



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Caracterización molecular de la región estructural del gen
que codifica para la enzima Triosa fosfatoisomerasa
en *Taenia solium*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Hugo Antonio Hernández Pérez.



MÉXICO, D.F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

m. 341268



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.

Jurado asignado:

Presidente	Ma. Elsa Escudero García
Vocal	Felipe Cruz García
Secretario	Abraham Landa Piedra
1er. Suplente	José Pedraza Chaverri
2do. Suplente	Berta Espinoza Gutiérrez

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.



Hugo Antonio Hernández Pérez
Sustentante.

El presente trabajo de investigación 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 dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 43806-M que corresponde al proyecto "Desarrollo de inhibidores específicos contra *Taenia solium*" y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN210603-03, "Enzimas del metabolismo detoxificante blancos para el desarrollo de nuevos inhibidores contra *Taenia solium*".

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar y agradecer en primer lugar a aquella persona que siempre ha estado conmigo, que ha vivido todo lo que he vivido, que ha andado todo este camino a mi lado y me ha dado apoyo de muchas maneras, gracias por ponerme en este lugar, por darme la familia que tengo, por darme amigos sinceros, por darme el amor y la felicidad que poseo. Gracias por todo lo que he recibido y aún más por todo aquello que aún no me has dado. Gracias Dios.

A mis padres, gracias mamá por ser antes que nada mi amiga, por comprenderme, por apoyarme, por siempre demostrarme tu cariño, afecto y protección estando a mi lado, por confiar en mí, por impulsarme en cada momento de mi vida, por ser un gran soporte en mi vida, gracias por toda una vida de cariño, amor y de familia.

A mi papá por todo el inmenso apoyo que me has dado en todo momento, sobre todo en los difíciles, por enseñarme que un cambio de actitud siempre hace la vida mejor para mí y para todos, por acercarse a mí y a mis hermanas cada vez más, por interesarse en lo todo lo que me pasa y sobre todo por enseñarme el sentido de la responsabilidad.

A mi pequeña hermana Perla, por tantas y tantas cenas divertidas, por ser atenta, por apoyarme, por quererme y demostrármelo siempre, por toda la paciencia que me tienes sobre todo en esos momentos en que el trabajo me abruma, por tener esa sonrisa que me da risa, por todo lo que me has enseñado aunque no te lo diga, por dejarme estar contigo desvelándonos estudiando o platicando, gracias por tanto que has compartido conmigo..... por la confianza que me tienes.

A mi hermana Berenice por todo lo que hemos compartido, buenos y malos momentos, pero sobre todo por hacerme sentir que siempre estás conmigo, por darme ejemplo de madurez y responsabilidad, por ser tan sincera siempre y por darnos una familia muy feliz, por mis sobrinos Fátima y Cesarito, por compartir tu felicidad conmigo y mi cuñado César por quitarme tanto estrés con sus pláticas amenas, juegos y visión de la vida.

A mis abuelitos, Ricardo y Juanita por que ustedes aprendí por primera vez lo que es el trabajo y el esfuerzo, me enseñaron que siempre hay necesidades, unas que se pueden cubrir y otras que no, pero no significa que necesitemos de ellas para tener una vida plena.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias al Doctor Abraham Landa por permitirme terminar y compartir esta etapa de mi vida con él, gracias por todo lo que aprendí, por ser siempre atento con sus alumnos, por preocuparse por cada uno de nosotros, por no ser una figura ausente sino siempre presente, gracias Doc porque disfruté mucho mi estancia en el Laboratorio de Biología molecular de la Facultad de Medicina.

Gracias a la Doctora Lucía Jiménez por que con ella aprendí muchas de las técnicas que ahora conozco, por toda la paciencia que me tuvo, por siempre explicarme todas las dudas que se me presentaban, por preocuparse por mí y sobre todo gracias por toda su atención.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina, UNAM, porque siempre pude aprender cosas nuevas de cada uno de ellos: Alicia, Alex, José, Gaby, Richie, Ana, Iara, Vic, Felipe, Isela.

Un agradecimiento muuuuy especial a mi amiga y Profesora Ruth Martín, gracias porque me has apoyado mucho desde que me conoces, me impulsas, me das ánimos para seguir adelante, por toda la inmensa confianza que me pones en mí y no te fallaré. También te agradezco que con tu ejemplo me hayas enseñado que la docencia es más que decir un monólogo frente a un grupo, es compartirles de nuestra experiencia, es entusiasmarlos con ejemplos y es motivarlos día a día, que las clases deben de ser dinámicas y una interacción constante con los alumnos. Gracias de verdad Ruth por todo lo que me has enseñado, por todo lo que has compartido conmigo, por tanto apoyo que me has dado y sobre todo por ser mi amiga.

Al Profesor Alejandro Camacho por que también con él adquirí experiencia docente, control de grupo y también la alegría de ser maestro, motivación a ser siempre mejor y a seguir siempre adelante, gracias por los buenos deseos que siempre tiene para conmigo.

A mi estima Profesora Adriana, porque siempre me demostraba su afecto, por tener siempre una sonrisa para regalar, por compartir su experiencia conmigo y por impulsarme a ser mejor cada día.

π A mis amigas de la Facultad de Medicina: Erika, Azul (Marisol), Liz, Ceci que aunque tengo poco de conocerlas de verdad las estimo y me gusta mucho platicar con ustedes, gracias por permitirme conocerlas un poco más cada día, por compartir tantas experiencias conmigo y preguntar a cerca de mí.

AGRADECIMIENTOS.

Por su puesto quiero agradecer a Okarin por caminar conmigo en esta corta pero tan importante etapa de mi vida, por darme ánimos y siempre apoyarme a seguir adelante, por decirme que puedo hacer todo lo que me proponga; agradezco cada día el haberte conocido, el poder tenerte a mi lado y apoyarnos juntos. Gracias por todo tu cariño, por ser tan noble, sincero, por estar a mi lado y yo al tuyo. Gracias por quererme y caminar conmigo este tiempo y mucho más. GRACIAS CH.....

A todos mis amigos de la Facultad de Química:

- π A Fátima porque desde siempre has sido unas de mis mejores amigas, la primera que hice en la facultad, por conocerme tan bien como me conoces, por estar a mi lado en todo momento, por todo tu cariño, por tantos y tantos buenos momentos y por todo tu apoyo... por ser solo tú conmigo.
- π A mi amiga Char tan linda conmigo, por saludarme siempre con una gran sonrisa que es capaz de alegrarme el día, me haces sentir muy especial, gracias por quererme, por ser mi súper amiga, por toda la confianza y por impulsarme con tu ejemplo.
- π A Maricela por su ejemplo de superación, por su visión de la vida y claro por la chispa que tiene y me alegra mis días.
- π Ana, muchas gracias por todo el apoyo que me has dado a lo largo del tiempo que tengo de conocerte, por siempre darme tanto cariño, por toda la paciencia que me tienes y más gracias por todo lo que me apoyaste y enseñaste durante mi estancia en el laboratorio.
- π A mi amiguita lara por dejarme conocerte mejor, por ser tan linda conmigo, por todo tu cariño, por toda la confianza ganada y por hacer crecer nuestra amistad mucho más.
- π Víctor eres un gran ser humano, gracias por dejarme conocerte mejor, por tantas pláticas amenas, por lo que me has enseñado y por toda tu confianza.
- π A Liliana y Martuchis que hemos sido amigos desde hace tiempo, por que hemos pasado muchos momentos agradables, sonreído, platicado y compartido. Por escucharme siempre, por preocuparse por mí, por ser amigas tan cercanas y nunca olvidarse de mí.
- π Perlita, hemos sido amigos desde hace mucho tiempo, gracias por ser sincera, espontánea, ves la vida la mayoría de las veces de manera positiva y gracias por compartir conmigo parte de este camino.
- π A mi estimado Carlitos Boites: eres de los mejores amigos que he tenido a lo largo de tooooooda mi vida, gracias por compartir conmigo tantas cosas, por tantos momentos de pláticas, por tanta confianza que me tienes y que por supuesto te tengo, por apoyarme en tantas cosas y por compartir tu felicidad conmigo. Gracias amigo.
- π A Liliana por dejarme conocerte mejor, por compartir tanto y tanto en tan poco tiempo, por tanta confianza que nos tenemos y que nos permite entendernos mejor, por siempre preocuparte por mí, por estar atenta a lo que pasaba, por preocuparnos siempre uno de otro, por compartir muchas experiencias conmigo.

AGRADECIMIENTOS.

- π A Dan por su amistad, por su ejemplo de madurez, por tomar la vida de manera positiva, por sonreír la mayor parte del día, por contagiarme de buena vibra y por ser mi amigo en todo momento.
- π A George por que eres uno de los amigos más nobles que he tenido, como ya te lo he dicho, por dejarme conocerte mejor... por la oportunidad de ser amigos.
- π A Oscar por ser siempre sincero, por ser mi amigo, uno de los mejores que he tenido, por tenerme tanta confianza, por escucharme cuando lo necesito, por apoyarme, por preocuparte, a tu manera de mí. Gracias.
- π A Rafa por la oportunidad de conocerte mejor como persona, como amigo.
- π Ros por ver siempre lo mejor de la vida, por preguntar como estoy, como me va, y ser una de mis primeras amigas de la facultad.
- π A mi amigo Oswi por ser un muy buen amigo conmigo, por preocuparse por mí, por poder tener una plática siempre tan abierta y de tanta confianza, por tantas sueños y metas que has compartido conmigo y gracias por hacerme parte de tu vida.
- π A Cris y Rick por ser amigos desde hace ya muchos años y por tanto que hemos pasado juntos.....
- π Fernando, gracias por tu experiencia, por tus palabras de apoyo y consejo, por exponerme la vida desde tu perspectiva, por compartirla conmigo y por todo el cariño me has demostrado.
- π A Rayo por ser amigo, por darme apoyo y siempre una sonrisa de saludo.
- π A todos mis amigos con los cuales he compartido una etapa de mi vida y que la han hecho especial: Chio, Raul, Jessica, Paco, Israel, Paola, Fany, Mitzzy, Abraham, Ulises, Pepo, Olmito.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Agente etiológico	10
1.2 Ciclo de vida, biológico y transmisión.	13
1.3 Epidemiología.	14
1.3.1 Teniosis.	16
1.3.2 Cisticercosis humana.	16
1.3.3 Cisticercosis porcina.	17
1.4 Cuadro clínico.	17
1.5 Diagnóstico.	19
1.6 Tratamiento.	21
1.7 Control de la Teniosis/cisticercosis y vacunación.	22
1.8 Respuesta inmunológica.	25
1.9 Metabolismo.	25
1.9.1 Glucólisis.	25
1.9.2 Triosa fosfato isomerasa.	26
2.0 Avances y perspectivas de la Biología molecular.	27
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.	29
3. HIPÓTESIS.	30
4. OBJETIVOS.	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	32
5.1 Materiales.	32
5.1.1 Reactivos.	32
5.1.2 Material biológico.	32
5.1.3 Síntesis de oligonucleótidos.	32
5.2 Métodos.	33
5.2.1 Preparación de ADN genómico.	33
5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa.	33

ÍNDICE GENERAL

5.2.3	Obtención del vector TOPO-TA.	33
5.2.4	Reacciones de digestión con endonucleasas.	34
5.2.5	Electroforesis y Purificación de los fragmentos de ADN y el vector TOPO-TA.	34
5.2.6	Reacción de ligado.	35
5.2.7	Transformación.	35
5.2.8	Preparación pequeña de ADN plasmídico y selección de clonas.	35
5.2.9	Preparación grande de ADN plasmídico.	36
5.3.1	Secuenciación.	37
5.3.2	Southern blot.	37
5.3.3	Marcaje de la sonda.	39
6.	RESULTADOS.	40
6.1	Obtención y caracterización del fragmento genómico que codifica para la región estructural del gen de <i>TPI</i> de <i>Taenia solium</i> (TPI).	40
6.2	Caracterización de la región estructural del gen para la <i>TPI</i> .	42
6.3	Southern blot.	44
7.	DISCUSIÓN.	46
8.	CONCLUSIONES.	49
9.	ANEXO.	50
10.	BIBLIOGRAFÍA.	52

ABREVIATURAS

"y"	Número de veces la concentración.
α - ³² P	Fósforo 32 alfa.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario.
gADN	Ácido desoxirribonucleico genómico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
°C	Grados centígrados.
c.b.p	Cuanto baste para.
dNTP's	Trifosfato de desoxirribonucleótidos (A, C, G, T).
EDTA	Etilendiaminotetracético.
IgG	Inmunoglobulina clase G
Kb	Kilobase
pb	Pares de bases
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
μ L	Microlitros
μ g	Microgramos
μ J	Microjoules.
mM	Milimolar
min.	Minutos
h	Horas
nm	Nanomolar
pm	Picomolar
UV	Ultravioleta
ATP	Adenosin trifosfato
C1,2	Carbono 1 y 2
DO	Densidad óptica
Fig.	Figura
L	Litro
NAD	Nicotin adenin dinucleotido
U	Unidades

RESUMEN

La taeniosis/cisticercosis humana causadas por *Taenia solium* es una enfermedad asociada a la pobreza en áreas donde se come carne de cerdo y donde estos animales se crían de manera tradicional. Es endémica en el África subsahariana; América Central, el área andina de América del Sur, Brasil, China, el subcontinente indio y el sureste asiático, además de que se comienzan a presentar focos en países no endémicos debidos a los movimientos migratorios. México no es la excepción y para ello se han estado implementando esfuerzos para erradicarla a través del desarrollo de vacunas y de fármacos que actúen inhibiendo el establecimiento o desarrollo del parásito. Otras estrategias están basadas en el estudio del genoma del parásito; como es el caso del presente trabajo que es parte de un megaproyecto, el cual tiene como meta entender como está organizado y regulado el genoma de este parásito; iniciando con la identificación de genes que son blancos potenciales de estudio para inhibir el ciclo de vida y dispersión del parásito.

