerco digerido para el Southern blot fue obtenido con anterioridad mediante purificación a partir de metacéstodos de cerdos infectados [14, 41]. El estuche para las reacciones de secuencia (Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Sequencing Kit), así como de los iniciadores universales forward y reverse para el fago M13, y el isótopo radioactivo ³²P-dCTP con una actividad específica de 250 μCi/mmol (110TBq/mmol) fueron comprados a la casa comercial Amersham Bioscience. Las placas de rayos X utilizadas para las autorradiografías de las membranas del tamizaje y del Southern blot fueron de la marca KODAK. Las membranas de nitrocelulosa fueron adquiridas de la casa comercial Millipore, mientras que las de nylon fueron de la marca Hybond de Amersham Bioscience.

Las soluciones para la hibridación, aislamiento de ADN, Southern blot, etc, se realizaron con reactivos de alta calidad de diversas casas comerciales que se encontraban

disponibles en el laboratorio de Biología molecular de *T. solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM (ver anexo).

5.3 OBTENCIÓN DE UNA SONDA

Para generar la sonda para la GST de 26.5 kDa se realizó un PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando los oligonucleótidos GST26-1-GST26-2 y 1 µg de RNA total proveniente de la larva del parásito. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio corriéndose la muestra en una cámara para electroforesis de la casa Life-Technologies, con 100 V durante 1 hora. El fragmento obtenido fue cortado del gel y disuelto en una solución de NaI 6M a 37°C por 15 minutos. Después de que se ha disuelto la agarosa, a la mezcla se le agregan 2 µL de perlas de vidrio, se agita y se incuba a 4°C por 2 hr. Inmediatamente se centrifuga a 14,000 rpm durante 30 segundos y se desecha el sobrenadante. Se lavan las perlas una vez con 500 µL de NaI, se centrifuga como antes, y tres veces con solución de lavado, centrifugando también a 14,000 rpm por 30 segundos, tirando siempre el sobrenadante. Finalmente las perlas se secan a 37°C y se resuspenden en 25 µL de amortiguador TE dejando incubar la mezcla a 37 °C por 30 minutos. El fragmento de ADNc obtenido fue clonado en el vector pCRII TOPO con el que se transformaron células *E. coli* de la cepa TOP10. Utilizando la construcción del plásmido que contenía el fragmento se realizó la secuencia del inserto. Ésta técnica también se utilizó para generar la sonda GST26X1-GST26X2. Las condiciones para la PCR son las que se describen en la sección 5.7 de este capítulo.

5.4 MARCAJE RADIOACTIVO

Para realizar el marcaje radiactivo de la sonda se utilizó el estuche RedPrime DNA Labeling System de Gibco BRL. Para esta metodología se necesitan 25 ng del ADN sonda o de los oligonucleótidos específicos en un volumen de 45 µL de amortiguador TE. Se calienta a 100°C por 5 minutos e inmediatamente se enfría en hielo durante 5 minutos. La mezcla se centrifuga rápidamente y el sobrenadante se coloca en el tubo de reacción del estuche para marcaje RedPrime. Se adicionan 5 µL de ³²P-dCTP al tubo de reacción y se incuba durante 10 minutos a 37°C, transcurrido el tiempo se detiene la reacción con 5 µL de EDTA 0.2 M. Finalmente antes de utilizar la sonda, ésta debe desnaturalizarse a 100°C por 3 minutos y mantenerse 4°C (hielo) por 2 minutos, antes de ser utilizada en el paso de la hibridación del tamizaje.

5.5 AISLAMIENTO DE CLONAS (TAMIZAJE)

Una colonia de la bacteria *E. coli* C600hfl fue inoculada en 50 mL de medio SOBMB e incubada a 37°C durante toda una noche. Las bacterias se centrifugan a 3400 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y resuspenden en MgSO₄ 10mM. Con 600 µL de esta bacteria se titula la biblioteca de ADNc clonada en el vector λgt10 para lo cual se utilizan diferentes diluciones de la biblioteca. La mezcla se incuba 30 minutos a 37°C

para después verterse en 5 mL de medio SOMB-top (a una temperatura de 55°C), se agita ligeramente y se siembra en cajas Petri con agar SOBM. Solidificado el medio a temperatura ambiente se incuba toda la noche a 37°C.

Una vez que han crecido las placas líticas se realiza su réplica en membranas de nitrocelulosa para lo cual se montan las membranas sobre las placas durante 2 minutos; las membranas se marcan con tinta china para tener puntos de referencia que permitan la relación de las autorradiografías con la ubicación de las placas. Enseguida se desnaturalizan los fagos y el ADN de las membranas utilizando una solución alcalina desnaturalizante por 5 minutos e inmediatamente se realizan dos lavados con solución neutralizante durante 5 minutos cada lavado, al final se realiza un lavado de 5 minutos en solución SSC 5X. Estas membranas se secan ligeramente y el ADN se fija a la membrana mediante luz UV utilizando un equipo UV Stratagene 2400 de la casa Stratagene. Una vez fijado el ADN se dejan las membranas en solución de hibridación por 2 horas antes de agregar la sonda. La hibridación de las membranas se realizó a 42°C durante toda la noche, con la sonda del fragmento de GST26.5 (generada con los oligonucleótidos GST26-1 y GST26-2) marcada con ^{32}P -dCTP. Al término del tiempo de hibridación se lavan las membranas con solución de lavado y se secan para ser expuestas en placas de radiografía de 24 a 48 horas, se revelan las placas y las clonas positivas se aíslan y almacenan en medio SM a 4°C en 500 μL . Se realizaron un segundo y tercer tamizaje para obtener clonas de fagos aisladas, utilizando el procedimiento antes mencionado.

5.6 PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE FAGOS

Para la obtención de ADN de los fagos que contienen el inserto deseado se infectan 300 μL de *E. coli* C600hfl con aproximadamente 1×10^6 fagos de clonas positivas provenientes de los tamizajes terciarios, esta mezcla se incuba 20 minutos y se transfiere a 3 mL de medio SOMB-top para después ser sembrados en cajas Petri con agar SOBM. Se dejan crecer toda la noche a 37°C. Cuando se tienen las cajas de lisis total se recupera las partículas virales con 7 mL de medio SM en 2 rondas, en la primera se utilizan 5 mL de amortiguador y en la segunda 2 mL, agitando por una hora a temperatura ambiente, éste líquido se transfiere a tubos Falcon transcurrido el tiempo de agitación. Al líquido obtenido se le agregan 200 μL de CHCl_3 , se agita y se centrifuga a 3400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante (plate stock) se coloca en un tubo nuevo y se almacena a 4°C, del plate stock se toman 700 μL que se mezclan con 700 μL de solución PEG en un tubo de 1.5 mL y se mantiene en hielo 2 horas, se centrifuga a 14,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y se tira el sobrenadante. Se resuspende el botón en 200 μL de medio SM y se le agregan 2 μL de RNAsa (1 mg/mL) y 2 μL de ADNsa (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) incubándose por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregan 2 μL de SDS al 10% y 2 μL de EDTA 0.5 M a pH= 8.0 incubándose a 68°C por 15 minutos. Se realizan diversas extracciones con el fin de purificar aún más el ADN, por lo cual se utilizan 200 μL de fenol saturado con TE y 200 μL de CHCl_3 en la primera extracción, y 200 μL de CHCl_3 en la segunda. A la fase acuosa obtenida en la segunda extracción se le adicionan 200 μL de isopropanol para así precipitar el ADN, ésta mezcla se deja a -70°C de 2 a 12 horas. El siguiente paso

es centrifugar las muestras a 14,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se tira el sobrenadante y el botón se resuspende en etanol al 70 %, se vuelve a centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos y se tira el sobrenadante. El botón se seca a 37°C por 10 minutos y se resuspende en 50 µL de amortiguador de TE.

