



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES ENTRE
CISTICERCOS PROCEDENTES DE MÚSCULO
ESQUELÉTICO Y DE DIFERENTES REGIONES
DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DEL CERDO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

ANTONIO ERNESTO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS : DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

MÉXICO D.F.

OCTUBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

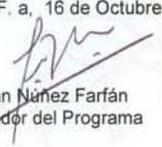
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2007, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **GONZALEZ GONZALEZ ANTONIO ERNESTO** con número de cuenta **86226006** con la tesis titulada: "**Expresión diferencial de genes entre cisticercos procedentes de músculo esquelético y de diferentes regiones del sistema nervioso central del cerdo**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. GLADIS CARMEN FRAGOSO GONZALEZ:**

Presidente: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Vocal: DR. RAFAEL BOJALIL PARRA
Secretario: DRA. GLADIS CARMEN FRAGOSO GONZALEZ
Suplente: DRA. IRIS CITLALI ELVIRA ESTRADA GARCIA
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

Sin dudar de su atención, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 16 de Octubre de 2007.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo prestado al proyecto número 46953-M 2004.

A CONACYT por su apoyo económico durante el tiempo que realice este trabajo.

A PAPIIT por su apoyo al proyecto número IN226707.

A los integrantes del Comité de Jurado : Dra. Edda Sciutto Conde, Dr. Rafael Bojalil Parra, Dra. Gladis del Carmen Fragosó González, Dra. Iris Estrada García y al Dr. Abraham Landa Piedra, gracias por sus valiosos comentarios y su tiempo.

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Gladis Fragoso por su acertada dirección, su paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo.

A la Dra. Edda Sciutto del Conde por permitirme trabajar en su laboratorio sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Iris Estrada García de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por la capacitación en la técnica de expresión diferencial, sus enseñanzas y su tiempo.

A Rosalio Ramos Payan por la capacitación en el DD-PCR.

A Raúl Bobes y Mallely Avila por la ayuda prestada en la técnica de RAPDs.

A mis compañeros del laboratorio por su amistad y ayuda en este trabajo en especial a: Angélica, Mario, Héctor Palafox, Laura Adalid, Rubén, Mallely.

Dedicatorias

A mi madre, no tengo palabras para decirte todo lo que significas para mí, me va a ser difícil devolverte lo que me has dado, gracias por tu amor, apoyo, compañía, amistad, confianza, por los momentos que hemos compartido juntos, que dios te bendiga.

A Bernardo por que a mitad de este trabajo dejaste de existir, dejando un lecho vacío y un hueco en nuestras vidas, al fin y al cabo, todos somos polvo de estrella, por que de seguro que el lugar donde te encuentras es mejor que este.

A Gustavo, no sé en que momento de este viaje solté tu mano y te extravié, cuando te encontré eras el mismo, pero habías cambiado, tu historia es el reflejo de lo que soy, para mí sigues siendo fuente de inspiración.

A Rockdrigo, por que sí.

A Belinda te amo por como eres.

A mis amigos.