Uno de los genes identificados como blanco es el de la triosa fosfatoisomerasa (TPI) un gen que codifica una enzima vital en la vía glucolítica del parásito. En este trabajo se caracterizó al gen de la *TPI* iniciando con su amplificación por PCR a partir del DNA genómico de *T. solium*. El producto del PCR fue clonado y secuenciado por el método de Sanger. La secuencia nucleotídica obtenida tiene una extensión de 795 pb y esta compuesta de 5 exones y 4 intrones. Los intrones fueron ricos en timina y adenina, las secuencias donadora /aceptora para el proceso de corte de intrones y empalme de exones fueron (5'-GT...AG-3'). Asimismo, la secuencia de aminoácidos codificada en los exones fue 100% idéntica a la de cDNA que codifica para la TPI, previamente reportada. Finalmente, el análisis tipo Southern blot sugiere que el gen para la *TPI* es de copia única dentro del genoma de este parásito.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agente etiológico.

El término taeniosis es usado para referirse a la infección provocada por el parásito *Taenia solium* en su estadio adulto y el término cisticercosis denota la infección producida por el estadio de metacestodo (cisticerco) del parásito (Carpio, 2002). Al cestodo (término que hace referencia a la forma de cinta que presenta el parásito) (Lamonte R et al., 1988) le corresponde la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Platelmintes</i>
Clase	<i>Cestoda</i>
Orden	<i>Cyclophyllidea</i>
Familia	<i>Taenidae</i>
Género	<i>Taenia</i>
Especie	<i>Taenia solium</i>

La tenia adulta se encuentra únicamente en el intestino delgado del hombre, donde puede llegar a vivir hasta 25 años (De la Fuente et al. 1999). Este parásito mide entre 2 y 4 metros de longitud y para su descripción se divide en tres regiones principales:

- a) Escólex. Es el órgano de fijación del parásito, el cual está armado por cuatro ventosas y una doble corona de ganchos denominada rostelo con 22-32 ganchos, con un tamaño de 110-180 micras cada uno (Carpio, 2002), cuya función principal es la de permitir al parásito penetrar y sujetarse a la pared intestinal de su hospedador, además, su presencia o ausencia y la forma en que se arreglan sus ganchos es de un gran valor taxonómico para diferenciar especies. Inclusive es en el escólex donde se encuentra el principal centro nervioso, de donde parten los ganglios neuronales del gusano para enervar todo el cuerpo o estróbilo mediante los nervios longitudinales, en donde fluctúan alrededor de 20 diferentes neuropéptidos de tipo colinérgico, serotoninérgico y otros, los cuales desarrollan funciones sensorial tacto y quimiorreceptiva (Schmidt GD, 2000).

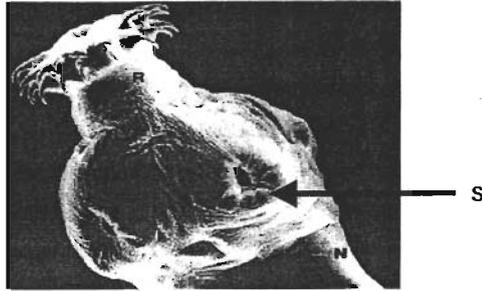


Fig. 1 Micrografía electrónica de barrido del escólex del adulto de *T. solium*. Se pueden observar las ventosas, el rostelo con una doble corona de entre 11-14 ganchos de 100-160 μm de longitud, ambas estructuras se adhieren a la pared intestinal. R, rostelo; S ventosas; N cuello. (Sciutto E et al. 2000).

- b) Cuello: Es una zona no diferenciada localizada inmediatamente después del escólex con aproximadamente 0.5 mm de longitud. Contiene células madre que aparentemente son las responsables de la producción de nuevos proglótidos (Schmidt GD, 2000), en el proceso llamado estrobilación (De la Fuente et al. 1999).
- c) Estróbilo: Sección localizada enseguida del cuello consta de 700-1000 segmentos, llamados proglótidos que constituyen la unidad reproductiva. Se distinguen tres tipos de proglótidos: los inmaduros que son cercanos al cuello y que no muestran órganos sexuales diferenciados; los maduros ubicados en la región media del parásito con órganos sexuales femeninos y masculinos bien diferenciados y los grávidos que solo muestran un útero ramificado tubular conteniendo alrededor de 40 000 huevos cada uno.

Huevo: El embrióforo es la cubierta exterior del huevo y esta constituido por una densa capa de bloques, este protege a la oncósfera o embrión hexacanto que es la forma infectante para causar cisticercosis en el cerdo o el hombre (De la fuente et al. 1999; Carpio, 2002; Sciutto et al. 2000). La oncosfera mide 30 μm de diámetro, la cual esta compuesta por algunos cientos de células diferenciadas (músculo, parte del sistema nervioso y excretor), tiene seis ganchos y un par de glándulas de penetración que le ayudan a la migración (Carpio, 2002).

El desarrollo postoncosférico del parásito ocurre en el hospedero intermediario (puerco) o accidental (humano). En ambos las oncósferas se desarrollan a metacestodos o cisticercos.

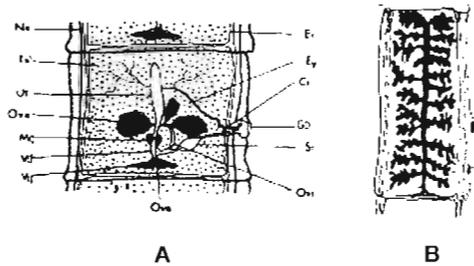


Fig. 2. A. Sistema reproductivo. El masculino consiste de: Conducto eyaculatorio (Ey), testículos (Ts), Cirrus (Ci), poro genital (Gp). La vagina finaliza en el receptáculo seminal (Sr), el cual conecta al oviducto (Ovi). Ovario (Ova), glándula vitelínea (Vg), ducto vitelíneo (Vd), glándulas de Mehlis (Mg), ovotipo (Ovo), útero (Ut). Canal excretorio (Ex). Rama nerviosa (Ns). B. Proglótidos grávidos de *T. solium*, el útero en los segmentos maduros sirve para distinguir entre especies. Los proglótidos grávidos miden 12 X 6 mm y pasan al útero que tiene entre 7 y 10 ramas laterales (Ub) con testículos y ovarios. (Sciutto et al. 2000).

El metacestodo es la fase larvaria del parásito y alcanza un tamaño aproximado de 5-8 X 3-6 mm dentro de los primeros 60-70 días presentando una forma vesicular y ovoide llena de fluido con un escólex invaginado, el cual revierte su posición cuando esta pared se rompe, permitiendo la fijación del parásito y su desarrollo dentro del hospedero definitivo el hombre (Carpio, 2002).

Como todos los cestodos *T. solium* carece de aparato digestivo por lo que requiere de la absorción de nutrientes a través de su cubierta externa la cual recibe el nombre de tegumento con una alta actividad metabólica (Schmidt GD, 2000). La estructura tegumental que cubre y recorre el cuerpo del parásito está constituida por un citoplasma de las células subtegumentales con vacuolas, mitocondrias, cuerpos densos, citoplasma de células subtegumentales, microvellosidades llamadas microtricas cubiertas por una membrana plasmática que aumentan el área de absorción del mismo. Existe un glicocálix que es la parte más externa del tegumento y favorece la actividad amilasa, tripsina, quimiotripsina, lipasa pancreática del hospedador, además de la permeabilidad hacia cationes y sales biliares (Schmidt GD, 2000).

El sistema muscular está compuesto de miocitos que contienen unas proteínas contráctiles de fibras de miocina y actina que constituyen el sistema contráctil del parásito. Los miocitos tienen un núcleo, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, un aparato de Golgi vesicular. Otras células como flamas crean conductos que drenan al fluido vesicular y otras contienen los mismos cuerpos antes mencionados y glucógeno abundante.

El tejido de la mayoría de los cestodos contiene estructuras llamadas corpúsculos calcáreos. El tamaño varía de entre 12-32 μm dependiendo de la especie y está formado por componentes inorgánicos, principalmente calcio y carbonato de magnesio; la matriz orgánica es estructurada en anillos concéntricos y una doble envoltura externa que contiene proteínas, lípidos, glucógeno, mucopolisacárido, fosfato alcalino, ARN y ADN.

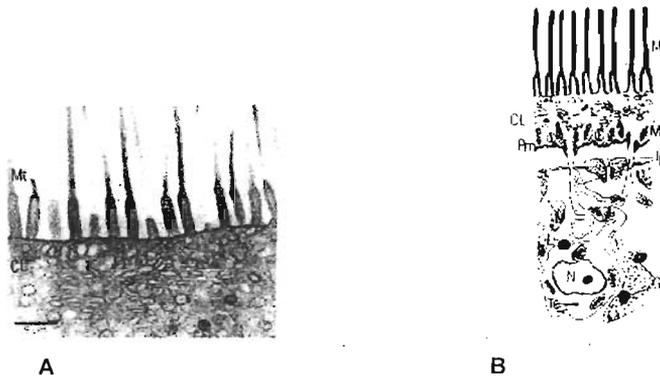


Fig 3. A. Micrografía del tegumento de *T. solium*. B. Ilustración esquemática del tegumento de *T. solium*. Capa citoplasmática (CL), mitocondria (M), Microtrícas (Mt), citones tegumentales (Tc), procesos internaciales (Ip), tejido muscular (Ms), núcleo (N), depósitos de lípidos (L), depósitos de glucógeno (G), membrana plasmática (Pm). (Sciutto et al. 2000).

1.2 Ciclo de vida, biológico y transmisión

El ciclo biológico natural de *T. solium* consiste de dos hospederos, el humano como hospedero final y único, portador del parásito adulto, el cual produce cientos de huevos diariamente por años, estos son diseminados en el ambiente a través de las heces. El cerdo, que es el hospedero intermediario ingiere los huevos. La ingesta de los huevos es debida a la inadecuada eliminación de las excretas humanas en los lugares de alimentación del puerco, además de que la crianza de estos animales se da en lugares abiertos y sin controles estrictos para esta actividad (Carpio, 2002).

Una vez que estos huevos son ingeridos por el cerdo, pierden su cubierta por acción de las enzimas digestivas como la tripsina y las sales biliares, liberando las oncosferas, que atraviesan la pared intestinal y entran al flujo sanguíneo para ser transportados a los tejidos del cerdo, siendo los blancos principales el músculo estriado y cerebro en donde crece hasta convertirse en un

metacestodo o cisticerco. El humano en esta parte del ciclo puede actuar como un hospedero accidental adquiriendo la cisticercosis.

La cisticercosis es ocasionada por la falta de higiene, como el no lavarse las manos antes de comer y después de ir al baño o por ingerir alimentos contaminados con huevos, principales razones para la infección externa. La autoinfección interna implica la infección con huevos a través de una peristalsis reversa. Además, la cercanía con portadores del parásito aumenta el riesgo de infección (Carpio, 2002; García H et al. 2003; De la Fuente et al. 1999; Sciutto et al. 2000; Working group in eastern and southern África, 2003; González A et al., 2003; OMS 2002).