5.7 REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para cada reacción de PCR se utilizaron las siguientes cantidades: 2 µL de amortiguador de reacción 10X, 2 µL de dNTP's 2mM, 1 µL de MgCl₂ 20X, 0.32 µL de cada cebador (50 picomoles /µL), 0.2 µL de enzima (5U/ µL), 1 µL de molde y H₂O c.b.p un volumen final de 20 µL. Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystem) usando las siguientes condiciones: un primer ciclo de: 95°C durante 3 min , 50°C por 1min y 2 min de 72°C, a continuación 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C, por último un ciclo de 1 min a 50°C, 5 min a 72°C y una hora a 4°C.

5.8 LIGACIÓN

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el estuche de ligación TOPO-TA Cloning System de la casa Invitrogen, para lo cual se utilizó 1 µL del vector pCR II-TOPO, 1 µL de amortiguador de ligación con sales, 1 µL de agua y 3 µL de un PCR fresco (amplificando el ADN diana con los oligonucleótidos λgt10 forward y gt10 reverse). Por último la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

5.9 TRANSFORMACIÓN

Se adicionan a 50 µL de *E. coli* TOP10 competentes, 2 µL de la reacción de ligación anterior. La mezcla se incubó en hielo por 1 hora y enseguida se somete a un choque térmico a una temperatura de 45°C por 30 segundos. Después se inicia una fase de recuperación para las bacterias para lo cual se les coloca en 200 µL de medio SOC y se incuban por 30 minutos a 37°C en agitación. Al final de este tiempo las bacterias siembran en una caja Petri con agar LB con ampicilina (50 µg/mL).

5.10 PREPARACIÓN GRANDE DE ADN PLASMIDICO

Las bacterias transformadas que presentaban el inserto de interés se hicieron crecer en 100 mL de medio LB con ampicilina (50 µg /mL) a 37°C durante toda la noche. Para obtener el ADN plasmídico se recurrió a la lisis alcalina de las células. El cultivo anterior se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se tiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 5 mL de una solución hipotónica (solución 1) dejando incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se le agregan 10 mL de una solución alcalina recién preparada (solución 2),

se agita la mezcla suavemente por inversión lenta y se incuba en hielo por 10 minutos, enseguida se adicionan 7.5 mL de solución 3, se agita perfectamente y se deja 10 minutos en hielo. Se centrifuga a 3400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante; la pastilla se resuspende en 200 μ L de TE y se transfiere a un tubo de microfuga con volumen de 1.5 mL. A la suspensión anterior se adicionaron 2 μ L de RNAsa (10mg/ml) incubando durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente la muestra se extrae con fenol y cloroformo y la fase acuosa se pasa por una columna de sefarosa CL4B previamente equilibrada con TE. Las fracciones de 500 μ L que tienen el ADN se precipitan con acetato de sodio 3M pH = 5.2 y etanol absoluto dejando la mezcla por 2 horas a -70°C. Las muestras se centrifugan 10 minutos a 14,000 rpm, se tira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 50 μ L de TE.

5.11 SECUENCIACIÓN

Para las reacciones de secuencia se empleo como molde el ADN plasmídico purificado previamente. La secuencia se llevó a cabo automáticamente y para ello se utilizó el estuche Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Sequencing Kit, en el cual se necesita un mínimo de 500 ng de ADN plasmídico que debe llevarse a un volumen de 12 μ L con agua desionizada. A la dilución anterior se le agrega 1 μ L de los cebadores marcados fluorescentemente (2-5 μ M) y se agita gentilmente la mezcla que se denomina "reacción maestra". Para realizar las reacciones de terminación se necesitan 3 μ L de dideoxinucleótidos del estuche repartidos en sus respectivos tubos, uno para A, para C, para G y para T, a cada una de éstas reacciones se le agregan 3 μ L de la "reacción maestra", se agitan perfectamente los cuatro tubos y se someten a 20 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. y 72°C por 1 min. Terminados los ciclos las mezclas se enfrían a 4°C y entonces se les agrega 6 μ L de amortiguador de TE. Todos los elementos anteriores se agitan en vortex para asegurar su perfecta incorporación en la mezcla, la cual antes de ser cargada en el gel debe someterse a 72°C por 3 min y 1 min en hielo. Para mejorar las señales por eliminación de los excesos de fluorocromo, las muestras antes de ser cargadas en el gel se pasan a través de una microcolumna de sefarosa G-50 para eliminar todos los deoxinucleótidos y cebadores marcados que no se incorporaron durante la extensión, inmediatamente las muestras se secan utilizando vacío y se resuspenden en 6 μ L de amortiguador de cargado con formamida y colorante. La secuenciación se lleva a cabo en el secuenciador SEQ4x4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

5.12 DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Para realizar la digestión del ADN genómico de cisticerco se utilizaron las endonucleasas *Pst* I, *Eco* RI, *Hind* III, *Bgl* II y *Bam* HI. En la mezcla de reacción se usó 5 μ L de ADN genómico (20 μ g), 20 μ L de amortiguador 10 X que cada enzima necesita y agua c.b.p. 200 μ L. Cada mezcla de reacción se le adicionan 3 μ L de enzima correspondiente (10 U/ μ L de enzima). Las reacciones se dejan incubar 4 horas a 37°C.

Para determinar el progreso de la digestión se corre en un gel de agarosa al 2% a 100 V con una muestra de ADN sin digerir, las muestras contenidas en cada tubo de reacción, y dos marcadores de peso molecular: pBR322 y λ Hind III. En caso de que la digestión aun no sea la deseada se vuelve a agregar más enzima hasta obtener una digestión total. Cuando la digestión esté terminada, las muestras se precipitan con etanol absoluto y acetato de sodio 3M pH= 5.2.