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 3 |
| 1.- INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1.- Descripción del parásito | 5 |
| 1.2.- Sistema reproductor | 6 |
| 1.3.-Sistema nervioso | 8 |
| 1.4.- Sistema excretor y muscular | 8 |
| 1.5.- Ciclo de vida | 9 |
| 1.6.- Neurocisticercosis | 10 |
| 1.7.-Epidemiología | 12 |
| 1.8.- Respuesta inmune en la cisticercosis | 14 |
| 1.9.- Estudios de genómica y variabilidad genética en <i>Taenia solium</i> | 15 |
| 2.- ANTECEDENTES | 20 |
| 3.- JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 25 |
| 5.- MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 5.1.- Colección del parásito | 26 |
| 5.2.1.- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) | 26 |
| 5.2.2.- Extracción de DNA y cuantificación | 27 |
| 5.2.3.- Lisis celular | 27 |
| 5.2.4.- Tratamiento con RNasa | 27 |
| 5.2.5.-Precipitación de Proteínas | 27 |
| 5.2.6.- Precipitación de DNA | 28 |
| 5.2.7.- Hidratación del DNA | 28 |
| 5.2.8.-Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) | 28 |
| 5.2.9.- Elaboración de los geles para RAPDs | 30 |
| 5.2.10.-Análisis de los geles | 30 |
| 5.3. Expresión Diferencial de Genes (DDRT-PCR) | 31 |
| 5.3.1.-Extracción de RNA Total y confirmación de la integridad del RNA | 31 |
| 5.3.2.-Cuantificación del RNA total | 32 |
| 5.3.3.-Transcripción reversa – PCR (RT-PCR) | 32 |
| 5.3.4.-Electroforesis | 36 |
| 5.3.5.- Secado del gel y exposición de la placa fotográfica | 37 |
| 5.3.6.- Análisis de los geles | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 6.- RESULTADOS | 39 |
| 6.1.-Variación genética de cisticercos procedentes del mismo cerdo | 39 |
| 6.2.-Expresión diferencial de genes | 40 |
| 6.2.1. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 1 (P1) | 40 |
| 6.2.2. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 2 (P2) | 42 |
| 6.2.3. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 3 (P3) | 44 |
| 6.2.4. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 4 (P4) | 45 |
| 7.- DISCUSIÓN | 49 |
| 8.- CONCLUSIÓN | 55 |
| 9.- APENDICES | 56 |
| 10.- BIBLIOGRAFÍA | 70 |

RESUMEN

La neurocisticercosis humana (NC) puede causar síntomas neurológicos que van de leves o moderados a graves pero también puede pasar completamente asintomática. Esta heterogeneidad depende de factores que pueden estar relacionados con el hospedero y/o el parásito. *Taenia solium* es un parásito de humanos y cerdos y su larva (el cisticerco) se aloja en el cerebro causando lo que es conocido como neurocisticercosis, además de que puede alojarse en otros tejidos como músculo esquelético y espacio subcutáneo, causando lo que se conoce como cisticercosis extraneuronal. En humanos la NC es clínicamente heterogénea. La posibilidad de que las diferencias genéticas entre los parásitos pueda contribuir a la heterogeneidad de la enfermedad puede ser una opción pero se han encontrado muchas similitudes entre parásitos colectados de la misma región geográfica por RAPDs. De esta manera, este estudio fue diseñado para identificar diferencias en los perfiles de expresión de genes entre parásitos que provienen del mismo individuo pero con distintas localizaciones que podrían influir en la heterogeneidad de la NC. El perfil de expresión de genes entre cisticercos de músculo esquelético (M.E.), espacio subaracnoideo (E.S.) o parénquima cerebral del mismo cerdo fue analizado sabiendo que poseen un DNA idéntico ya que las muestras fueron analizadas por RAPDs. El RNA fue procesado por RT y PCR con 4 oligonucleótidos aleatorios. Los resultados muestran que existe expresión diferencial de genes entre cisticercos localizados en diferentes regiones anatómicas. Las diferencias de expresión más significativas fueron las encontradas entre cisticercos localizados en músculo esquelético y sistema nervioso central (SNC). Dieciséis fragmentos de genes fueron obtenidos para las localizaciones en SNC (16 para espacio subaracnoideo y 15 para parénquima) mientras que solamente 5 fueron obtenidas para músculo esquelético. Esto demuestra que existe una expresión diferencial entre los cisticercos que se alojan en SNC y músculo esquelético independientemente de la variabilidad genética de los parásitos, esto podría deberse a las condiciones relacionadas con el microambiente específico de cada tejido que podría influir en la heterogeneidad de la neurocisticercosis.