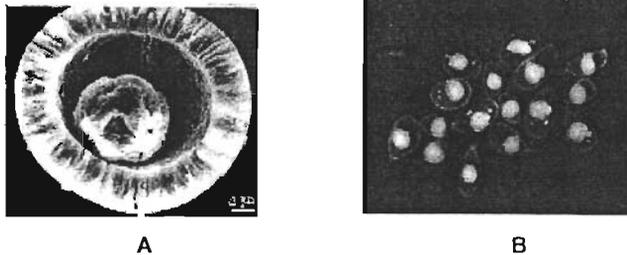


Fig 4. A. Micrografía electrónica de barrido que muestra un huevo con su oncosfera. B. Imagen de cisticercos obtenidos del músculo esquelético de cerdo. (Sciutto et al. 2000),

Cuando el humano ingiere carne de puerco contaminada con cisticercos, estos evaginan en el intestino delgado, el escólex se adhiere a la pared intestinal y se desarrolla el gusano adulto comenzando la producción de proglótidos y huevos.

1.3 Epidemiología

La teniosis es una enfermedad exclusiva del hombre, por lo que es el único responsable de la dispersión de los huevos del parásito: la defecación al aire libre o la inadecuada eliminación de las excretas es la principal práctica de riesgo, también la crianza de cerdos que tolera o promueve el contacto de estos con el excremento humano favorece la cisticercosis del cerdo. La falta de control sanitario de carne de cerdo, su manejo y los hábitos alimenticios inadecuados son prácticas que contribuyen a la infección del ser humano. La falta de higiene personal, así como la exposición de dichos alimentos a agentes que dispersan los huevos, son prácticas que permiten la ingestión de los

huevo por el hombre y causan la cisticercosis (De la Fuente et al.1999; Sciutto et al. 2000; OMS 2002).

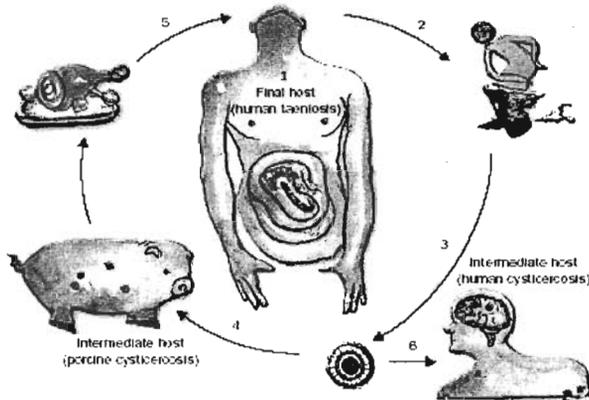


Fig. 5. Ciclo de vida de *T. solium*. (1) El parásito adulto habita en el intestino humano, el huésped definitivo; (2) Los huevos de *T. solium* son excretados a través de las heces; (3) y diseminados al ambiente a través de las heces; (4) Los cerdos son infectados por la ingestión de huevos del parásito; (5) el humano adquiere la teniasis por la ingestión de carne de cerdo; (6) los humanos adquieren la cisticercosis por la ingestión de huevos de *T. solium* por contacto con portadores o comida contaminada. (Carpio, 2002),

La infección por *T. solium* es ampliamente distribuida en países en vías de desarrollo, áreas tropicales, centro y Sudamérica, Asia y África. En América solo Canadá, Estados Unidos y probablemente Argentina y Uruguay parecían estar libres de la infección, sin embargo en estos últimos países se ha observado un aumento significativo de la infección debida a los movimientos migratorios desde países donde la enfermedad es endémica hacia aquellos donde la enfermedad parecía estar ausente (Carpio, 2002; Flisser A et al., 2003; Ito A et al., 2003; Zoli A et al., 2003)

Los estudios y estadísticas realizados en México y en algunos otros países acerca del porcentaje de la población humana y porcina afectada parecen ser no tan coherentes con la realidad que el mundo vive, ya que no existe el seguimiento bien documentado de la incidencia y prevalencia del parásito. solo se puede hablar de estimados provenientes de fuentes diversas como son investigaciones científicas y datos derivados de estudios de hospitales y necropsias (Carpio, 2002).

1.3.1 Taeniosis

Según las investigaciones científicas la frecuencia de teniosis en México varía del 0.2 al 3.4% en la población. Las estadísticas oficiales notificaron de 1986 a 1990 en promedio 13 000 casos anuales y a partir de 1991 el promedio ha sido de 8000 casos anuales. La frecuencia más alta está registrada en el grupo de 5 a 14 años (35.3 %), seguido del 1 a 4 años de edad sin diferencias significativas en por sexo; en cambio, los estudios epidemiológicos reportan que el parásito adulto se presenta en todas las edades con un pico entre los 16 y 45 años (edad económica productiva), y que son las mujeres las que más frecuentemente tienen este parásito. Es importante mencionar que las diferencias encontradas se deben a que en las estadísticas oficiales sólo se consigna la demanda de servicios de salud, y en los estudios epidemiológicos se obtienen datos representativos de cada sexo y de todos los grupos de edad (De la Fuente et al. 1999).

En estudios más recientes la infección en México se sitúa entre 0.2 a 2.4% y en otros países de América latina como Perú hasta del 8.6% y Guatemala 2.8% (Flisser A, 2003).

Para el continente asiático la prevalencia reportada va desde el 0.1% en China hasta el 50% en regiones como Nepal (Rajshekhar V, 2003). Los estudios en África son escasos o no hay actualización de los datos que se tienen, sin embargo, existen países donde los estimados indican un 2% en las regiones kenianas (Mafojane N.A, 2003)

1.3.2 Cisticercosis humana

Actualmente las estadísticas oficiales reportan un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por cada 100 000 habitantes, pero debe pensarse que hay sub-registros de los casos, así que es muy probable que la cifra sea mucho mayor (De la Fuente et al. 1999). En algunas regiones del país el porcentaje de individuos infectados es del 11% (Flisser A, 2003). En el caso de la Neurocisticercosis (padecimiento más grave producido por el metacestodo) se reportó en México una incidencia del 2.8-3.6% en las autopsias realizadas en hospitales y es la causa de muerte entre el 0.6-1.5% en los pacientes hospitalizados (Carpio, 2002); en el mundo causa 50000 muertes por año según datos de la Organización Mundial de la salud (Ito A, 2003).

La incidencia esta por arriba del 2% en las admisiones hospitalarias neurológicas y neuroquirúrgicas en el estado de California en los Estados Unidos y se reportan más de 1000 casos por año en aquel país (Carpio, 2002). En países como China se reporta hasta una prevalencia del 11% (Ito A, 2003), en regiones del Perú hasta del 21%, Guatemala 17% y en Bolivia del 22% (Flisser A, 2003).

1.3.3 Cisticercosis porcina

En México los reportes indican del 1-35% de cerdos infectados que son criados en granjas familiares (Flisser A , 2003); las pérdidas reportadas por cisticercosis porcina se estiman por arriba de los 43 millones de dólares al año (Zoli A, 2003)

En países latinoamericanos como Perú se reporta hasta un 61%, en Camerún la prevalencia es de 9.75% con pérdidas económicas por arriba de los dos millones de euros, en Nigeria se reporta una prevalencia del 15.3% con pérdidas por arriba de los 17 millones de euros por mencionar solo algunos países (Zoli A, 2003).

1.4 Cuadro clínico

La teniosis generalmente es asintomática pues solo llega a producir un daño mínimo en la mucosa intestinal (De la Fuente, et al. 1999), dolor abdominal, distensión, diarrea y náuseas son manifestaciones atribuidas a la infección con el parásito, pero no hay datos a partir de experimentos controlados que demuestren dicha asociación entre síntomas e infección por el parásito (García H, 2003).

En el caso de la cisticercosis los síntomas dependerán del número, ubicación y estado evolutivo del parásito; por ello la expresión clínica es polimórfica, que va desde asintomática hasta constituir una enfermedad incapacitante y en ocasiones mortal, que afecta principalmente a los grupos poblacionales en edad productiva (De la Fuente et al. 1999).

Es por lo anterior que el padecimiento más grave provocado por el parásito es la cisticercosis del Sistema Nervioso Central, conocida como Neurocisticercosis, que es ocasionada cuando los cisticercos se localizan en esta región del cuerpo humano. La Neurocisticercosis genera una morbilidad considerable y, en las áreas donde *T. solium* es endémica, se sabe que es una de las principales causas de epilepsia, que tiene graves consecuencias sociales, físicas y psicológicas (OMS 2002).

La cisticercosis del sistema nervioso central es una causa importante de epilepsia crónica, que supone una pesada carga para los servicios de salud. Cuando la cisticercosis se asocia a epilepsia, la carga de morbilidad aumenta enormemente, debido a la estigmatización social y a la discriminación que rodean a esa enfermedad (OMS 2002).

1.5 Diagnóstico

Los portadores humanos de *T. solium* pueden diagnosticarse de manera sistemática mediante la detección de proglótidos o huevos en las heces, o mediante métodos más sensibles, como la detección de los antígenos de la *Taenia* en las heces o de anticuerpos específicos en el suero (OMS 2002; Carpio, 2002). Sin embargo, en el diagnóstico de los individuos portadores del parásito adulto se encuentran dos problemas principales: la baja sensibilidad de las herramientas microscópicas y la similitud morfológica entre los huevos de *T. solium* y *T. saginata*. En ocasiones cuando el escólex es encontrado, la presencia de una doble corona de ganchos (presente en *T. solium* y no en *T. saginata*) nos permite establecer una diferenciación entre especies; de la misma manera el análisis de proglótidos maduros nos permite establecer la especie de la que se trata dependiendo del número de ramas uterinas que estos presenten. La mejor forma de realizar el diagnóstico para la teniasis intestinal es la detección de coproantígenos por ensayo inmunoenzimático (ELISA), el cual puede detectar moléculas tenia-específica en muestras fecales, permitiendo reconocer la infección con una especificidad mayor al 99% y una sensibilidad del 95% (García H, 2003). De la misma manera puede realizarse la detección de coproantígenos por el ensayo de inmunoelectrotransferencia demostrando que el diagnóstico por serología es mucho más sensible que el diagnóstico por microscopía (Carpio, 2000). Cabe mencionar que a pesar de que el diagnóstico por serología parece ser el más adecuado no es del todo confiable, ya que diversos datos revelan diferencias entre la detección de coproantígenos, teniendo de esta manera variaciones significativas tanto en la sensibilidad como en la especificidad de los métodos antes mencionados, además de que aún no se ha desarrollado un procedimiento capaz de diferenciar entre especies. Por lo anterior, es apropiado señalar que la diferenciación entre especies es muy importante ya que las consecuencias pueden ser muy diferentes. Por ejemplo la infección por *T. saginata* puede ser inocua y quedar solo en el establecimiento del parásito adulto en el intestino humano.

En contraste la fase larvaria de *T. solium*, causada por la ingestión de huevos, puede resultar en Neurocisticercosis y sus consecuencias como la muerte (Jeri C, 2004). Lo anterior se ha podido mejorar gracias al empleo de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite establecer la diferencia entre especies (Jeri C, 2004).

El diagnóstico de cisticercosis del sistema nervioso central se basa en manifestaciones clínicas inespecíficas, como las convulsiones, a menudo acompañadas de signos característicos en las tomografías computarizadas o las imágenes del cerebro obtenidas mediante resonancia magnética, y en los resultados de pruebas serológicas. Se han propuesto criterios diagnósticos basados en datos clínicos, imageneológicos, inmunológicos y epidemiológicos objetivos para los distintos niveles del sistema de atención de salud, pero generalmente no se utilizan en las zonas donde la enfermedad es endémica. (OMS 2002). Es importante señalar que los estudios serológicos tienen una baja sensibilidad y especificidad; y la confirmación más confiable es a través de una biopsia (Carpio 2002).

Los estudios de neuroimagen son las principales herramientas empleadas en el diagnóstico de la Neurocisticercosis. La tomografía computarizada tiene una especificidad y sensibilidad alrededor del 95% para el diagnóstico de este padecimiento (García H, 2003), esta es usada para el estudio de lesiones parenquimales supratentoriales ya que permite la visualización de formas activas e inactivas de la Neurocisticercosis y nos da información sobre la orientación y localización. La resonancia magnética de imagen nos permite una mejor visualización de las lesiones en la base cerebral, en los ventrículos, en la espina, en la fosa posterior, además de que nos da una evaluación precisa de la reacción inflamatoria alrededor del parásito. La resolución a alto contraste permite el reconocimiento de cisticercos no visualizados con la tomografía computarizada. Su mayor limitación es que falla al detectar pequeños granulomas y calcificaciones, encontradas más comúnmente en la tomografía computarizada. Sin embargo, estas herramientas permiten generalmente un diagnóstico preciso, sin embargo su gran desventaja es que son caras (Carpio, 2002; Sciuotto, 2000; García H, 2003).