5.13 ANALISIS TIPO SOUTHERN

Cada digestión de ADN genómico anterior se corre en un pozo de un gel de agarosa al 2%, utilizando una corriente de 100 V. Terminada la corrida el gel se pone a depurinar por 15 minutos con 100 mL de HCl 0.25M, inmediatamente se realizan dos lavados con solución desnaturante por 30 minutos en agitación. El paso siguiente son dos lavados con solución neutralizante, el primer lavado de 30 minutos y el segundo de 1 hora. Finalmente para realizar la transferencia del gel hacia la membrana de nylon el acomodo de los elementos, yendo de abajo hacia arriba, es el siguiente:

- a) Soporte
- b) Capilar (papel filtro con el mismo ancho del gel pero de mayor largo) que permitirá el paso de la solución SSC 10X.
- c) Gel
- d) Membrana
- e) Tres papeles filtro
- f) Grupo de papel adsorbente
- g) Peso

Se deja transfiriendo toda la noche. Después de la transferencia es importante marcar los pozos con el fin de saber el orden de las digestiones. La membrana se lava con SSC 5X durante 5 minutos a temperatura ambiente, se seca y para fijar el ADN se usa luz UV generada por un aparato UV-Stratalinker. La membrana con el ADN unido se equilibra en solución de hibridación tres horas antes de la hibridación, entonces se adiciona la sonda marcada radioactivamente (ver la metodología descrita en procedimiento del tamizaje) y se incuba por 24 horas a 42°C. Finalmente, se lava la membrana con solución de lavado a 55°C por 3-5 veces y se expone en una placa radiográfica por 72 horas.

5.14 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

Los análisis de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos obtenidas fueron realizados utilizando el programa PC/GENE versión 2.1. Para las comparaciones y alineamientos de las secuencias se usaron los programas de BLAST y CLUSTAL X.

VI. Resultados

6.1 PRODUCCIÓN DE LA SONDA

Los oligonucleótidos GST26-1 y GST26-2 fueron sintetizados a partir de una secuencia amino-terminal (KYKFAYWN) y una secuencia amino interna (PNLPYL) obtenidas previamente en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM [41, 42]. Con estos oligonucleótidos y un ADNc, mediante la PCR se amplificó un segmento de ADN de cisticerco. El fragmento generado se observa en la Figura 6A, y presenta un tamaño cercano a las 200 pb. Éste fragmento se purificó, clonó y secuenció tal como se describe en la metodología. La secuencia nucleotídica mostró que el fragmento codificaba una GST diferente a la GST de 25.5 kDa previamente clonada en nuestro laboratorio (Fig. 6B), por lo que éste fragmento se marcó radiactivamente con ^{32}P -dCTP para ser utilizado como sonda.



Figura 6A. Gel de agarosa al 2% donde se aprecia el tamaño (en pb) del fragmento amplificado usando ADNc más los oligonucleótidos **GST26-1** y **GST26-2**. El marcador de peso molecular es pBR322. **Figura 6B.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del fragmento de ADN amplificado mediante la PCR con los oligonucleótidos específicos **GST26-1** y **GST26-2**.

6.2 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CLONAS

Utilizando como sonda el fragmento de 200 pb mencionado anteriormente, se procedió a marcarlo con ^{32}P -dCTP para realizar el tamizado de 14,000 fagos provenientes de la biblioteca de ADNc de *T. solium* (fragmentos de ADNc con un tamaño de 0.1-23 kb) construida en el fago $\lambda\text{gt}10$. En el tamizaje primario se obtuvieron varias clonas "positivas" a la hibridación con la sonda, sin embargo, gracias a los duplicados que se realizaron a cada caja Petri, se pudo determinar que algunas marcas no coincidían en los duplicados, por lo que fue necesario realizar dos tamizajes más (secundario y terciario) a fin de aislar las clonas que realmente fueran específicas. Finalmente, después del tamizaje terciario se pudieron aislar seis clonas de fagos denominadas como 3.2.1.2, 1.2.1.1, 3.5.2.2, 2.3.2.2, 4.2.1.1, y 1.2.2.1. La figura 6C, muestra el tamizaje secundario donde se aprecian las clonas precursoras de las clonas antes mencionadas.

A partir de cada uno de los fagos aislados del tamizaje terciario se purificó el ADN tal como se describe en la metodología. Éste ADN se utilizó como secuencia diana para que por medio de la PCR y utilizando los 2 oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonación del fago $\lambda\text{gt}10$, se pudiera determinar el tamaño de los ADNc que contenían las clonas positivas. La figura 6D, muestra un gel de agarosa al 2% donde se observan los tamaños de los fragmentos obtenidos de las clonas aisladas, que oscilan entre 0.7 a 1.0 kb.

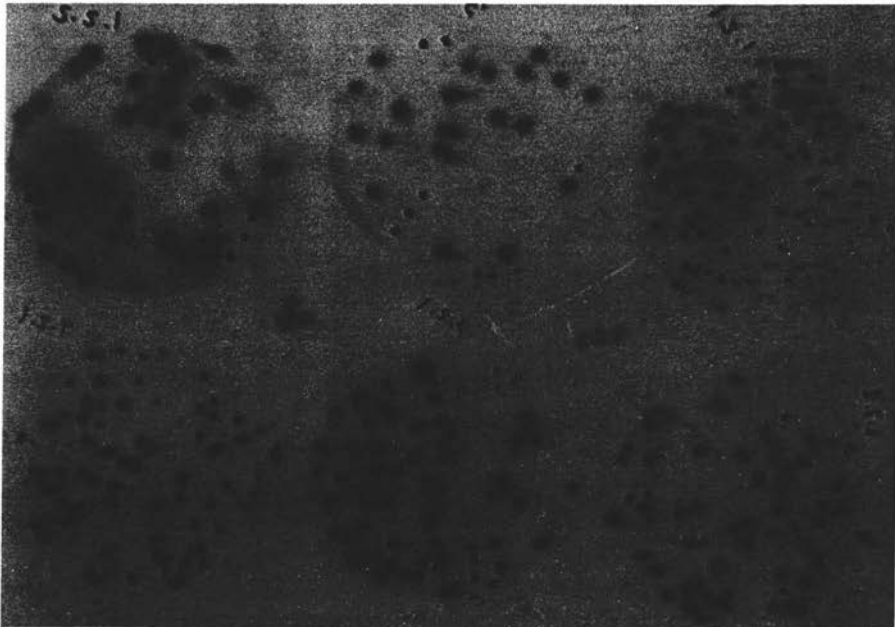


Figura 6C. Tamizado secundario a la biblioteca de ADNc total contenida en el fago $\lambda\text{gt}10$ donde se observan de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo las clonas: 1.5.5, 3.5.2, 1.2.1, 4.2.1, 3.2.1 y 2.3.2.