ABSTRACT

Human neurocysticercosis (NC) can cause mild to severe neurological symptoms or be completely asymptomatic. This heterogeneity may depend on host and/or parasite factors. *Taenia solium* is a parasite of humans and pigs. Its larvae (the cysticercus) lodge in the brain, causing NC, and in other tissues, like skeletal muscle and subcutaneous space, causing extraneuronal cysticercosis. In humans, NC may be clinically heterogeneous, ranging from asymptomatic to severely incapacitating and even fatal presentation. The possibility that genetic differences between the parasites could contribute to the NC heterogeneity seems hardly difficult since high genetic similarities were determined between parasites collected from same geographic region by RAPDs. Thus, this study was designed to identify differences on the expression profiles between parasites from the same individual that could account to the NC heterogeneity. The gene expression profile of cysticerci from skeletal muscle (SM), subarachnoid space (SA) or parenchyma (PA) of the same infected pig with an identical DNA, according to RAPDs, was analyzed by differential display PCR. mRNA was screened with one anchoring and four amplification probes. Differential gene expression was found between cysticerci located in the different compartments. Higher differences between the expression profiles were found between cysticerci located in muscles and in the CNS. Sixteen cDNA fragments were differentially displayed for cysticerci located in the SA, 13 in the PA and only 3 in SM. Results obtained in this study support evidences that parasite factors could be involved in the different clinical manifestation of human cysticercosis.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-Descripción del parásito

Taenia solium pertenece al phylum *Platyhelminthes*, a la clase *Cestoda*, familia *Taenidae* y al orden *Cyclophyllidea*. El gusano adulto de este parásito es exclusivo del hombre. El parásito está compuesto de un escólex el cual está formado por cuatro ventosas y un rostelo que posee una doble corona de ganchos: la interna formada por 11 a 14 ganchos largos (de 0.13 a 0.16 mm) y la externa con igual número de ganchos pequeños (de 0.10 a 0.12 mm). Las ventosas del escólex se fijan a la pared intestinal y los ganchos se clavan en la mucosa. El escólex tiene el tamaño de la cabeza de un alfiler (Fig. 1). El cuerpo del gusano se encuentra formado por un gran número de segmentos llamados proglótidos (Fig. 2) que se desarrollan a partir del cuello que continúa del escólex. Al conjunto de proglótidos se le conoce con el nombre de estróbilo, el cual llega a medir entre 2 a 7 m de largo y contiene proglótidos grávidos solamente 3 ó 4 meses después de la infección por el cisticerco. Los proglótidos más cercanos al cuello no son grávidos ya que no tienen desarrollados los órganos sexuales mientras que los más alejados serán grávidos y esencialmente son sacos llenos de huevos. El escólex del cisticerco y del gusano adulto es completamente igual, a su vez la vesícula del cisticerco contiene una estructura nerviosa y excretora similar a la del adulto (Flisser *et al.*, 1997).



Fig. 1 Escólex de *Taenia solium*

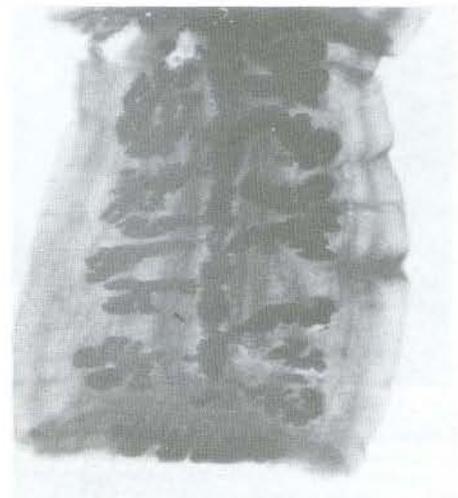


Fig. 2 Proglotidos

En el fluido vesicular del cisticerco se ha encontrado la presencia de porfirinas, predominantemente coproporfirina y porfirina pentacarboxilada, así mismo se ha demostrado la presencia de colágena, colinesterasas y otras proteasas, colesterol, glucógeno, glucoproteínas, calcio y hierro (Flisser *et al.*, 1997)..