La detección de anticuerpos anticisticercos en suero, saliva y líquido cefalorraquídeo por medio de la reacción de fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET), son técnicas que deben complementarse con los estudios de neuroimagen, para de esta manera disminuir el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos.

De estas la más sensible es IET que emplea una fracción de glicoproteínas unidas a una matriz de nitrocelulosa (Tsang V, 1989). Se ha sugerido que esta prueba es 100% específica y 98% sensible para el diagnóstico, sin embargo en los pacientes con un solo cisticerco cerebral o calcificados la sensibilidad fue de 25% o no es detectable por la técnica. Además los pacientes con teniosis presentan resultados positivos en sangre, sin que eso signifique que tengan cisticercosis.

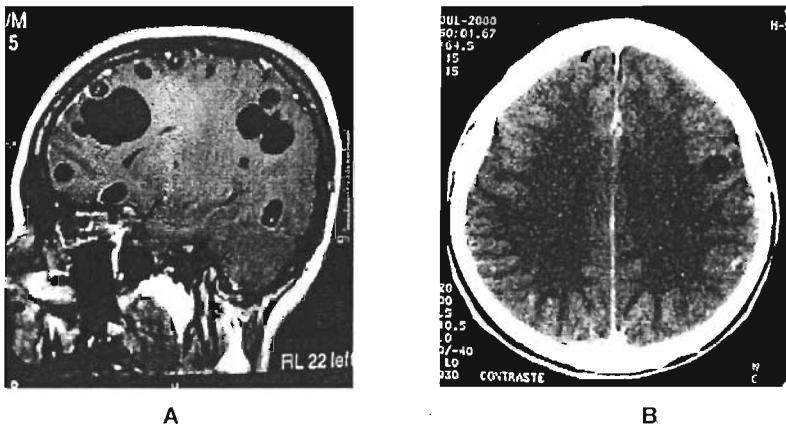


Fig 7. A. Cisticercos masivos en una Resonancia magnética de imagen. B. Cisticercosis vesicular en una tomografía computarizada. (García H, 2003).

1.6 Tratamiento

En el caso de la teniasis el medicamento de elección es la niclosamida, que actúa inhibiendo la fosforilación oxidativa de las mitocondrias del cestodo lo que hace que el parásito muera en contacto con el medicamento, se desprenda el escólex y sea eliminado junto con la cadena estrobilar, además de que este no es absorbido en el lumen intestinal. No tiene acción sobre los huevos ni sobre los cisticercos. Se ha sugerido que el medicamento puede exponer al paciente al riesgo de cisticercosis al destruir los proglótidos y liberar los huevos dentro de la luz intestinal, por lo que es obligada la administración de un laxante, una o dos horas después del tratamiento y disponer adecuadamente de las excretas. Este fármaco no existe en el mercado mexicano (García H, 2003). El praziquantel (dosis única 10 mg /Kg) es otro medicamento de elección que actúa dañando los canales dependientes de calcio, así como la permeabilidad del tegumento (De la Fuente et al. 1999).

En el caso de la cisticercosis el tratamiento dependerá de los siguientes aspectos: localización y etapa biológica de los parásitos, variabilidad del cuadro clínico y cuadros patológicos secundarios.

El tratamiento puede ser sintomático que está enfocado al control de las crisis convulsivas, cefalea, hipertensión endocraneana, alteraciones de la conducta etc.; quirúrgico dependiendo de la localización y características de los cisticercos, además del número; y farmacológico para el cual se han empleado el praziquantel y el albendazol.

Para el tratamiento de la Neurocisticercosis el tratamiento es sintomático, además se emplea manitol o glicerol para disminuir la presión intracraneal, los corticoesteroides son usados para reducir la inflamación y el edema alrededor del cisticercos en aquellos casos de cisticercosis subaracnoidea, aracnoiditis y encefalitis cisticercótica.

Existe controversia sobre el empleo de fármacos antihelmínticos como son el praziquantel y el albendazol ya que pueden resultar peligrosos para algunos pacientes con cisticercosis subaracnoidea, debido a que estos fármacos pueden llevar al desarrollo de aracnoiditis y arteritis dando como consecuencia hidrocefalia. (Carpio, 2002; García H, 2003; Ito A, 2003; Sciutto, 2000).

Por la información expuesta anteriormente es importante señalar que el tratamiento de la cisticercosis, en especial de la Neurocisticercosis dependerá del cuadro clínico de cada paciente, ya que no se puede generalizar; esto debido a que el cuadro clínico es diferente por las características que presenta el padecimiento y que nos lleva a dar un tratamiento individualizado para contrarrestar la enfermedad.

1.7 Control de la Teniosis/cisticercosis y vacunación

En 1993, el grupo especial internacional sobre erradicación de enfermedades, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud catalogó *Taenia solium* como parásito potencialmente erradicable, por las siguientes razones: *i*) su ciclo vital necesita del hombre como hospedero definitivo; *ii*) los portadores humanos de tenias son la única fuente de infestación de los cerdos hospederos intermedio natural; *iii*) se puede controlar la transmisión del parásito de los cerdos a las personas; *iv*) no hay reservorios en especies silvestres y *v*) existen fármacos que curan la teniosis.

En consecuencia, se prevé que el uso estratégico de antihelmínticos contra el parásito adulto de las personas y las larvas de los cerdos, junto con la educación sanitaria y la regulación del sacrificio de cerdos infectados bastará para interrumpir la transmisión, pero este enfoque no se ha ensayado en la práctica.

Algunas otras propuestas para la erradicación de la cisticercosis incluyen el diseño de vacunas y de esta manera disminuir el número de personas y cerdos infectados, para lo cual deberá de considerarse su viabilidad y costo (González A, 2003). La vacunación está enfocada a los cerdos que los hace blancos potenciales de la vacunación por las razones siguientes: el parásito no tiene otros hospederos intermediarios naturales, es viable de llevarse a cabo en la práctica y que la protección que se requiere para la mayoría de los cerdos puede darse en un periodo corto de tiempo (Lightowlers M, 1999). Los antígenos de oncosfera hasta ahora han resultado tener el mejor efecto protector (Verástegui M, 2002). Es claro que los avances en este campo son muchos y que los resultados que se producen dan muestras de que la vacunación puede ser un arma efectiva para el control de la enfermedad, pero hasta la fecha no hay experimentos sustentables sobre este respecto.

También se ha propuesto un esquema quimioterapéutico para el control de la enfermedad, sin embargo, los costos económicos para llevarse a cabo serían muy altos, además de que es posible el control de la enfermedad por un periodo corto de tiempo, no se puede controlar el flujo de personas de una población, por lo que el problema migratorio llevaría a la reinfección, sin embargo esfuerzos se están llevando a cabo para desarrollar fármacos antihelmínticos más potentes y baratos.

En el siguiente cuadro se muestran algunas de las estrategias que se han sugerido con sus ventajas y desventajas:

Estrategia de intervención	Ventajas	Desventajas
Quimioterapia en los portadores del parásito.	<ul style="list-style-type: none"> • Viable. • Altamente efectiva • Rompe la transmisión. • Remueve los riesgos a la Salud. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de Tratamientos repetidos. • Transmisión susceptible a la migración. • Posibles riesgos médicos en pacientes cisticercóticos.
Vacunación de cerdos.	<ul style="list-style-type: none"> • Protección a largo plazo. • Manejo viable de cerdos. • Posibles complicaciones menores. 	<ul style="list-style-type: none"> • No viable en estos momentos.
Quimioterapia de Cerdos infectados.	<ul style="list-style-type: none"> • Viable. • Altamente efectiva. 	<ul style="list-style-type: none"> • No aplicable en la crianza informal. • Dificultades en el monitoreo. • Susceptible a una inspección deficiente de la carne.
Educación pública.	<ul style="list-style-type: none"> • Da información sobre características del parásito a la población. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ineficiente como estrategia única. • Transmisión susceptible a la migración.
Prácticas sanitarias, Erradicación general, Crianza industrializada de cerdos	<ul style="list-style-type: none"> • Erradicación potencial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere avances económicos nacionales.

Tabla I. Resumen sobre las estrategias de intervención posibles para la erradicación del parásito, sus ventajas y desventajas.

Como se puede observar en el cuadro anterior muchas son las estrategias que pueden ser empleadas pero cada una de ellas debe de ser evaluada de acuerdo a las condiciones que se presenta en cada región específica (Lightowlers M, 1999).

Las recomendaciones para llevar a cabo el control de la infección abarcan los puntos siguientes:

Tratamiento, notificación y vigilancia de los casos; la identificación y el tratamiento de los individuos que son fuentes directas de contagio (personas portadoras de tenias adultas) y de sus contactos cercanos, junto con la educación en materia de higiene y la mejora del saneamiento; el tratamiento universal o selectivo con praziquantel (10 mg /kg de masa corporal) ha reducido de manera significativa la prevalencia de la teniasis humana en áreas con parasitismo endémico por *T. solium*, como México (OMS, 2002).

1.8 Respuesta inmunológica

En la cisticercosis por *T. solium* se presentan componentes de la respuesta inmune celular y humoral, encontrando células T CD4⁺ y de inmunoglobulinas del tipo IgE (Carpio A, 2002). La respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺ se divide en dos poblaciones del tipo Th1 y Th2 generando así diferentes patrones de respuesta. Para la infección causada por *T. solium* y algunos otros helmintos existe predominio de la respuesta Th2, produciendo IL4 (estimulando la producción de IgE), IL5 (estimulando el desarrollo y activación de los eosinófilos) e IL3 (inhibiendo así la activación de macrófagos) (Chavarria A, 2003; Díaz M, 2003). Si bien es claro que la respuesta de tipo Th2 se presenta en infecciones contra helmintos. En las reacciones de tipo inflamatorio, los componentes detectados son de tipo Th1 (Carpio, 2002). Se sabe que la respuesta de tipo Th1 se asocia al efecto protector contra el cisticerco y que la Th2 permite al parásito su desarrollo y reproducción (Abbas A, 2002). La causa de que la respuesta inmune del hospedero no sea suficiente para eliminar al parásito, se ha sugerido que son los mecanismos de evasión que este presenta, como el mantenerse en sitios de privilegio inmunológico, regular el tipo de respuesta inmune del huésped o generar elementos contra las defensas de este, para de esta manera poder establecerse de manera definitiva en él (Carpio, 2002).

1.9 Metabolismo

En *T. solium* los nutrientes pueden ser absorbidos a través del tegumento, mediante transporte activo, difusión facilitada y difusión simple. La glucosa es la molécula más importante que funciona como el mayor combustible en los procesos energéticos en el parásito. Dentro de los principales procesos metabólicos que el parásito emplea para la producción de energía están el ciclo de Krebs, la cadena de transporte de electrones y la glucólisis sobre la cual nos enfocaremos en el espacio siguiente (Schmidt, 2000).

1.9.1 Glucólisis

En la glucólisis una molécula de glucosa, de seis carbonos, se transforma en dos moléculas de piruvato de tres átomos de carbono cada una (Alberts et al., 1996).

Esta vía puede dividirse en dos pasos generales: en el primero de ellos la molécula de glucosa es fosforilada a expensas de dos moléculas de ATP. La fructosa 6-bifosfato generada se divide en 2 triosas que se procesan para producir piruvato con una ganancia neta de 2 moléculas de ATP (Avers, 1991). El resultado total es que un grupo aldehído de un azúcar es oxidado a ácido carboxílico, que un grupo fosfato inorgánico se transfiere a un enlace de alta energía del ATP y que una molécula de NAD^+ se reduce a NADH, molécula que desempeña un papel central en el metabolismo energético. Además se generan otros productos que son vitales para la activación de otras vías metabólicas como son la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs. (Alberts et al., 1996).

1.9.2 Triosa fosfatoisomerasa

La triosa fosfato isomerasa (TPI) juega un papel muy importante en la vía glucolítica, su función es la interconversión de las triosas producidas por la escisión de la fructosa 1,6-bifosfato, la gliceraldehído 3-fosfato (GA3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). (Rodríguez A et al., 2002), (Jiménez L et al., 2000). La TPI interconvierte la DHAP a GA3P en la glicólisis, catalizando la transferencia del hidrógeno pro-R del C1 de DHAP al C2 de GA3P. Ambos compuestos existen en solución como una mezcla de especies hidratadas y libres, pero la TPI solo emplea las formas libres como sustrato.