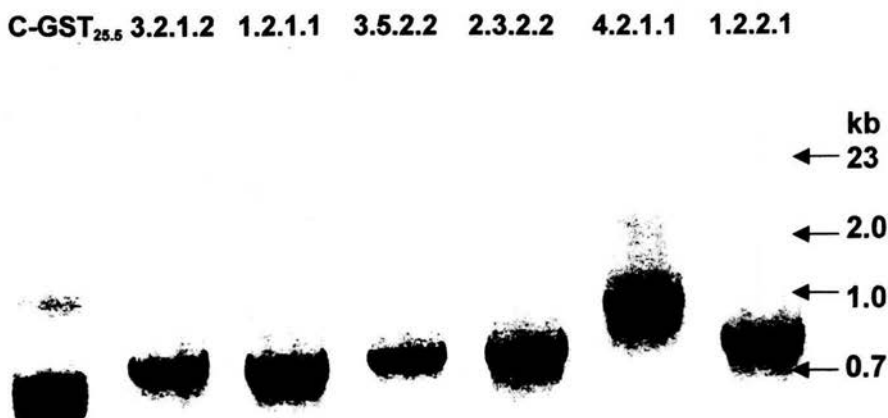


Figura 6D. Gel de agarosa donde se muestran las clonas del tamizaje terciario obtenidas de la biblioteca de *T. solium* en λ gt10 y donde se estima el tamaño de los insertos, los cuales son similares. Se aprecia que las clonas 4.2.1.1 y 1.2.2.1 son ligeramente mayores al resto, esto se valora mejor en la clona 4.2.2.1 que sobrepasa un poco las 1000 pb. La clona marcada como C-GST_{25.5} es el control utilizado en los tamizajes y corresponde a la GST de 25 kDa [42]. Como marcador de peso se utilizó la digestión del bacteriófago λ con endonucleasa *Hind* III.

Un análisis posterior con enzimas de restricción demostró que las seis clonas aisladas presentaban el mismo patrón de corte (dato no mostrado), lo que sugirió que todas eran idénticas. Esto nos llevó a decidir a trabajar con aquellas que presentaban insertos más grandes ya que por su tamaño podrían contener el fragmento completo de ADNc que codificara la GST 26.5 kDa. Fue así como se eligieron las clonas 4.2.1.1 y 1.2.2.1. Los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos de fago λ gt10 de las clonas antes mencionadas se clonaron en el vector pCRII TOPO. La construcción anterior fue introducido a bacterias *E. coli* de la cepa TOP10. El ADN de las bacterias transformadas se purificó y amplificó por PCR utilizando también cebadores para λ gt10. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% donde pudo establecer que las clonas 4.2.2.1(7) y 1.2.2.1(9) tenían el mismo tamaño presentado en la figura 6D. Las células conteniendo esta construcción se guardaron a -70°C.

6.3 SECUENCIACIÓN

Las construcciones anteriores conteniendo los ADNc de las clonas 4.2.2.1 y 1.2.2.1 se secuenciaron. Para el caso de la secuencia de la clona 4.2.2.1 se encontró que el inserto presentaba una secuencia nucleotídica de 866 pb. El análisis de esta secuencia presenta un marco abierto de lectura del nucleótido 1 al nucleótido 652, y codifica una proteína de 217 aminoácidos con un pI predictivo de 8.39. La figura 6E muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos obtenida a partir de los análisis computacionales realizados sobre la clona 4.2.2.1. Además ésta figura muestra que la secuencia nucleotídica tiene una composición de 238 A que equivalen al 27.5% del total de nucleótidos (en éste porcentaje no se consideran las adeninas pertenecientes a la cola de poli A); 172 C que representan el 20%; 173 G que también representan 20% del total de la secuencia y 233 T que constituyen 27% del total. Otra cuestión importante fue el hecho de no encontrarse el ATG de inicio de la traducción, pero sí el codón de término TAA en la posición 652 y el sitio de poliadenilación en la posición 786 de la secuencia nucleotídica. En esta secuencia también se identificó el fragmento utilizado como sonda y que se encuentra de la posición 1 hasta la 162. En cuanto a la composición total de aminoácidos ésta fue de: 11 A, 9 R, 10 N, 16 D, 3 C, 5Q, 16 E, 16 G, 2H, 17 I, 24 L, 25 K, 4 M, 18 F, 13 P, 6 S, 4 T, 4 W, 10 Y, 4 V, todo lo anterior también puede apreciarse en la misma figura 6E. Cabe mencionar que la secuencia nucleotídica de la clona 4.2.2.1 es idéntica que la de la clona 1.2.2.1, con la diferencia de que esta última presenta una cola de poli A más pequeña.

Con el fin de realizar los análisis de comparación contra otras GSTs, y en especial con la GST de 25.5 kDa de *T. solium*, decidimos adicionarle los aminoácidos iniciales obtenidos mediante la secuencia amino terminal a la GST nativa. Los análisis de los alineamientos obtenidos se muestran en la figura 6F, donde podemos observar la comparación de la secuencia primaria de la clona 4.2.2.1 con la secuencia de la GST de 25.5 kDa de *T. solium*, observándose que entre ambas hay solo 82 identidades. También puede apreciarse que ambas comparten los motivos característicos que identifican a las GSTs como la secuencia de consenso SNAIL/ TRAIL que para la GST de 25.5 kDa se encuentra a partir del residuo 73 y para la GST de 26.5 kDa se encuentra a partir del residuo 69. Además mantiene los motivos altamente conservados entre las GST como las que constituyen los aminoácidos que integran el motivo $\beta\beta\alpha$ perteneciente a la región N-terminal de la enzima (sitio G) que para la GST 25.5 kDa están desde la posición 42 hasta la 88, mientras que para la GST de 26.5 kDa comienzan a partir de la posición 38 y se extienden hasta la posición 84, aunque la mayoría de los aminoácidos que conforman éste motivo son idénticos existen algunos aminoácidos que son distintos.


Los análisis de comparación con otras GST utilizando el banco de datos Gen-Bank disponibles en la WEB [51] mediante el programa BLAST mostraron que la GST de 26.5 kDa de *T. solium* presenta una identidad de 47% con la GST de *Schistosoma mansoni* de 26 kDa (Antígeno SM26/2) (P35661), el 46% con la GST de 26 kDa (Isotipo GST1) de *Fasciola hepatica* (P56598), un 45% con la GST de *Clonorchis sinensis* (AAB46369) y con la GST de 26 kDa (isotipo GST51) de *F. hepatica* (P30112), todas pertenecientes a la clase alfa, y con menos de 45% de identidad con otras GST de otras especies de varias clases e isotipos. Empleando los alineamientos comparativos se realizaron análisis estructurales que nos permitieron determinar que aminoácidos formaban parte de cada motivo estructural de la enzima, es decir, que aminoácidos iban a formar parte de las α -hélices y cuales aminoácidos iban a dar forma a las hojas- β . En la figura 6F se pueden apreciar parte de estas identidades que van a estructurar los diferentes motivos de la enzima, por ejemplo, se muestran estructuras tales como el lazo "mu-loop" que presenta la GST 25.5 y la hélice alfa 9 que presenta la GST de 26.5, además de las α -hélices y hojas- β que forman las GST de varios organismos incluidos *T. solium*.