1.2.- Sistema reproductor

Las tenias ó gusanos adultos son hermafroditas, y cada proglótido contiene órganos sexuales masculinos y femeninos. El aparato reproductor masculino consiste en numerosos testículos dispersos pero conectados por medio de túbulos finos a un espermoducto desarrollado, cuyo final se encuentra modificado para formar un órgano muscular copulatório llamado cirro. El espermoducto llega al poro genital, en el cual también desemboca la vagina, que es el conducto femenino que recibe los espermatozoides y los conduce al receptáculo seminal que se conecta con el oviducto. El ovario se encuentra formado por dos lóbulos grandes y uno pequeño. La fertilización se lleva a cabo dentro del oviducto y puede ocurrir en el mismo proglótido, entre segmentos distintos o también en proglótidos de distintos gusanos cuando hay más de una tenia en el hospedero. Una vez fertilizados los huevos se rodean de células vitelinas cuando estos pasan a través de la apertura del conducto vitelino y entran en el ootipo. El ootipo es una región bulbosa del oviducto que está rodeada por las glándulas de Melhis y la glándula vitelógena, las que proporcionan secreciones mucosas y serosas que probablemente servirán de sustrato al embrióforo. Por último los huevos se acumulan en el útero, que tiene una región central a lo largo del proglótido de la que salen ramas laterales, cuyo número define a la especie. Es en el útero donde los huevos maduran y se vuelven infectantes. Cada proglótido grávido mide de 0.5 a 2 cm contiene aproximadamente 60 000 huevos, los segmentos grávidos se liberan del estróbilo y se eliminan con el excremento, liberando de 2 a 5 segmentos 2 a 3 veces por semana (Flisser *et al.*, 1997).

Los huevos de las tenias son esféricos y tienen apariencia radial, (Fig.3) el embrióforo rodea a la oncósfera y está formado por bloques unidos de manera contigua. La capa más externa del huevo es el vitelo. La siguiente capa es la membrana embriofórica que

tiene apariencia de cráteres y rodea al embrioforo, cuya superficie es poligonal e irregular, es sintetizada por la célula embriofórica interna. El embrioforo de los huevos maduros es una estructura rígida y sirve como protección del embrión cuando el huevo se encuentra en el ambiente exterior. Esta capa se encuentra formada por una proteína similar a la queratina, que es resistente a los jugos digestivos naturales y artificiales. Una vez en el tubo digestivo el huevo maduro mediante la acción de las enzimas proteolíticas y las sales biliares reciben la señal para la activación del embrión hexacanto (Larralde *et al.*, 2006), esto ayuda a que los bloques se separen con facilidad cuando entran al aparato digestivo. La capa más interna del huevo es la membrana oncosferal, la cual es impermeable a las condiciones ambientales externas pero adquiere permeabilidad cuando es puesta en contacto con la pancreatina y permite que el embrión expuesto se active. Un cambio fisiológico que ocurre en el embrión hexacanto cuando se activa es el inicio del movimiento de los ganchos lo que le permite salir de la membrana oncosferal y sostenerse al epitelio intestinal del huésped. Las oncósferas son llamadas también embriones hexacantos por que tienen seis pares de ganchos (Flisser *et al.*, 1997).



Fig. 3 Huevos de *Taenia solium*

Se sabe que la inseminación en *Taenia solium* ocurre por autoimpregnación dentro del mismo proglótido, como también por impregnación por otro proglótido, incluso de diferente estróbilo, por estas razones es muy probable que los individuos que se aparean posean genotipos muy similares (Larralde *et al.*, 2006). La autofecundación, es el caso más extremo de endogamia. La endogamia lleva a las poblaciones a una disminución de la heterogocidad y a que las poblaciones sean un conjunto de clonas separadas (Hartl y Clark,

1989 en Vega, 2002). Otra característica de las especies por autofecundación es que la alta homocigosidad de los genes provoca que no aparezcan nuevos tipos gaméticos por recombinación en cada nueva generación, retardando o alejando a la especie del equilibrio de ligamiento (el cual es la asociación azarosa entre los alelos en diferentes *loci*) (Hartl y Clark, 1989 en Vega, 2002).