La TPI es una enzima homodimérica con subunidades polipeptídicas que pesan alrededor de los 27 KDa, con una estructura conservada (Jiménez L et al., 2000). La TPI no emplea cofactores o iones metálicos, presenta 2 sitios activos, uno en cada subunidad que parecen ser cinéticamente independientes, sin embargo, ensayos han demostrado que la actividad catalítica requiere de la asociación de ambos monómeros. (Landa et al., 1997). Algunos autores han propuesto a la TPI como un blanco potencial para la erradicación de la infección producida por *T. solium* por razones muy variadas, entre ellas están que hay diferencias en algunos aminoácidos y algunas regiones de la molécula han sido empleadas para el diseño específico de inhibidores para inactivar la enzima como son el caso de estudios realizados en Leishmania y Tripanosomas (Bakker B, 2000; Opperdoes F, 2001; Espinoza-Fonseca M, 2004)

Por otro lado se ha visto que deficiencias en TPI provoca disfunción neuromuscular, cardiomiopatías y anemia hemolítica siendo una de las más grave de la enzimopatías (Jiménez L et al., 2000; Ationu A, 1999).

2.0 Avances y perspectivas de la Biología molecular

En la actualidad los alcances de la biología molecular han ido creciendo en muchos de los campos de la vida científica gracias al gran número de aplicaciones que esta tiene y la infección producida por *T. solium* no es la excepción, por ejemplo el empleo de la técnica de PCR con la cual ha sido posible establecer un diagnóstico diferencial entre especies con lo cual se facilita el tratamiento y se determinan los alcances de la infección. Artículos reportan el empleo de la biología molecular en el diseño de un estuche para el diagnóstico de la cisticercosis basado en el empleo de péptidos sintéticos (Hernández M et al., 1999), la producción de enzimas recombinantes que permiten hacer estudios de evaluación y protección (Jiménez et al., 2000; Castellanos et al., 2002), estudio de genes que codifican para proteínas oncosferales que revelan las semejanzas genéticas entre estas (Gauci et al., 2002) por mencionar algunas de estas aplicaciones. También se han realizado trabajos de evolución en los cuales se han comparado genes aislados de *T. solium* obtenidos de América Latina, Asia y África dando como resultado que los aislamientos de América y África pueden englobarse en un grupo, estimando que estos dos genotipos emergieron hace 400 000- 800 000 años atrás. Esto conjuntado con otros datos históricos en África sobre la domesticación, y distribución de cerdos más los patrones de colonización, sugieren que *T. solium* fue introducida recientemente en estos continentes a partir de diversas regiones Europeas durante la etapa colonial hace 500 años, de esta manera se puede rastrear el origen del agente infeccioso. Y estos diferentes genotipos podrían explicar las diferencias en la patología que produce el parásito en las diferentes regiones del mundo (Ito A et al., 2003). Estudios hechos en México y Madagascar revelan datos similares. (Vega R et al., 2003).

Con la emergente preocupación sobre la dispersión del parásito es importante enfocar esfuerzos para identificar nuevos blancos moleculares para quimioterapias efectivas, vacunas o mecanismos antiparasitarios con vectores en el hospedero que llegarán a ser esenciales para el control de helmintos y su transmisión a humanos y animales. Los métodos de descubrimiento de genes y su caracterización estructural y funcional se han acelerado significativamente y con esto también sus aplicaciones.

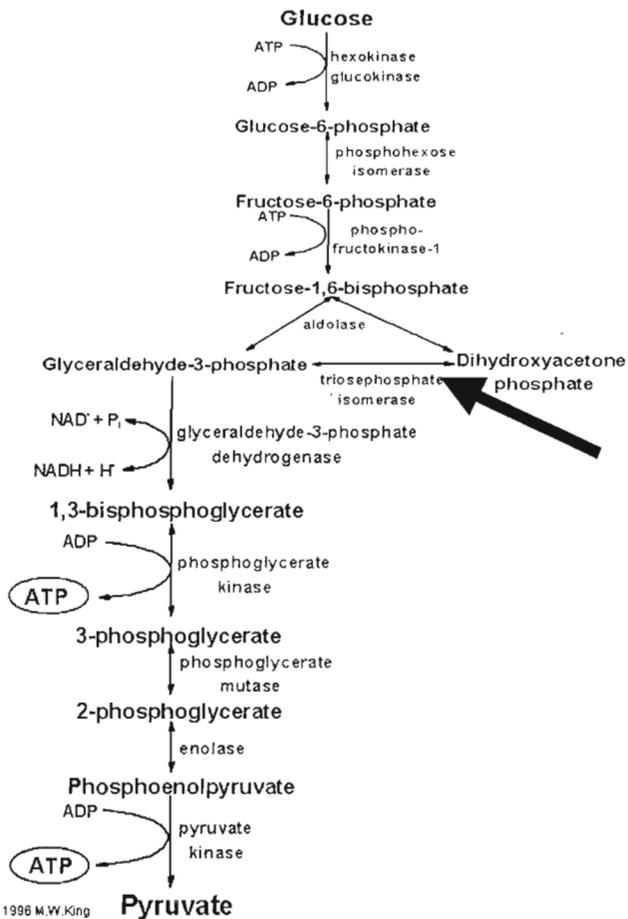


Fig 9. Vía metabólica de la glucólisis. La flecha indica la posición de la enzima Triosa Fosfato Isomerasa (TPI).

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La taeniosis/cisticercosis humana causada por *Taenia solium* es una enfermedad asociada a la pobreza en áreas donde se come carne de cerdo y donde estos animales se crían de manera tradicional. Además representa un problema de salud pública y provoca fuertes pérdidas económicas en los países endémicos y se comienzan a presentar focos en países no endémicos debido a los movimientos migratorios. Por ello encontrar estrategias adecuadas para la erradicación de la enfermedad resulta prioritario a nivel mundial.

Como se explicó anteriormente una de las estrategias está basada en el estudio de las regiones estructurales (internas / externas) y regulatorias de los genes identificados como blancos potenciales para cortar el ciclo biológico del parásito y con ello su dispersión o incluso a partir de estos estudios llevar a cabo el desarrollo de vacunas.

La TPI enzima vital en la vía glucolítica y por lo tanto en el parásito, representa un blanco prometedor para el estudio molecular de este gen que nos permitirá elaborar nuevas estrategias para la erradicación del parásito.

3. HIPÓTESIS

La triosa fosfatoisomerasa es una enzima ubicua en todos los organismos eucariontes y su gen, usualmente de copia única presenta regiones interrumpidas por intrones en su secuencia. Por lo anterior, suponemos que el gen que codifica para la triosa fosfatoisomerasa en *Taenia solium* presentará también estas características.

4. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Caracterizar molecularmente la organización genómica del gen de la triosa fosfoisomerasa de *Taenia solium*.

1.1 Objetivos particulares

- Purificar el ADN genómico del parásito.
- Amplificar el gen que codifica para la triosa fosfoisomerasa mediante PCR.
- Secuenciar y analizar la secuencia nucleotídica del gen de la TPI de *T. solium*.
- Analizar la secuencia obtenida.
- Determinar el número de copias del gen *TPI* existentes en el genoma de *Taenia solium*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron obtenidas de la compañía Invitrogen life technologies. Para las reacciones de PCR se utilizó el estuche producido por Biotecnologías Universitarias. La ARNasa, la ADNasa I fueron obtenidas comercialmente de la compañía New England Biolabs. La membrana de nylon optimizada para la transferencia de ácidos nucleicos empleada para la realización del southern blot fue de la marca Hybond-N de la casa comercial Amersham pharmacia biotech. Las placas de rayos X empleadas para las autorradiografías del southern blot fueron de la marca Kodak. El isótopo α - ^{32}P -dCTP con una actividad específica de 250 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ (110 TBq/mmol) fue comprado a la casa comercial Amersham Bioscience. El resto de los reactivos fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

5.1.2 Material biológico

Los metacestodos de *Taenia solium* fueron obtenidos por disección del músculo esquelético de cerdos infectados obtenidos de rastros. La cepa de *Escherichia coli* empleada fue TOP 10 [F⁺ mcrA Δ (mrr-hdsRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 dROS recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG] y el vector empleado TOPO-TA fueron de de la casa Invitrogen.

5.1.3 Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen de la *TPI* fueron los siguientes: **TTPI-X1** (5' AGA-TCT-ATG-ACG-CGT-AAG-CTG- TTT) Y **TTPI-X2** (5' AAG-CTT-ATC-TTC-TTG-CGT-TTA-TAA-T), conteniendo sitios para las enzimas Bgl II y Hind III en su región 5', respectivamente. Los oligonucleótidos fueron preparados en un sintetizador de ADN Biosearch modelo 8750 de la casa Pharmacia.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de ADN genómico

El ADN genómico (gADN) de cisticerco es extraído por el método recomendado por Sambrook y cols. (1989). Cinco gramos de cisticerco de *T. solium* fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados con un Politron (Brinkmann Instruments), se resuspendieron con 10 volúmenes de amortiguador de lisis, 20 μg / ml de ARNasa A y la suspensión se incubó una hora a 37°C. Posteriormente se le adicionó Proteinasa K a una concentración de 100 μg / mL incubándose por tres horas a 55 °C y una hora más a 65 °C. Se agregó NaCl a una concentración final de 2 M y se incubó 2 minutos con agitación suave. Esta solución se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El ADN de la fase acuosa fue limpiado mediante extracción con fenol / cloroformo y precipitado con un volumen igual de isopropanol. El ADN fue resuspendido en TE y cuantificado a $\text{DO}_{260\text{nm}}$.

5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para cada reacción de PCR se utilizaron las siguientes cantidades: 5 μL de amortiguador de reacción 10 X, 5 μL de dNTP's (A, C, G, T) 2 mM, 2.5 μL MgCl_2 20 X, 0.8 μL de cada oligonucleótido (TTPI-X1 Y TTPI-X2, 50 pm / μL), 0.5 μL de enzima Taq Polimerasa (5 U / μL), 100 ng de gADN y H_2O c.b.p un volumen final de 50 μL . Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystem) empleando las siguientes condiciones: un primer ciclo de: 95 °C durante 3 minutos, 50 °C por un minuto y 2 minutos a 72 °C, seguido de 30 ciclos de 95 °C un minuto, 1 minuto a 50 °C y 2 minutos a 72 °C, por último 1 ciclo de un minuto a 50 °C, 5 minutos a 72 °C.

5.2.3 Obtención del vector TOPO-TA

Bacterias conteniendo el vector TOPO-TA-TTPI fueron crecidas y este purificado siguiendo la técnica de lisis alcalina (5.2.9 Preparación grande de ADN plasmídico).

5.2.4 Reacciones de digestión con endonucleasas

Para llevar a cabo la digestión de los diferentes ADNs se emplearon diferentes endonucleasas de restricción. En la mezcla de reacción se emplearon 10-20 μg del DNA genómico a digerir, 20 μL del amortiguador 10X recomendado por la casa comercial, agua c.b.p 200 μL y 2 μL de la enzima (10 U / μL). Las reacciones se dejaron incubar a 37 °C hasta digestión total. Los productos de la reacción son concentrados por precipitación (para poder realizar el cambio de buffer y continuar con la siguiente digestión) con 1 / 10 del volumen de reacción de acetato de sodio 3 M, pH 5.3, 2.5 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C y son congelados a -70 °C por 2 h. El precipitado es obtenido por centrifugación a 14 000 rpm durante 10 minutos y secado a 37 °C por 10 minutos y resuspendido. El procedimiento se repite con la segunda endonucleasa. Una vez terminado este procedimiento el ADN es purificado por la técnica de "perlas de vidrio". El fragmento amplificado por la PCR fue digerido con las endonucleasas 1° Bgl II y 2° Hind III y el vector con las endonucleasas Hind III y Bam H1 para desplazar el inserto contenido en el vector.