6.4 ANALISIS DEL GEN DE LA GST26.5

Para determinar el número de copias del gen, que codifica para esta GST, en el genoma de *T. solium* se realizó un análisis de tipo Southern, por lo que grupos de 20 μ g de ADN genómico fueron digeridos con 5 enzimas de restricción diferentes (*Pst* I, *Eco* RI, *Hind* III, *Bgl* II y *Bam* HI). La figura 6G muestra la autorradiografía obtenida después de exponer la membrana a placas de rayos X, en ésta se observa que el patrón de banda para cuatro de las restricciones correspondientes a las enzimas *Pst* I, *Eco* RI, *Hind* III, y *Bgl* II, es de sólo una y todas tienen diferente tamaño, mientras que un patrón de 2 bandas se aprecia en el carril 2, donde se corrió el ADN digerido con la enzima *Bam* HI.


1	AAATTCGCCTACTGGAACCTTCGTGGGCTTGGACAACCAATTCGTCTGATTTGGAGTTC <u>K F A Y W N L R G L G Q P I R L I L E F</u>	24
61	ATATGAAGACATCAGCGTGCAAAACGCTTTCAGCTGCAGAAAAGAACAGTGGTTCGCG <u>I S V P Y E E K R F Q A A E K E Q W F A</u>	44
121	GAGAAGTATGATTTGGGTTTCGACTTCCGAACTTGCCTACTTGATAGATGGTGATAAA <u>E K Y D L G F D F P N L P Y L I D G D K</u>	64
181	AAGATTACGCAGTCCCATGTAATCACTATGTATTTAGGCAAAAAACATGGACTAGCCGGT K I T Q S H V I T M Y L G K K H G L A G	84
241	GACAATGATGACGACCTAATAATGATTGCTATGGCTGAGGGAGGAATAAAGGATTTGCGT D N D D D L I M I A M A E G G I K D L R	104
301	CAGGGGATCTCGAAAATCGCTCTCAATCCAGACTATGAAAACTTAGGCCTGATTTTCATG Q G I S K I A L N P D Y E K L R P D F M	124
361	CCTACGTTCTTCAAGGGGCTTGAGACTATCTCCAACCTTCTTGGGAAATAAAAAGTACCTC P T F F K G L E T I S N F L G N K K Y L	144
421	ATTGGTGATAAGCTCTGTATGCTGACTTCGTCTGTACGAGAATTTGGATGTGTTCGAG I G D K L C Y A D F V L Y E N L D V F E	164
481	ATTTTTGAACCAAAATGTTGGACAAATTTCCCAATCTTAAACGCTTCAAGAGAGAATTT I F E P K C L D K F P N L K R F K R E F	184
541	GAGTCTCTGCCAAGATCAAGGCATACCTGGAGTCCGACCGTTGCATTAAGTGGCCGCTG E S L P K I K A Y L E S D R C I K W P L	204
601	AACAATTGGATCGCGAAATTCGGCGGTGGTTTGAACCCCTAAAAAAGAT TA AGGAATC N N W I A K F G G G F E P P K K R -	221
661	TAAAGACTGACTTACCACATTTTGCTTTAACTGTACCCTCCGTCAACCTTTTCTCGTTG	
721	CTCAACTTACAAATGCAGTTCACACAGCACCCTTCTCATACCCATTGTCCAGTTATA	
781	AATGC AATAA AATTCGGTTAGAATTTGCACTTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
841	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Figura 6E. Se muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenidos de los insertos provenientes de las clonas 4.2.2.1 y 1.2.2.1. Los aminoácidos subrayados corresponden aquellos que conforman la sonda GST26-1-GST26-2. Los números a la izquierda corresponden a los pb mientras que los números de la derecha señalan los aminoácidos traducidos. En negritas se muestra el codón de terminación (posición 652), la secuencia nucleotídica subrayada y en negritas pertenece a la señal de poliadenilación (posición 786).




Sitio
 GST26.5 MNKYKFAYWNLRLRGLGQPIRLILEFISVPYEEKRFQAA-----EKEQWFAEKYDLGDFDPN 55
 GST25.5 -MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLLKYLGVVEYHDKRYHVGPAFNFDRSEWLSEKFTLGLDFPN 59
 *** .*** . *** * .. * * .***.. ----- * . * . * * * * *

μ -Loop



Sitio
 GST26.5 LPYLIDGDKKITQ MYLGKKHGLAGDNDLIMIAAEGGIKDLRQISKIALNPD 115
 GST25.5 LPYYMDGDLKLTQ EYIADRHGMIPDCKKRRRAVLHMLQCEVLDDLRAQAFTRICYSPD 119
 *** .*** * .*** * * .*** * .. * . * . * * * * * *



Sitio
 GST26.5 YEKLRPDFMPTFFKGLLETISNFLGNKKYLIGDKLCYADFVLYENLDVFEIFEPKCLDKFP 175
 GST25.5 FEELKPGFFETLAQKLPNFETYLGDKEWLTGKINYPDFALCELLSQLTKFEPTCLKPKY 179
 . * . * * * * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *



Sitio
 GST26.5 NLKRFKREFESLPKIKAYLESDRCIKWPLNNWIAKFGGGFEPKRR 221
 GST25.5 KLQAYLERFENLPQLSGYSSKEFKTCCNGVSAKWRGDC----- 219
 * . . * * * * . * . * * . * * . * * * *

α 9-Helix

Figura 6F. Comparación entre las secuencias de las dos isoformas de GST de *T. solium* encontradas hasta ahora [40, 41] donde se marca con las letras G y H los aminoácidos que forman el sitio de unión al GSH y al sustrato respectivamente. La numeración a la derecha indica los residuos de aminoácidos. Sobre fondo negro se muestran los aminoácidos de la secuencia SNAIL/TRAIL que caracterizan a las GST. Subrayados y escrito en la base de la secuencia se muestran los aminoácidos que forman las estructuras " μ -loop" en la GST de 25.5 kDa y " α 9-helix" en la GST de 26.5 kDa. En negritas se encuentran los aminoácidos que involucrados en la actividad de la enzima para la conjugación del GSH [51]. La identidad entre ambas GSTs se marca con asteriscos.