1.3.- Sistema nervioso

El sistema nervioso consiste de una red profusa de fibrillas en el ganglio cefálico del escólex y un agrupamiento denso de células nerviosas multipolares en un estroma fibrilar que rodea esta área. También contiene grupos profusos de fibras nerviosas muy delicadas, distribuidas entre los fascículos musculares y células de tipo nervioso que se localizan muy cerca del área del rostelo en el escólex. El parásito posee terminaciones nerviosas abundantes en el escólex y alrededor de los poros genitales (Flisser *et al.*, 1997).

1.4.- Sistema excretor y muscular

El sistema excretor consta de un par de conductos longitudinales que reciben fluidos de túbulos ramificados, dichos túbulos terminan en células en flama, únicas o múltiples.

El sistema muscular de las tenias se conforma de miocitones que se conectan con miofibrillas por medio de puentes citoplasmáticos y constituyen un sincio. Entre la membrana basal del tegumento y las células tegumentarias y de almacén, se encuentran haces de fibras musculares que también se conectan con las fibras de colágena.

Una característica sobresaliente de los cestodos es la ausencia de la boca y aparato digestivo (Flisser *et al.*, 1997).

1.5.- Ciclo de vida

El ciclo de vida *Taenia solium* es complejo e incluye dos hospederos: uno intermediario que es el cerdo, el cual aloja a la forma larvaria del parásito y otro definitivo que es el humano el cual alberga al parásito adulto. El ciclo de vida (Fig.4) comienza cuando el ser humano ingiere carne de cerdo contaminada con cisticercos y mal cocida, entonces el cisticerco se desarrollará en una tenia adulta en el intestino delgado del ser humano y este desechará a través de las heces aproximadamente 300 000 huevecillos diariamente (Flisser *et al.*, 1997). Los cerdos se infectan cuando ingieren heces humanas contaminadas con huevos los cuales se transformarán en cisticercos en los tejidos del cerdo. A su vez el ser humano también puede infectarse al consumir alimentos o agua contaminada con huevos adquiriendo de esta manera la cisticercosis.