5.2.5 Electroforesis y Purificación (perlas de vidrio) del fragmento de ADN y el vector TOPO-TA

Los fragmentos de ADN se sometieron a electroforesis utilizando para ello un gel agarosa al 1% con bromuro de etidio, se corrieron en una cámara de electroforesis de la casa comercial Life-Technologies a 100V o 25 mA durante 1 h. Las bandas de interés se cortaron, fueron disueltas en una solución de NaI 6 M a 37 °C por 15 minutos. Una vez que la agarosa se disolvió, se agregó a la muestra 2 μL de perlas de vidrio, se incubó a 4 °C por 2 h, agitándose cada 20 minutos. Cuando el tiempo concluyó se centrifugaron inmediatamente a 14 000 rpm durante 30 segundos y el sobrenadante fue desechado. Las perlas se lavaron una vez con 500 μL de NaI, se centrifugaron de la misma manera y se les adicionó solución de lavado comercial, se agitaron y fueron centrifugadas a 14 000 rpm por 30 segundos y el sobrenadante es desechado. Este lavado se realizó por triplicado. Por último las perlas se secaron a 37 °C y se resuspendieron en 25 μL de amortiguador TE dejando incubar la mezcla a 37 °C por 30 min (Vogelstein y Gillespie, 1979).

5.2.6 Reacción de ligado

Aproximadamente 10 ng del ADN del vector de clonación TOPO-TA y 100 ng del fragmento de ADN amplificado por la PCR, digerido con las enzimas de restricción adecuadas (1° Bgl II y 2° Hind III) y purificado fueron ligados por medio de la enzima T4 ADN ligasa. La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del estuche comercial Ready-To-Go T4 DNA Ligase comparado a la casa comercial Amersham pharmaacia biotech.

5.2.7 Transformación

Los insertos ligados al vector de clonación TOPO-TA (5 μ L) fueron incubados a 4 °C durante 1h con 50 μ L de células *E. coli* TOP-10 competentes y enseguida se sometieron a un choque térmico a 45 °C por 30 segundos. Una vez terminado este tiempo se inició una fase de recuperación de las células, para lo cual se les adicionó 200 μ L de medio SOC y se incubaron a 37 °C por 30 min en agitación constante. Pasado el tiempo de recuperación las células se siembran en medio LB sólido + ampicilina (50 μ g/mL).

5.2.8 Preparación pequeña de ADN plasmídico y selección de clonas

Se seleccionaron 8 colonias transformadas que fueron crecidas por 8 h en 3 mL de medio LB con ampicilina. Para obtener el ADN plasmídico se recurrió a la lisis alcalina de las células. Se centrifugaron 1.5 mL del cultivo de LB-ampicilina a 10 000 rpm durante 1 minuto. Al precipitado se le adicionaron 200 μ L de la solución 1 (VER ANEXO), se resuspendieron vigorosamente y se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 min. Pasado este tiempo se le agregó 400 μ L de la solución 2 (VER ANEXO) recién preparada, se mezcló suavemente dos veces, invirtiendo los tubos y se mantuvieron en hielo por 5 min; al término de este período se adicionaron 300 μ L de la solución 3 (VER ANEXO), se agitó en vortex y se mantuvo en hielo por 5 min más. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionó 600 μ L de isopropanol enfriado a -20 °C previamente y se mantuvo en hielo por 5 min.

Se centrifugó a 10 000 rpm 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se eliminó el líquido remanente y la pastilla se lavó con 100 µL de etanol al 70% enfriado a -20 °C, se centrifugó rápidamente y el sobrenadante fue desechado.

El precipitado se secó a 37 °C durante 10 min. y se resuspendió en 50 µL de amortiguador TE, se incubó 5 min y se agitó. El ADN se cuantifica a $DO_{600\text{ nm}}$ y se corre en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

La selección de los plásmidos que presentan el inserto ligado se realizó por medio de la PCR empleando los oligonucleótidos TPI-X1 y TPI-X2. Para aquellos que resulten positivos se realizará una preparación grande de ADN plasmídico.

5.2.9 Preparación grande de ADN plasmídico

Las bacterias transformadas que portan el gen de la triosa fosfatoisomerasa se propagaron en 100 ml de medio LB líquido + ampicilina durante toda la noche. Al igual que en el procedimiento anterior para obtener el ADN plasmídico se recurrió a la lisis alcalina de las células. Se centrifugaron los 100 mL del cultivo a 3400 rpm durante 15 minutos. Al precipitado se le adicionaron 5 mL de la solución 1 (VER ANEXO), se resuspendieron vigorosamente y se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 min. Pasado este tiempo se le agregó 10 mL de la solución 2 (VER ANEXO) recién preparada, se mezcló gentilmente dos veces, invirtiendo los tubos y se mantuvieron en hielo por 10 min; al término de este período se adicionaron 7.5 mL de la solución 3 (VER ANEXO), se agitó en vortex y se mantuvo en hielo por 10 min más. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionó 15 mL de isopropanol enfriado a -20 °C previamente y se mantuvo en hielo por 10 min. Se centrifugó a 3000 rpm 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se eliminó el líquido remanente y la pastilla se resuspendió en 200 µL de amortiguador TE y se transfirió a un tubo de microfuga para adicionarle 10 µL de ARNasa (10 mg / mL) e incubarlo a 37 °C 30 min. Se le adicionó 200 µL de fenol saturado con TE, se agitó vigorosamente por 5 min se mantuvo a temperatura ambiente por 2 min más. En seguida se centrifugó a 3 min a 10000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo para adicionarle igual volumen de cloroformo, agitar y centrifugar nuevamente a 10 000 rpm por 1 min. La fase acuosa es removida y se aplicó a una columna (1 X 6 cm) de afinidad (sefarosa CL4B) equilibrada con TE.

Se colectó 1 mL en el primer tubo y 5 fracciones más de 500 μ L cada una. Correr las muestras (5 μ L) en un gel de agaroso al 2% con bromuro de etidio y seleccionar las fracciones positivas, a estas se les adicionó 50 μ L de acetato de sodio 3 M, pH 5.3 y 1-1.5 mL de etanol absoluto enfriado a -20 °C y se congelaron a -70 °C por 2 h. Se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y los precipitados se secaron a 37 °C para resuspender los todos en un volumen total 50 μ L de amortiguador TE (Sambrook J, 1989).

5.3.1 Secuenciación

Para las reacciones de secuencia se empleo como molde el ADN plasmidico (0.5 μ g) purificado previamente. La secuencia se llevó acabo automáticamente y para ello se empleo el estuche Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Sequencing. La reacción se lleva a cabo en un volumen de 12 μ L de agua desionizada conteniendo el molde. A la dilución anterior se le agrega 1 μ L de los cebadores marcados con fluorocromos (2-5 μ M) y se agita suavemente la mezcla denominada "reacción maestra". Para realizar las reacciones de terminación se necesitan 3 μ L de dideoxinucleótidos del estuche repartidos en sus respectivos tubos, sometiéndose a PCR con un programa de 20 ciclos de 95 °C por 30 s., 55 °C 30 s., y 72 °C 1 min. Terminados los ciclos las mezclas se enfrían a 4 °C y entonces se les agrega 6 μ L del amortiguador TE. Todos los elementos anteriores se agitan en vortex y 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 fluorocromos, las muestras antes de ser cargadas en el gel se pasan a través de una microcolumna de sefaroza G-50 para eliminar todos los dideoxinucleótidos y cebadores marcados que no se incorporan durante la extensión, inmediatamente las muestras se secan al vacío y se resuspenden en 6 μ L de amortiguador de cargado con formamida y colorante. La secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador SEQ4X4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

5.3.2 Southern blot

Aproximadamente 10 μ g de gADN de cisticercos por reacción fueron digeridos con las endonucleasas: Bam H1, Bgl II, Eco R1 y Hind III como se ha descrito anteriormente. El ADN digerido fue corrido en un gel de agarosa al 1%. Al término de la corrida el gel fue depurinado con HCl 0.25 M durante 5 minutos.

Después fue lavado en dos ocasiones de 20 min. cada vez con solución desnaturalizante (VER ANEXO) y posteriormente fue neutralizado con 3 lavados de solución neutralizante (VER ANEXO) de 20 min cada uno y finalmente lavado con SSC 10X durante 10 min. El ADN separado en el gel fue transferido (Figura 10) a una membrana de Nylon por difusión durante 24 h en amortiguador SSC 5X. La membrana fue lavada con una solución de SSC 5X durante 5 min a temperatura ambiente y el ADN fijado a la membrana con luz UV (1200 μ J X 100) en un equipo UV Stratalinker 2400 de la casa comercial Stratagene.

Una vez que el ADN es fijado se deja la membrana en solución de hibridación por 2 horas a 55 °C antes de agregar la sonda. La sonda se incubaba a 100 °C durante 5 min. y otros 5 min. a 4 °C, pasado este tiempo se adiciona para llevar a cabo la hibridación a 55 °C durante toda la noche. Al término del tiempo de hibridación se lava la membrana 3 veces con solución de lavado durante 20 min. en cada lavado y se seca para ser expuesta en una placa radiográfica por 24 h; la placa es revelada al término del tiempo de exposición.

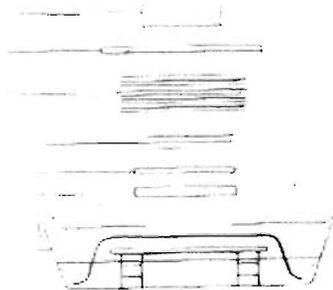


Fig. 10. Esquema para montar el aparato de transferencia. De arriba hacia abajo: Peso, cristal, toallas de papel, papel filtro, Hybond, Gel y contenedor.

5.3.3 Marcaje de la sonda

Se empleó el método de Random Primer Labeling. Alrededor de 25 ng de la sonda se diluyeron con agua hasta 20 μ L y se desnaturalizó a 95 °C 10 min. El fragmento se enfrió en hielo y se le adicionó el amortiguador de marcaje, con 1 mM los dideoxynucleótidos (A, G, T), 50 μ Ci del isótopo α -³²P-dCTP, oligonucleótidos al azar y 1 U del fragmento Klenow y se incubó a 30 °C 30 min.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención y caracterización del fragmento genómico que codifica para la región estructural del gen de la *TPI* de *Taenia solium* (TTPI)

La purificación del gADN de *T. solium* se llevó a cabo conforme al método descrito en materiales y métodos y como se puede observar en la Fig. 11 este se presenta como una banda intensa con un tamaño por arriba de los 23 Kb, no presenta contaminación por ARN, y tampoco se observa ningún barrido el cual nos indicaría que el gADN se está degradando. La pureza del gADN obtenido nos permitió utilizarlo como templado en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar la región estructural del gen de la *TTPI*, utilizando los oligonucleótidos TTPI-X1 y el TTPI-X2 que corresponden a la secuencia de inicio y término de la región codificante de su cADN. Se logró amplificar un solo fragmento con tamaño de alrededor de 1 Kb visto en geles de agarosa con bromuro de etidio (Fig. 11); la misma figura se muestra un control del cADN que codifica para la *TTPI* que fue amplificado bajo las mismas condiciones de la PCR, podemos observar una banda única de aproximadamente 700 pb.



Fig. 11. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio en el que se muestran los productos del PCR del cADN y gADN y en el último carril se muestra el gADN purificado y empleado. Como marcador de peso (M) se empleó la digestión del bacteriófago λ con la endonucleasa Hind III.

El fragmento amplificado a partir del gADN por la reacción en cadena de la polimerasa fue digerido con las endonucleasas Bgl II y Hind III y ligados al vector TOPO-TA. Esta ligación se transformó en bacterias TOP-10. A partir del procedimiento anterior se obtuvieron alrededor de 500 clonas transformadas, de las cuales se seleccionaron 8 para preparar ADN plasmídico. Por medio de la PCR y el empleo de los oligonucleótidos TTPI-X1 y TTPI-X2 se observó que las 8 clonas seleccionadas contenían un inserto de aproximadamente 1 Kb como se puede observar en la Fig. 12. En esta figura podemos observar con mayor detalle que el producto de la PCR correspondiente para las 8 clonas seleccionadas es del mismo tamaño (1 Kb), pero que varía en intensidad, mayor para las clonas 4, 5 y 7 y menor para las restantes, efecto que puede ser explicado por la utilización de una mayor o menor cantidad de templado (ADN plasmídico) en la PCR. Las variaciones en los tamaños entre los fragmentos amplificados a partir del gADN y el cADN de la TTPI, muestran que el gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa es mayor en aproximadamente 300 pb.