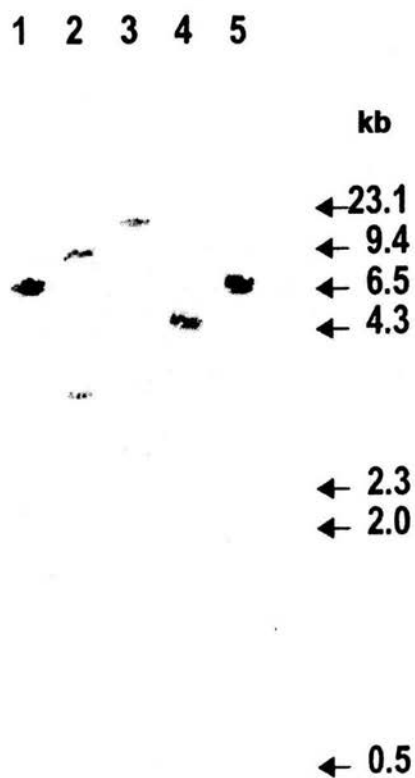


Figura 6G. Southern blot. De izquierda a derecha se muestran los carriles correspondientes a cada restricción del ADN genómico de *T. solium* con una endonucleasa diferente. En el carril 1 se muestra la restricción con *EcoRI*; el carril 2 corresponde a *Bam* HI; carril 3 a *Hind* III; 4 a *Pst* y 5 a *Bgl* II.

VII. Discusión

Se ha reconocido que todos los organismos aerobios tienen un metabolismo oxidante y que con él se desarrolló una maquinaria de enzimas para poder inactivar, degradar y excretar todas aquellas moléculas que por acción del oxígeno pudieran causar un daño parcial o total a las células. Sin embargo, en algún momento de la evolución las especies químicas que causaban estas lesiones se utilizaron como defensa en contra de otros organismos parásitos, tal y como sucede con *T. solium*, el cual crece en un ambiente pobre en oxígeno pero se encuentra expuesto a el ataque de ROS producidas por células del sistema inmune de su hospedero que le causan estrés oxidativo [44, 45]. Aún así *T. solium* al igual que otros organismos, ha desarrollado defensas de tipo enzimático contra las especies oxidantes reactivas (de oxígeno y nitrógeno) y contra diversos xenobióticos (como lo son los fármacos antihelmínticos, entre otros), una de estas defensas está constituida por las glutatión S-transferasas (GSTs: E.C. 2.5.1.18), familia de enzimas de la fase II de detoxificación que catalizan el ataque nucleofílico de GSH a sustratos electrofílicos.

Las GST representan para *T. solium* del 3 al 4% de la proteína soluble total, indicando su alto nivel de expresión y lo necesario que es para el parásito. Por esta razón se postulan como el principal sistema de detoxificación del helminto [1, 7, 43]. Además porque no posee enzimas como el citocromo P450, la catalasa y la glutatión peroxidasa. También se ha señalado que esta enzima, la GST, es de suma importancia para la supervivencia del parásito, ya que como lo han demostrado estudios anteriores esta enzima puede conjugar varios xenobióticos con la misma eficiencia que una GST de mamífero y reduce la susceptibilidad del parásito hacia el ataque por electrófilos. Además los estudios de vacunación realizados con estas enzimas demuestran que proveen un alto grado de protección, reduciendo considerablemente la carga parasitaria [41, 42].

El propósito de caracterizar el ADNc de la GST de 26.5 kDa de *T. solium* obedece a la necesidad de generar soluciones que permitan detener y erradicar las enfermedades que genera este parásito, la cisticercosis y la teniosis.

Un primer paso hacia el proceso de descripción y de lo antes mencionado con respecto a la enzima constituyó el obtener un fragmento o sonda de ADN que codificará para la enzima en cuestión. Este se produjo mediante PCR, con cebadores específicos denominados GST26-1 y GST26-2, que permitieron la amplificación de un segmento de 200 pb del gene que al ser secuenciado y analizado mostró que codificaba una GST diferente a la GST de 25.5 kDa de *T. solium* antes caracterizada. Los tamizajes hechos en una biblioteca de ADNc de *T. solium* con este fragmento nos permitió aislar y caracterizar el ADNc que codifica una nueva GST.

La secuenciación y los análisis de este ADNc mostraron un inserto de 866 nucleótidos que codifica una proteína de 217 aminoácidos con un sitio de poliadenilación clásico. No se encontró la señal de inicio de traducción, probablemente a que el mensajero sufrió degradación.

Los análisis de comparación mostraron que la secuencia primaria deducida del ADNc presenta los motivos que son característicos a la familia de las GSTs, como la secuencia de consenso SNAIL/ TRAIL localizada en la porción correspondiente a la hélice α -3. También con estos análisis pudo evaluarse el grado de conservación del dominio N-terminal, donde se encuentra el sitio G, cuando fue comparado con GSTs de otros organismos [51].

Por otro lado, las comparaciones de la secuencia primaria entre las GST de *T. solium*, la de 25.5 kDa y la de 26.5 kDa, que se aprecia en la figura 6F, nos indica la diferencia en número y composición entre ambas secuencias. En esta figura se observa que la GST de 25.5 kDa posee 219 residuos de aminoácidos mientras que para la GST de 26.6 kDa son 221, además ambas GSTs comparten 82 aminoácidos idénticos. Cabe mencionar que muchas de estas identidades están relacionadas con los sitios catalíticos de la enzima, que generalmente corresponden a las áreas conservadas entre la familia de las GSTs.

Entre los aminoácidos más importantes en la función catalítica de la enzima y que se repiten en ambas secuencia encontramos una Tyr en posición 7 para la GST de 25.5 kDa y en posición 8 para la GST de 26.5 kDa. Esta Tyr está relacionada con la Tyr9 de mamíferos que se sabe es la responsable de activar el GSH mediante el grupo hidroxil que posee. Otro aminoácido importante y muy conservado en las GSTs es la Arg en posición 12 y 19, que en mamíferos corresponden a las Arg 13 y 20. Este aminoácido en estas posiciones, permite la unión y estabilización del GSH en la cavidad del sitio G en la enzima. Además en la figura 6F se muestra remarcado en amarillo la secuencia NLP, que en mamíferos correspondería a la secuencia QVP y que es al lazo que conecta a las estructuras secundarias α 2 y β 3. La importancia de este lazo radica en que tiene interacción directa en el sitio de unión al GSH. Por último, dentro del dominio N-terminal, tenemos una Thr67 y una Gln68, que son los aminoácidos responsables de anclar la porción γ -glutamil del GSH [35].

Con respecto a los aminoácidos involucrados en los sitios de unión al sustrato y que además son idénticos en ambas secuencias tenemos un Trp y dos Pro que no encuentran correspondencia con GSTs de mamíferos (por las posiciones) por lo que no podríamos referirnos a alguna actividad en específico, no obstante los análisis de comparación realizados con el banco de datos Gen-Bank [51] demostró que estos aminoácidos están altamente conservados entre las GSTs de varios organismos. Cabe destacar, que las conexiones hechas entre los aminoácidos con función catalítica de las GST de *T. solium* y con las de mamífero se hicieron con relación a las GST de clase alpha/mu/pi y en especial a las de alpha y mu, ya que anteriormente se había reportado que las GSTs del parásito presentan relación con éstas clases [40, 41] y al menos para la GST de 25.5 kDa su correspondencia a la clase mu está bien documentada [41].