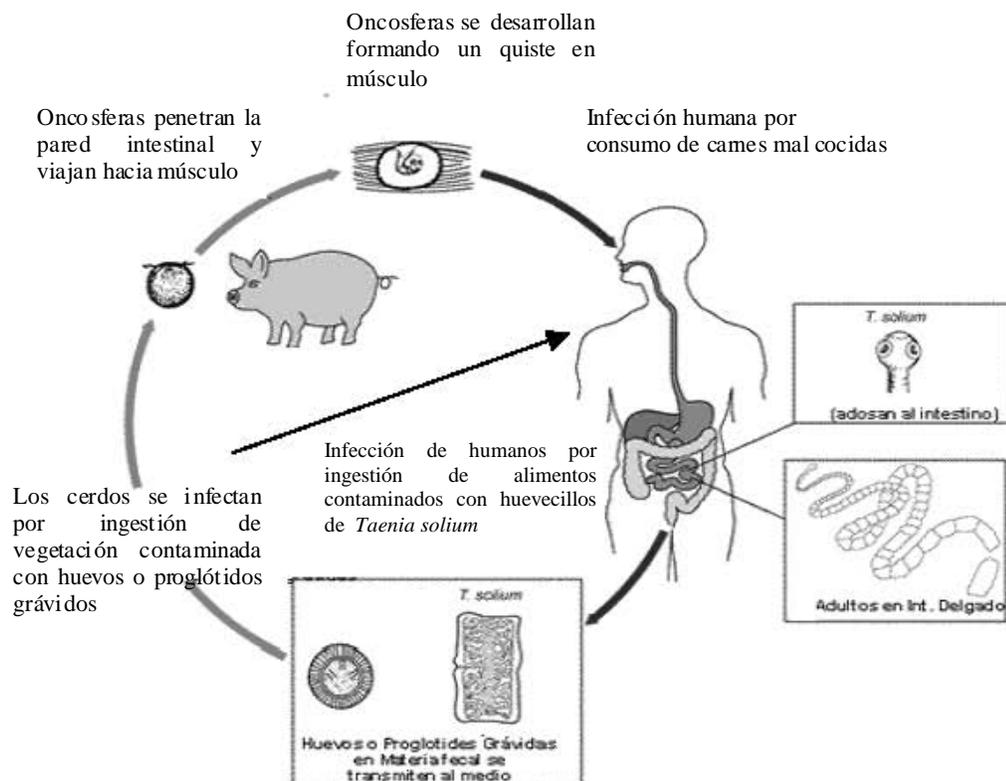


Fig. 4 Ciclo de vida de *Taenia solium*

1.6.- Neurocisticercosis

Cuando el parásito se aloja en el sistema nervioso central (SNC) se presenta la neurocisticercosis (NCC) la cual es considerada como la parasitosis más frecuente del SNC. La neurocisticercosis tiene una incidencia de 8-12% en zonas consideradas como endémicas (Carpio, 2002) y también es de las que más lesiones crónicas generan (Flisser *et al.*, 1997). Aproximadamente del 30-40% de los casos de neurocisticercosis son subclínicos es decir asintomáticos (Sciutto *et al.*, 2000), sin embargo hay un porcentaje importante en el que los individuos desarrollan cuadros neurológicos que van desde leves hasta severos con implicaciones importantes en la salud. La neurocisticercosis es una enfermedad muy heterogénea en la que el conjunto de relaciones hospedero-parásito podría ser una consecuencia de la evolución, sintomatología y respuesta al tratamiento de pacientes de NCC.

La neurocisticercosis puede adoptar distintas formas según la localización, el número y el estado biológico del parásito, el grado y tipo de inflamación del tejido del huésped y las estructuras neurales afectadas (Larralde *et al.*, 2006) por lo tanto la sintomatología será resultado de la combinación de estos diferentes parámetros. La localización del parásito en parénquima cerebral es la de mejor pronóstico por la involución más rápida del parásito y por las características de la reacción inflamatoria que permanece localizada y se resuelve rápidamente en caso de quistes poco numerosos (Larralde *et al.*, 2006). La sintomatología más frecuente es la epilepsia, esta enfermedad es la primera causa de epilepsia de inicio tardío en los países endémicos (Adriantsimahavandy *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1990 en Larralde *et al.*, 2006).

Cuando el parásito llega al líquido cefalorraquídeo (LCR), la ubicación será determinada por las corrientes de circulación del LCR y por el tamaño que lleguen a adquirir, algunos quedan atrapados en el sistema ventricular principalmente en el IV ventrículo y en el acueducto de Silvio ocasionando hipertensión endocraneal por hidrocefalia, mientras que otros podrán llegar a espacio subaracnoideo (Larralde *et al.*, 2006), siendo esta la localización más frecuente en los pacientes adultos atendidos en

instituciones de tercer nivel (Fleury *et al.*, 2004 en Larralde *et al.*, 2006). La sintomatología para espacio subaracnoideo es similar a la de parénquima, pero cuando el parásito alcanza las cisternas de la base, el cuadro es más grave.

La heterogeneidad clínica de la enfermedad depende de las características de la enfermedad como lo son el número, el tamaño y localización del cisticerco, así como la intensidad de la reacción inflamatoria pero no se sabe cuales son las causas de esta diversidad, por un lado se ha especulado que factores propios del hospedero como el género y la edad influyen sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria (Larralde *et al.*, 2006). La encefalitis se ve preferentemente en mujeres jóvenes y niños (Rangel *et al.*, 1987 en Larralde *et al.*, 2006), y las mujeres desarrollan una reacción inflamatoria más severa que los hombres (Del Brutto *et al.*, 1988; Fleury *et al.*, 2004 en Larralde *et al.*, 2006). Se ha evidenciado que la edad que juega un papel importante en la localización del parásito por lo que en niños los parásitos se localizan generalmente en el parénquima, mientras que en los adultos, las localizaciones subaracnoideas y ventriculares son las más frecuentes (Larralde *et al.*, 2006). Se ha manejado que factores genéticos relacionados tanto al parásito como al hospedero pueden estar involucrados en la heterogeneidad de la enfermedad.