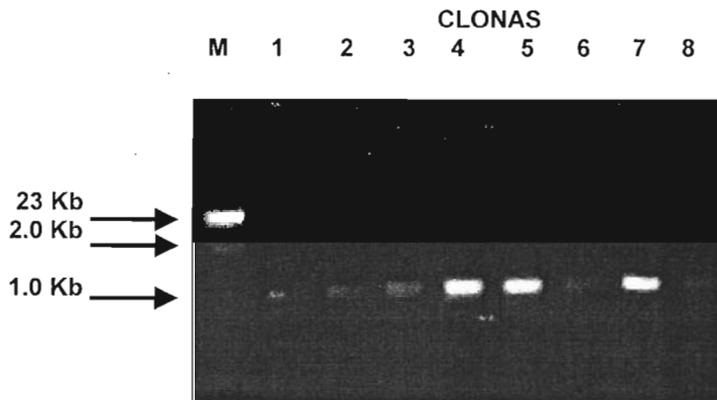


Fig. 12. Gel de garosa al 2% con bromuro de etidio en el que se muestran los productos del PCR de las 8 clonas seleccionadas y probadas de la ligación del fragmento genómico amplificado con los oligonucleótidos TTPI-X1 y X2 ligados al vector TOPO-TA. Como marcador de peso (M) se empleó la digestión del bacteriófago λ con la endonucleasa Hind III.

6.2 Caracterización de la organización genómica del gen para la TPI

Se secuenciaron solo las clonas 3 y 4 que contenían el fragmento gADN amplificado con los oligonucleótidos TTPI -X1 y X2, los análisis de secuencia realizados con el programa PC/GENE mostraron que ambas eran idénticas. La figura 13 muestra la secuencia nucleotídica de la clona 4, la cual presenta un tamaño real de 975 pb, se encontró el codón de inicio de la traducción (ATG) y el de término (TAA), además se encontraron 4 intrones y 5 exones. El exón número 1 tiene un tamaño de 109 pb, el exón 2 de 125 pb, el exón 3 de 85 pb, el exón 4 de 133 pb y el quinto exón de 297 pb, dando un total de 749 pb que codifican para la TPI de *T. solium*.

La tabla II muestra en forma resumida los datos presentados obtenidos de la Figura 13, mostrando que los intrones son muy pequeños y de tamaño variable que van de 36 pb hasta 67 pb, que son ricos en timinas y adeninas. Por otro lado, las secuencias donadora / aceptora para el corte y empalme de la remoción de los intrones fue la secuencia (5' - GT...AG-3').

# Intrón	Posición (# nucleótido)	Tamaño (pb)	Tipo splicing	% A	% T	% G	% C
1	110	36	GT-AG	28%	36%	17%	19%
2	271	77	GT-AG	30%	40%	22%	8%
3	434	46	GT-AG	26%	35%	11%	28%
4	614	67	GT-AG	23%	40%	13%	24%

Tabla II. Datos sobre los intrones encontrados en el gen de TPI en *T. solium*.

	ATG	ACG	CGT	AAG	CTG	TTT	GTC	GGT	GGC	AAC	TGG	AAG	ATG	AAT	GGC	AGT	TAT	AGC	CAC	ATC	
	M	T	R	K	L	F	V	G	G	N	W	K	M	N	G	S	Y	S	H	I	20
61	AAC	ACT	TTT	TTT	GAT	ACC	CTT	CAA	AAG	GCT	GAT	ACA	GAT	CCC	AAT	GCC	GGT	AAT	GTT	TTG	36
	N	T	F	F	D	T	L	Q	K	A	D	T	D	P	N	A					
121	TTC	CTA	TAG	CAA	CTG	AAA	TCC	CTC	AGA	TAT	CGT	AAT	TGG	TGT	TCC	CGC	CTG	CTA	CCT	GAA	48
									D	I	V	I	G	V	P	A	C	Y	L	K	
181	GTA	TGC	TCA	GGA	TAA	GGC	TCC	CAA	AGG	CAT	TAA	AAT	TGC	TGC	AGA	AAA	TTG	TTA	CAA	AGT	68
	Y	A	Q	D	K	A	P	K	G	I	K	I	A	A	E	N	C	Y	K	V	
241	TGG	CTC	TGG	TGC	ATT	CAC	AGG	TGA	AAT	CAG	GTA	AGT	AAT	TGT	GGA	GCT	TTA	ATC	AAG	CAA	77
	G	S	G	A	F	T	G	E	I												
301	TTT	AGT	AGT	TGT	TAG	CGG	CTG	TAA	AAT	GCA	GTT	TTT	TTA	AAC	TTT	TAG	TAC	TGA	AAT	GAT	82
															S	T	E	M	I		
361	AAA	AGA	CTG	TGG	ATG	TGA	ATG	GGT	CAT	ACT	TGG	TCA	CTC	TGA	GCG	TCG	CCA	CAT	TTT	CGG	102
	K	D	C	G	C	E	W	V	I	L	G	H	S	E	R	R	H	I	F	G	
421	CGA	GTC	TAA	CGA	GGT	TTG	CCT	ACC	CCT	TGC	ATT	TTT	AAC	CAA	AAT	AAA	TCG	CTC	ATC	TAG	106
	E	S	N	E																	
481	TTG	ATC	GGG	GAG	AAG	GTA	AAA	CAT	GCT	CTT	GAT	TCC	GGT	CTT	AAT	GTC	ATT	CCT	TGC	ATT	126
	L	I	G	E	K	V	K	H	A	L	D	S	G	L	N	V	I	P	C	I	
541	GGC	GAA	CTG	CTC	TCG	GAA	CGT	GAA	GCT	GGT	AAA	ACC	AAC	GAC	GTT	TGC	TTC	GCT	CAA	ATG	146
	G	E	L	L	S	E	R	E	A	G	K	T	N	D	V	C	F	A	Q	M	
601	GAT	GCC	ATT	GCC	AGT	CAG	TTA	ATT	CTT	CAC	CAT	CTT	CTT	CGT	CTC	TTC	AGC	AGA	CTC	ATA	150
	D	A	I	A																	
661	TAA	TGT	GCA	TTT	TAT	TGC	AGA	AAA	CGT	TCC	TTC	AAA	GGA	AGC	CTG	GGA	CAA	AGT	TGT	CAT	164
							K	N	V	P	S	K	E	A	W	D	K	V	V	I	
721	TGC	TTA	TGA	GCC	CGT	TTG	GGC	CAT	CGG	TAC	CGG	CAA	GAC	CGC	GAC	GCC	GGC	TCA	AGC	TCA	184
	A	Y	E	P	V	W	A	I	G	T	G	K	T	A	T	P	A	Q	A	Q	
781	AGA	GGT	TCA	CAA	GGT	TGT	TCG	CGA	CTG	GAT	CCG	CAA	GCA	TGT	GGA	CGC	CGG	AAT	TGC	CGA	204
	E	V	H	K	V	V	R	D	W	I	R	K	H	V	D	A	G	I	A	D	
841	CAA	AGT	TAG	AAT	TCT	CTA	CGG	TGG	CTC	TGT	GAC	GGC	TTC	CAA	CGC	CAA	GGA	CTT	GGG	TGC	224
	K	V	R	I	L	Y	G	G	S	V	T	A	S	N	A	K	D	L	G	T	
901	TCA	ACC	TGA	CGT	GGA	TGG	ATT	CCT	TGT	TGG	TGG	CGC	CTC	CTT	GAA	ACC	CGA	CTT	CAT	TAC	244
	Q	P	D	V	D	G	F	L	V	G	G	A	S	L	K	P	D	F	I	T	
961	CAT	TAT	AAA	CGC	AAG	AAG	TAA														250
	I	I	N	A	R	R															

FIG 13. Secuencia de bases que conforman la región genómica del gen que codifica para la triosa fosfoisomerasa en *T. solium*. La metionina de inicio y el sitio de término se representan enmarcados; mientras que los intrones se encuentran resaltados en negritas y los sitios de corte y empalme están subrayados. Los números a la izquierda corresponden a las bases y el número a la derecha a los aminoácidos traducidos a partir de la secuencia.

La figura 14 muestra una representación esquemáticamente (Mapa) para visualizar físicamente la región estructural del gen para la TTPI con sus posiciones y tamaño de exones e intrones.

109 pb	36 pb	125 pb	77 pb	85 pb	46 pb	133 pb	67 pb	297 pb	Total 975 pb
--------	-------	--------	-------	-------	-------	--------	-------	--------	-----------------

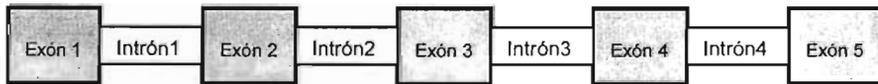


Fig 14. Mapa de la estructura de la región estructural del gen que codifica para la triosa fosfatoisomerasa en *Taenia solium*.

Con la construcción anterior podemos realizar una comparación entre la posición de los intrones de otras TPI en diferentes organismos:

6.3 Southern blot

Los resultados del análisis por southern blot mostraron que el gADN digerido con las endonucleasas Bam HI, Eco RI, Bgl II y Hind III, separado electroforéticamente y transferido a una membrana de Nylon, al ser hidridadas con la sonda del cDNA de la TPI mostró un patrón muy simple de hibridación (Figura 14), en donde solo una banda para cada enzima fue reconocida por la sonda de cADN marcada, presentando los siguientes tamaños de fragmentos de aproximadamente de 4.3 Kb para Bam HI, de 9.4 Kb para Eco RI, 4.5 Kb para Bgl II y de 5 Kb para Hind III.

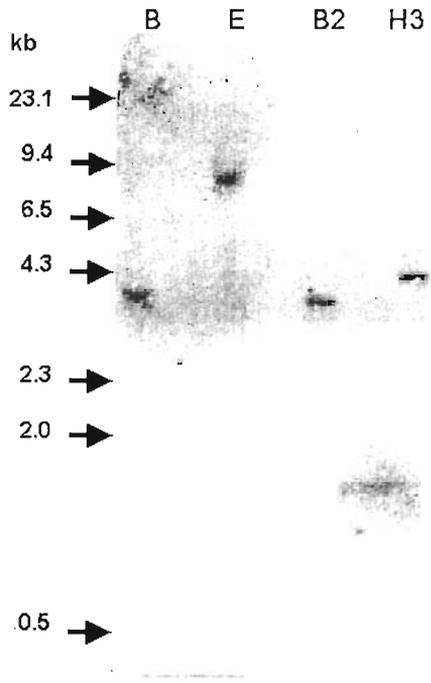


Fig. 15. Southern blot en el que se muestra el patrón de hibridación obtenido al digerir el gADN con diferentes enzimas de restricción. B : Bam H1; E: Eco R1; B2: Bgl II; H3: Hind III

7. DISCUSIÓN

La cisticercosis del sistema nervioso central es la más importante de las enfermedades neurológicas humanas de origen parasitario. Genera una morbilidad considerable y en las áreas donde *T. solium* es endémica, se sabe que es una de las principales causas de daños graves con consecuencias sociales, físicas y psicológicas. Es una causa importante de epilepsia crónica, que supone una pesada carga para los servicios de salud. Cuando la cisticercosis se asocia a epilepsia, la carga de morbilidad aumenta enormemente (OMS 2002).

Por ello resulta importante generar nuevas estrategias o respuestas al problema, los avances científicos se han ido enfocando a la búsqueda de blancos potenciales como las enzimas destacando entre ellas la triosa fosfatoisomerasa la cual juega un papel vital en el metabolismo de la mayoría de los organismos incluyendo a los helmintos (Joachin A et al., 2001; Jiménez L et al., 2000; Reis M et al., 1993). La acumulación de DHAP llega a ser letal para el parásito y no hay otra enzima que pueda llevar a cabo esta función. Los intrones de TPI son altamente variables ayudando de esta manera a la diferenciación entre especies, sin mencionar que los hace blancos inmediatos de ataque (Joachin A et al., 2001), es de una abundancia relativa, su deficiencia en humanos representa serios problemas cardiopáticos que derivan en la muerte por la acumulación de DHAP (Jiménez L et al., 2000), (Ationu A 1999). Por otro lado ensayos de vacunación en modelos murinos la han propuesta como un candidato para generar una vacuna para Schistosomiasis y cisticercosis (Jiménez et al., 2000; Reis M et al., 1993). Es por estas razones que la TPI es considerada como un blanco potencial para poder erradicar la enfermedad.

Las técnicas de biología molecular permiten el estudio de genes de un gran número de organismos y el evaluar su función fuera y dentro del mismo. La identificación de genes individuales o poblaciones de ellos, expresados bajo condiciones definidas comienza a ser un objetivo común. Dentro del estudio genético de los helmintos hay una serie de problemas que han sido bien identificados, primero, son organismos con una gran diversidad celular, segundo, son organismos de talla grande y finalmente sus ciclos de vida son complejos, en algunos casos envuelve a dos o más diferentes hospederos para completar su ciclo; lo que ha dificultado el estudio de los parásitos, ya que no es posible contar con modelos que permitan obtener el ciclo completo en un laboratorio.