A pesar de que la GST de 26.5 kDa presenta la misma estructura secundaria de alfa hélices y hojas beta que la GST de 25.5 kDa, posee algunas características peculiares que son una fuerte indicación de las diferencias que guarda con la GST del parásito ya documentada. Una de ellas es una Phe en posición 53 que está relacionada a las interacciones tipo "llave-cerradura" entre los monómeros de las GSTs de las clases alpha/mu/pi en mamíferos [1] y que no se encuentra en la GST de 25.5 kDa. También existe una Asn en posición 10 y un Glu en posición 216 relacionados al sitio de unión al sustrato. Estos aminoácidos en su conjunto van a permitir la formación de puentes de hidrógeno y le van a dar al interior de éste sitio un grado de hidrofobicidad al área hidrofóbica al que son introducidos [35].

Por otra parte, estudios anteriores [40, 41] habían propuesto, por medio de una secuencia amino terminal, que ambas GSTs pertenecían a la clase Mu, sin embargo al analizar la secuencia de aminoácidos podemos determinar que lo anterior no es totalmente correcto, ya que, aunque la GST de 26.5 comparte varias identidades con la GST de 25.5 kDa no posee el lazo mu ó "mu loop" que la GST de 25.5 kDa tiene [41], pero posee la hélice α_9 característico de la clase alpha [1, 35, 51], que en la secuencia de la GST 25.5 no se encuentra. Estos hechos y las diferencias entre las secuencia en sitios tan importantes como son los motivos $\beta\alpha\beta$ y $\beta\beta\alpha$ nos permite deducir que la forma de unir el glutatión y activarlo es diferente, por lo tanto la GST de 26.5 kDa no puede pertenecer a la clase Mu, a pesar de compartir ciertas identidades con ésta clase, lo que se considera normal, ya que en general entre las GST de las clases alpha/mu/pi se comparte un 30% de identidad [1, 35].

Llegando a este punto cabría resaltar que aunque los análisis realizados en la región codificante del ADNc, nos sugieren que la GST de 26.5 kDa presenta una tendencia más cercana a la clase alpha, estas observaciones y razonamientos no son suficientes para categorizar la enzima en una clase, ya que como se mencionó en la introducción, se necesitan realizar otros estudios, como determinar la estructura del gen, la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima, propiedades bioquímicas e inmunológicas para dar una clasificación adecuada.

Por último, el análisis de tipo Southern blot, el cual presentó un patrón de bandeo simple, nos indica que al igual que la GST de 25.5 kDa [42] existe una copia única para la GST de 26.5 kDa en el genoma de la *T. solium*.

En conclusión, sólo queda señalar que el conocer la secuencia primaria nos sirve como primer punto de comparación para comenzar a determinar las diferencias no sólo entre las GSTs presentes en *T. solium*, sino también las diferencias con respecto a las GSTs de sus hospederos. Este tipo de datos nos permite visualizar las diferencias en la estructura de las proteínas, dándonos diversas probabilidades para determinar el rango de acción que obtendríamos en caso de querer diseñar inhibidores específicos en contra de la enzima (sean de tipo farmacológico o inmunológico). Cada cambio en la secuencia es una posibilidad para evitar reacciones cruzadas o indeseables si se trata de inactivar la enzima del parásito sin dañar la de sus hospederos.

Además, estaríamos ante la posibilidad de encontrar sitios antigénicos únicos que podrían derivar en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, así como el diseño de vacunas y fármacos en contra de *T. solium*.

Por otro lado, el conocimiento del gene, número de copias, la secuencia primaria que codifica, con respecto a otros organismos, incluido el humano y el cerdo, permitirá estudiar como se regula y se controla el gen para la GST26.5 en *T. solium*.

VIII Conclusiones

Los análisis de la secuencia nos muestran:

1. El ADNc identificado codifica una GST de 26.5 kDa.
2. Esta GST de 26.5 kDa es distinta a la GST de 25.5 kDa de *T. solium*.
3. El gene que la codifica es de copia única en el genoma del parásito.
4. La estructura primaria de la GST de 26.5 kDa muestra características semejantes a las GSTs de clase alfa.

IX Anexo

Soluciones

Agar SOMB: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5mM, MgCl₂ 10 mM y agar bacteriológico 1.5% (p/v)

Agar top SOMB: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5mM, MgCl₂ 10 mM y agar bacteriológico 0.7% (p/v)

Amortiguador de cargado (ADN) : EDTA 0.2M, Azul de bromofenol 0.1%, xileno cianol FF 0.25%, Ficol en H₂O 15%

Amortiguador TAE: Tris-HCl-acético 0.04M, EDTA 0.002M

Amortiguador TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH= 8

Gel de agarosa 2%: agarosa 1 gr., amortiguador TAE 50 mL, bromuro de etidio 4 µL.

Medio LB: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.05% (p/v), NaCl 1% (p/v).

Medio SM: NaCl 0.58 (p/v), MgSO₄•7H₂O 0.2% (p/v), Tris-HCl 0.05%(p/v) pH= 7.5, gelatina 0.01% (p/v).

Solución de lavado: NaCl 0.2M, Tris-HCl 20mM pH= 7.2, EDTA 2 mM, etanol 50% (v/v).

Solución PEG: PEG 20% (v/v), NaCl 2M en 2% (v/v)

Solución de hibridación: SSC 5X, formamida 50% (v/v), SDS 0.2% (p/v)

Solución desnaturalizante: NaOH 0.5M, NaCl 1.5M

Solución neutralizante: Tris-HCl 1M, NaCl 1.5, pH= 8

Solución SSC 5X: NaCl 0.75M, citrato de sodio 0.075M

X Referencias

10.1 Hemerográficas

- [1] Armstrong R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the Glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 2-18.
- [2] Carpio A. (2002). Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect. Dis.*, **2**, 751-762.
- [3] Chung J.Y., Bahk Y.Y., Huh S., Kang S.Y., Kong Y., Cho S.Y. (1999). A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *JID*, **180**, 1307-1315.
- [4] Collison E.J., Grant C. M. (2003). Role of yeast Glutaredoxins as Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 22492-22497.
- [5] Cyrne L., Martins L., Fernandes L., Marinho S. (2003). Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radical Biol. & Medicine*, **34** (3), 385-393.
- [6] Dickinson D.A., Forman H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Phar.*, **64**, 1019-1026.
- [7] Eaton D.L., Bammler T.K., (1999). Concise review of the Glutathione S-Transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sciences*, **49**, 156-164.
- [8] Fernández-Checa J.C. (2003). Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. & Biophys. Res. Com.*, **304**, 471-479.
- [9] Flisser A., Sarti E., Lightowers M., Schantz P. (2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica*, **87**, 43-51.
- [10] Fubini B., Hubbard A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica inflammation and fibrosis. *Free Radical Biol. & Medicine*, **34** (12), 1507-1516.
- [11] Guo J., Pal A., Srivastava S. K., Orchard J.L., Singh S.V. (2002). Differential expression of glutathione S-transferase isoenzymes in murine small intestine and colon. *Comparative Biochem. & Phys.*, **131**, 443-452.
- [12] Hansberg W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico*, **26**, 19-51.