En ocasiones en formas supuestamente benignas de la enfermedad, los cisticercos son reducidos a una cicatriz con pocas estructuras del parásito y algunas veces sustituido por necrosis caseosa con depósito de sales de calcio. En estas lesiones calcificadas, el infiltrado inflamatorio es escaso principalmente células mononucleares y linfocitos, distribuido irregularmente entre tenues hebras de tejido fibroso alrededor del quiste (Sciutto *et al.*, 2000)..

En lo referente a la localización, *Taenia solium* presenta un tropismo hacia el sistema nervioso central que parece ser más frecuente en América Latina, mientras que en la India y otros países de Asia y África se presenta más la cisticercosis subcutánea (Sciutto *et al.*, 2000).

Un elevado porcentaje de los pacientes con neurocisticercosis (80-90%) desarrollan una fuerte respuesta de anticuerpos que se puede detectar en líquido cefalorraquídeo o en suero hacia una amplia variedad de antígenos del parásito. Sin embargo, un 10% de pacientes con NCC confirmada no presenta anticuerpos, generalmente este tipo de casos son lesiones únicas o con pocos cisticercos o calcificados y son referidos como forma inactiva de la enfermedad (Sciutto *et al.*, 2000).

1.7.- Epidemiología

Algunos autores como Pawlowski *et al.*, (2005) han concluido a partir de los datos epidemiológicos sobre la enfermedad los siguientes puntos:

- 1) Los portadores de tenias como los casos de cisticercosis humana y porcina se agrupan en focos endémicos y esto es útil para planear medidas de control.
- 2) Las zonas endémicas para la enfermedad presentan un alto índice de epilepsia adquirida como un fuerte indicador de neurocisticercosis.
- 3) La autoinfección juega un papel mucho más importante que el esperado, lo que resulta en altas tasas de neurocisticercosis entre los casos de teniosis actual o pasada, el vivir con un portador de *Taenia solium* es un factor de riesgo para ser infectado con los huevos de este parásito.
- 4) Las pruebas sero-diagnósticas que detectan anticuerpos tienden a detectar exposiciones pasadas y no son útiles para la identificación de portadores de *T. solium* y de agrupación de la infección, su valor para detectar neurocisticercosis es limitada.
- 5) Para detectar portadores de tenias las pruebas coproantígenas son más efectivas que un cuestionario o examinación coproscópica.

Cuando se utilizan técnicas de imagen como diagnóstico, es decir la Tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética las tasas de neurocisticercosis van de 1 a 22% con un promedio en 7% (Schantz *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1999; Flisser *et al.*, 2003). En comunidades rurales se ha observado una prevalencia alrededor del 9% de NC por tomografía axial computarizada (Fleury *et al.*, 2003). En América Latina se calcula que hay 400,000 casos de pacientes con neurocisticercosis sintomática entre los 75 millones de individuos que viven en zonas endémicas (Bern *et al.*, 1999; Pawlowski *et al.*, 2005)

Como ya se mencionó en los antecedentes, en el mundo se estima que hay 2.5 millones de personas portadoras de *T. solium* y no menos de 20 millones se encuentran infectados por su forma larvaria (Bern *et al.*, 1999 en Pawlowski *et al.*, 2005).

Si bien la cisticercosis por *Taenia solium* es una enfermedad altamente distribuida en todo el mundo, las manifestaciones no son iguales en los diferentes continentes. En África y Asia así como en algunos países de Europa se han reportado casos tanto de manera conjunta como de forma separada de neurocisticercosis (NC) y cisticercosis subcutánea (CS); en China la prevalencia de pacientes con cisticercosis subcutánea y con neurocisticercosis es del 54 a 78.5% (Dixon y Lipscomb, 1961, Yinkun *et al.*, 1979 en Cruz *et al.*, 1994), en Nueva Guinea se ha encontrado que el 17% de la población humana tuvo nódulos subcutáneos (Muller *et al.*, 1987 en Cruz *et al.*, 1994), en Togo la prevalencia de nódulos subcutáneos en pacientes con NC fue del 79% (Dumas *et al.*, 1990) y en India la CS es incluso más frecuente que la NC (Singh, 1997).