Por lo anterior, la importancia de llevar a cabo estudios de determinación de regiones estructurales y regulatorias a nivel genético en parásitos helmínticos de genes particulares o grupos de genes involucrados en la viabilidad, protección, crecimiento y reproducción para los parásitos en combinación con otras investigaciones biológicas ayudará de manera mas amplia el desarrollo de nuevas estrategias para destruir a los helmintos parásitos en especial a *Taenia solium* (Boyle J, et al., 2003).

Por lo anterior nosotros comenzamos realizando la purificación del gADN (Fig. 11). Cabe señalar que este DNA no presenta signos de degradación. El método utilizado nos permitió disponer de un gADN con un alto grado de pureza presentando una concentración de 150 µg / mL. Este gADN nos permitió amplificar por medio de la PCR y 2 oligonucleótidos que flanquean la región codificante de un cDNA de TTPI conocido (Jiménez et al., 2000). El fragmento amplificado fue secuenciado y tiene un tamaño de 975 pb, mostrando ser mayor que el de la región codificante del cDNA de la TTPI (700 pb), sugiriendo que el gen de la *TPI* podría estar interrumpido por intrones y que representaban entre todos un total aproximado de 300 pb. Los análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado a partir del gADN mostraron evidencia de 5 exones y 4 intrones. Los intrones guardan semejanzas muy cercanas con otras TPI de diferentes organismos. Por ejemplo con el gen que codifica para la TPI en el pollo, en *Schistosoma sp* y en el maíz, las posiciones de los intrones presentes en *T. solium* son casi iguales. Sin embargo el tamaño de los intrones resulta variable entre cada especie siendo los de mayor tamaño los presentes en *Schistosoma sp* los cuales llegan a medir hasta 4 Kb (Joachim A et al., 2001; Reis M et al., 1993; Elder D; 2000). Estas semejanzas nos permiten inferir que el gen de la TPI ha estado presente desde inicios muy temprano de la evolución de la vida y que ha sufrido pocas modificaciones entre los diversos organismos, que las secuencias de interrupción se han extendido o acortado pero sin modificar la función de la enzima en cada uno de los diversos organismos. Todos los intrones presentes en el gen de la TPI en *T. solium* presentan mayor porcentaje de timina, seguido por adenina, mientras que los porcentajes de guanina y citosina en los cuatro es parecido (Tabla II).

En este gen la región donador / aceptor para el corte y empalme de la remoción de los intrones en los transcritos fue la secuencia (5´- GT.....AG-3´) que también es la misma secuencia en *Schistosoma mansoni* y en la mayoría de los genes eucarióticos.

Por otro lado, el análisis de tipo Southern blot mostró que el gen es de copia única en el genoma de *T. solium*.

Lo cual también se puede encontrar en otros organismos eucarióticos donde la presencia de esta enzima se vuelve esencial al no haber otra enzima que lleve a cabo la función de la TPI (Jiménez et al., 2000).

Actualmente muchos de los enfoques científicos se encaminan hacia el genoma del parásito para poder realizar estrategias y atacar al agente etiológico, una de estas es el estudio de las regiones reguladoras o estructurales de los genes. La base elemental de la mayoría de los genes eucarióticos es que son interrumpidos por intrones, que son secuencias que pueden ser removidas durante el proceso de transcripción para crear ARNm maduros. Se sabe que los intrones pueden incrementar la eficiencia transcripcional de algunos genes o afectar la transcripción si estos actúan como represores o potenciadores. Alternativamente, un intron puede regular la transcripción controlando la accesibilidad al ADN a través de la posición de los nucleosomas. Esto significa que la presencia de intrones en genes eucarióticos puede influenciar la expresión del gen, en la gran mayoría de los casos aún no es bien conocido que acción predomina si la de reprimir o potenciar la expresión del gen, pero podemos predecir que algunos intrones contendrán distintos elementos de secuencias conservadas a través de los cuales se definirá el sitio de splicing (Hir H et al., 2003).

Lo antes mencionado y los datos obtenidos en este estudio podrían ser utilizados en conjunción con otros datos para desarrollar nuevos estudios para conocer nuevas formas de regulación de los genes y posteriormente ser utilizadas para destruir a este parásito.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la región genómica del gen de *TPI* de *T. solium*.
- Esta región genómica mide alrededor de 1.0 Kb.
- Se determinó que el gen de *TPI* tiene en su secuencia interrupciones provocadas por intrones.
- La región donador / aceptor para el corte y empalme de la remoción de los intrones fue la secuencia (5'- GT...AG - 3').
- El gen de *TPI* en *Taenia solium* es de copia única.
- El gen de la *TPI* ha sido conservado evolutivamente en diversos organismos con modificaciones que no interfieren en la función de la enzima.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

9. ANEXO

- MEDIO LB
 - Triptona 1% (p/v).
 - Extracto de levadura 0.05% (p/v).
 - NaCl 1% (p/v).

- SOLUCIÓN SSC 20X 1 L (Solución de citratos salina)
 - NaCl 3.0 M
 - Citrato de sodio $3 \cdot H_2O$. 0.3 M.
 - Ajustara pH 7.0

- AMORTIGUADOR TE pH 8.0.
 - Tris-HCl pH 8.0
 - EDTA pH 8.0

- AMORTIGUADOR TAE.
 - Tris -HCl-acético 0.04 M.
 - EDTA 0.002 M.

- GEL DE AGAROSA AL 2%.
 - Agarosa 1 g.
 - Amortiguador TAE 50 mL.
 - Bromuro de etidio 4 μ L

- SOLUCIÓN DE LAVADO.
 - NaCl 0.2 M.
 - Tris-HCl 20 mM pH 7.2.
 - EDTA 2mM.
 - Etanol 50 %.

- SOLUCIÓN DEESNATURALIZANTE.
 - NaOH 0.5 M.
 - NaCl 1.5 M.

- SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE.
 - NaCl 1.5 M.
 - Tris-HCl 1M.
 - pH 8.0.

- SOLUCIÓN 1 PREPARACIÓN ADN PLASMÍDICO.
 - Glucosa 50 mM
 - Tris 25 mM pH 8.0
 - EDTA 10 mM.

- SOLUCIÓN 2 PREPARACIÓN ADN PLASMÍDICO.
 - 0.2 M NaOH.
 - 1% SDS.

- SOLUCIÓN 3 PREPARACIÓN ADN PLASMÍDICO.
 - 7.5 M NH₄Ac.

- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS.
 - 0.5% Sarcosil.
 - Tris 50 mM pH 8.0
 - EDTA 0.1 mM.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Albert T, Banner DW, Bloomer AC, Petsko AG, Phillips D, Rivers PS, Wilson IA. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of Triosephosphate isomerase. *Phil Trans R Soc Lond* 1981; B293:169.
2. Ationu A, Humphries A, Wild B, Carr T, Will A, Arya R, Layton M. Towards enzyme replacement treatment in triosephosphate isomerase deficiency. *The Lancet* 1999; 363: 1155-1156.
3. Bakker B, Westerhoff H, Opperdoes F, Michels P. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000; 106: 1-10.
4. Boyle J, Yoshino T. Gene manipulation in parasitic helminthes. *International Journal for Parasitology* 2003; 33: 1259-1268.
5. Carpio A., Neurocysticercosis: an update. *The Lancet Infectious Diseases* 2002; 2: 751-762.
6. Castellanos A, Jiménez L, Landa A. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal of Parasitology* 2002; 32: 1175-1182.
7. Cisticercosis working group in Eastern and Southern Africa. Declaration on *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. *Acta tropica* 2003; 87: 1-2.
8. De la Fuente JR, Sepúlveda J. Diez problemas relevantes de salud pública en México. México, D.F. Instituto Nacional de Salud Pública-Academia Mexicana de Ciencias-Fondo de Cultura Económica. 1999; 116-144.
9. Espinoza-Fonseca M, Trujillo-Ferrara J. Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-trypanosomal drug design. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14: 3151-3154.
10. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta tropica* 2003; 87: 43-51.
11. García H, Del Bruto O. Imaging findings in Neurocysticercosis. *Acta tropica* 2003; 87: 71-78.

12. García H, González A, Evans C, Gilman R. *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet* 2003; 361: 547-554.
13. Gauci C, Lightowers M. Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens. *Molecular and biochemical Parasitology* 2003; 127: 193-198.
14. González A, García H, Gilman R, Tsang V. Control of *Taenia solium*. *Acta tropica* 2003; 87: 103-109.
15. Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9° ed. p 1075-1084.
16. Hernández m, Beltrán C, García E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, Parkhouse M, Harrison L, Sotelo J, Sciutto E. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunology Letters* 2000 ; 71: 13-17.
17. Hiir L, Nortt A, Moore M. How intrones influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemical sciences* 2003; 28: 215-220.
18. Ito A, Urbani C, Jiamin Q, Vuitton D, Dongchuan Q, Heath D, Craig P', Zheng F, Schantz M. Control of echinococcosis and cysticercosis: a public health challenge to international cooperation in China. *Acta tropica* 2003; 86: 3-17.
19. Ito A, Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, Okamoto M, Sato M, Nakaya K, Margono S, Ikejima T, Kassuku A, Afonso S, Benitez W, Plancarte A, Zoli A, Geerts S, Craig S. Multiple genotypes of *Taenia solium** ramifications for diagnosis, treatment and control. *Acta tropica* 2003; 87: 95-101.
20. Jeri C, Gilman R, Lescano A, Mayta H, Ramírez M, González A, Nazerali R, García H. Species identification after treatment for human taeniasis. *The Lancet* 2004; 363: 949-950.
21. Jiménez L, Vibanco N, Navarro L, Landa A. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *International Journal of Parasitology* 2000; 30: 1007-1012.
22. Joachim AA, Samson-Hhimmelstjerna G. Sequence variations in the intrones of the triosephosphate isomerase genes of *Oesophagostomum dentatum* and *O. quadrispinulatum*. *Parasitology research* 2001; 87: 764-767.
23. Lamonte R, García L. *Helmintiasis del hombre en México: Tratamiento y profilaxis*. 1°, AGT Editores, México, D.F., 1988.

24. Landa A, Rojo-Domínguez A, Jiménez L, Fernández-Velasco A. Sequencing, expresión and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem 1997; 247:348.
25. Lightowers M. eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. International Journal of parasitology 1999; 29: 811-817.
26. Mafojane N, Appleton AC, Krecek R, Michael M, Willingham A. The current status of Neurocysticercosis in Eastern and Southern of Africa. Acta tropica 2003; 87: 25-33.
27. Opperdoes F, Michels P. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. International Journal of Parasitology 2001; 31: 482-490.
28. Organización Mundial de la Salud. Control de la Neurocysticercosis. 2002
29. Rajshekhar V, Joshi D, Doanh N, Xiaonong Z. *Taenia solium* taeniosis/cisticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. Acta tropica 2003; 87: 53-60.
30. Reis M, Davis R, Singh H, Skelly P, Shoemaker B. Characterization of the *Schistosoma mansoni* gene encoding the glycolytic enzyme, triosephosphate isomerase. Molecular and Biochemical Parasitology 1993;
31. Rodríguez A, Hernández-Santoyo A, Del Pozo L, Kornhauser A, Fernández A. Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. Journal Molecular Biology 2002; 322: 669-675.
32. Sarti E. La taeniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Salud Pública de México 1997; 39(3): 225-231.
33. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste J, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Microbes and infection 2000; 2: 1875-1890.
34. Schmidt GD, Roberts LS. Cestoidea Form, function and classification of the tapeworms: Foundations of parasitology. Idem. 6°, McGraw Hill, USA, 2000.
35. Shoemaker C, Gross A, Gebremichael A, Harn D. cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. Proc. Natl. Acad. 1992; 1842-1846.
36. The Merck index Versión 12.1 1996

37. Tsang V, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 1989; 84: 74-81.
38. Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Sciutto E, Larralde C, Fragoso G. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *International Journal for Parasitology* 2003; 33:1479-1485.
39. Verástegui M, Gilman R, Gonzales A, Garcia H, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Arana Y, Tsang V, The Cysticercosis Working Group In Peru. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 2002; 108: 49-62.
40. Zolí A, Shey-Njila O, Assaba E, Nguekam J, Dorny P, Brandt J, Geerts S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. *Acta tropica* 2003; 87: 35-42.