- [13] Hayes J.D., Chanas S.A., Henderson C.J., McMahon M., Sun C., Moffat G.J., Wolf C.R., Yamamoto M. (2000). The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem. Society Transactions*, **28** (2), 33-41.
- [14] Jiménez L., Vibanco N., Navarro L., Landa A. (2000). Cloning, expresión and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *International J. for Parasitology*, **30**, 1007-1012.
- [15] Klion A., Nutman T.B. (2002). Immunity to parasitic worms. *Encyclopedia of life sciences*, 5-8.
- [16] Kwatia M., Botkin D.J., Williams D.L. (2000). Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase. *J. parasitol.*, **86** (5), 908-915.
- [17] Laffon B., Pérez-Cadahía B., Pásaro E., Méndez J. (2002). Individual sensitivity to ADN damage induced by styrene in vitro: influence of cytochrome P450, epoxide hydrolase and glutathione S-transferase genotypes. *Toxicology*, **186**, 131-141.
- [18] Lightowlers M.W. (2003). Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Tropica*, **87**, 129-135
- [19] Lightowlers M.W., Colebrook A.L., Gauci C.G., Gauci S.M., Kyngdon C.T., Monkhouse J.M., Vallejo C., Read A.J., Rolfe R.A., Sato C. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Veterinary Parasitology*, **115**, 83-123.
- [20] Mafojane N.A., Appleton C.C., Krecek R.C., Michael L.M., Willingham A.L., III (2003). The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern of Africa. *Acta Tropica*, **87**, 25-33.
- [21] Mannervik B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Rel. areas Mol. Biol.*, **57**, 357-417.
- [22] Montero E., Gozález L.M., Harrison L.J.S., Parkhouse R.M.E., Garate T. (2002). *Taenia solium* cADN sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for human cysticercosis. *J. of Chromatography B*, **786**, 255-269.
- [23] Pauwels F., Vergauwen B., Vanrobaeys F., Devreese B., Beeument J. (2003). Purification and characterization of a chimeric enzyme from *Haemophilus influenzae* Rd that exhibits Glutathione-dependent peroxidase activity. *J. Biol. Chem.*, **278** (19), 16658-16666.

- [24] Plancarte A., Flisser A., Gauci C.G., Lightowers M.W. (1999). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International J. for Parasitology*, **29**, 643-647.
- [25] Puglisi R., Tramer F., Panfili E., Macali F., Sandri G., Boitani C. (2003). Differential splicing of the phospholipid hydroxiperoxide Glutathione preoxidase gene in diploid and haploid male germ cells in the rat. *Bio. Reproduction*, **68**, 405-411.
- [26] Rajshekhar V., Joshi D.D., Doanh N.Q., van De N., Xiaonong Z. (2003). *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Tropica*, **87**, 53-60.
- [27] Ross V.L., Board P.G., Webb G.C. (1993). Chromosomal mapping of the human Mu class Glutathione S-transferases to 1p13. *Genomics*, **18**, 87-91.
- [28] Rossjohn J., Feil S.C., Wilce M.C.J., Sexton J.L., Spithill T.W., Parker M.W. (1997). Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* Glutathione S-transferase. *J. Mol. Biol.*, **273**, 857-872.
- [29] Samiec P.S., Dahm L.J., Jones D.P. (2000). Glutathione S-transferase in mucus of rat small intestine. *Toxicol. Sciences*, **54**, 52-59.
- [30] Sarti E. (1997). La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*, **39** (3), 225-231.
- [31] Sarti E., Rajshekhar V. (2003). Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Tropica*, **87**, 137-143.
- [32] Sciuotto E., Martínez J.J., Huerta M., Avila R., Fragoso E., Villalobos N., Aluja A., Larralde C. (2003). Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Veterinary Parasitology*, **116**, 223-229.
- [33] Sciuotto E., Fragoso G., Fleury A., Lacleste J.P., Sotelo J., Aluja A., Vargas L., Larralde C. (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a mayor health problem of global dimensions. *Microbes and Infections*, **2**, 1875-1890.
- [34] Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classifications of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.*, **360**, 1-16.
- [35] Sinning I., Kleywegt G., Cowan S., Reinemer P., Dirr H., Huber R., Gilliland G., Armstrong R., Ji X., Board P., Olin B., Mannervik B., Jones A. (1993) Structure determination and refinement of human Alpha class Glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J. Mol. Biol.*, **232**, 192-212.

- [36] Strange R.C., Spiteri M.A., Ramachandran S., Fryer A.A. (2001). Glutathione S-transferases family of enzymes. *Mutation Res.*, **482**, 21-26.
- [37] Tsang V.C., Brand J.A., Boyer A.B. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.*, **59**, 50-59.
- [38] Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.*, **84**, 74-81.
- [39] van Bladeren P. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interactions*, **129**, 61-76.
- [40] van Haften R., Haenen G., van Bladeren P., Bogaards J., Evelo C., Bast A. (2003). Inhibition of various glutathione S-transferase isoenzymes by RRR- α -tocopherol. *Toxicol. In Vitro*, **17**, 245-251.
- [41] Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Merchant M.T., Landa A. (1999). Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.*, **85** (3), 448-453.
- [42] Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Mendoza -Hernández G., Landa A. (2002). Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.*, **88**, 398-404.
- [43] Vuilleumier S., Pagni M. (2002). The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 138-146.

10.2 Bibliográficas

- [44] Abbas A., Lichtman A. H., Pober J. *Citocinas: Inmunología celular y molecular*. Idem, 4ª, McGraw Hill, España, 2002.
- [45] Docampo R. *Antioxidant Mechanisms: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Marr J., Muller M., Academic Press, San Diego, 1995.
- [46] Schmidt G.D., Roberts L.S. *Cestoidea: Form, function, and classification of the tapeworms: Foundations of parasitology*. Idem, 6ª, McGraw Hill, USA, 2000.
- [47] Tracy J.W., Vande E. A. *Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Marr J., Muller M., Academic Press, San Diego, 1995.

10.3 Electrónicas

[48] mnemonica.org/docs/patologia/Neurocisticercosis.doc

[49] <http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/medicam/cestoci.html>

[50] <http://www.antioxidantes.com.ar/12/Art006.htm>

[51] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>