Al contrario de lo reportado en África y Asia, en América Latina la CS es menos frecuente o casi no ha sido documentada por ejemplo en Colombia menos de 6% de los pacientes con NC tuvieron nódulos subcutáneos (Botero *et al.*, 1993 en Cruz *et al.*, 1994), a su vez en Ecuador en una población hiperendémica sólo un paciente de 34 presentó CS (Cruz *et al.*, 1994). La posible explicación en las diferencias encontradas entre los continentes puede estar basada en las diferencias raciales del hospedero humano o a la diversidad genética y antigénica del parásito en los diferentes continentes.

1.8.- Respuesta inmune en la neurocisticercosis

La NC es una enfermedad pleomórfica que puede cursar en forma asintomática o presentarse con sintomatología desde leve hasta severa pudiendo causar incluso la muerte del paciente (Villagrán y Olvera, 1988; Sotelo y del Brutto, 2000; Fleury *et al.*, 2003).

Se ha observado que factores propios del hospedero tales como la edad, el género y las características de la respuesta inmunoinflamatoria se asocian con la heterogeneidad clínica de la enfermedad (Rabiela *et al.*, 1972, Rangel *et al.*, 1987, Del Bruto *et al.*, 1988, 1998, Chavarría *et al.*, 2003; Fleury *et al.*, 2003,2004; Sáenz *et al.*, 2006).

Al respecto de la respuesta inmunoinflamatoria, en estudios previos se ha observado que los perfiles inmunológicos en el sistema nervioso (local) ó en el sistema periférico presentan distintas características en relación con la severidad de la enfermedad. Sin embargo la discrepancia metodológica y la clasificación de los pacientes entre los estudios ha dado lugar a resultados aparentemente contradictorios (Evans *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Grewal *et al.*, 2000; Restrepo *et al.*, 2001; Aguilar-Rebolledo *et al.*, 2001; Chavarría *et al.*, 2003, 2005).

En relación a la respuesta celular proliferativa, se ha reportado que independientemente de su severidad clínica los casos con NC sintomática no presentan proliferación celular ni producción de citocinas en comparación con los casos con NC asintomática los cuales presentan una respuesta proliferativa específica con producción de citocinas predominantemente de tipo TH2 (IL4,IL5, IL13 e IL12)(Chavarría *et al.* 2003; Chavarria *et al.*, 2005 en Larralde *et al.*, 2006), sin embargo en otros estudios se ha reportado que existe proliferación en pacientes sintomáticos cuando las células fueron estimuladas con mitógenos y antígenos del metacestodo (Restrepo *et al.*, 2001).

Otras condiciones que se asocian con la patogenia de la enfermedad son el número de parásitos que se instalan en el SNC, su localización (parénquima, espacio subaracnoideo, ventrículos, medula espinal), su tamaño, su estado macroscópico (vesicular, coloidal,

gránulo-nodular y calcificado) así como la intensidad de la reacción inflamatoria asociada a la infección (Fleury *et al.* 2004; Restrepo *et al.* 1998).

La localización del parásito en el SNC es de gran relevancia ya que determina en parte la heterogeneidad clínica de la enfermedad y es por esto que resulta interesante dilucidar la relevancia de la localización del parásito al respecto del fenómeno inflamatorio que se genera en torno a este.

Se sabe que los parásitos que se localizan en el parénquima y en espacio subaracnoideo de los surcos tienden a encontrarse más frecuentemente en estadio coloidal o calcificado y pese a que no se sabe el tiempo de evolución de los parásitos, se ha observado que en algunos casos los parásitos se encuentran asociados a un fenómeno inflamatorio exacerbado y en otros casos el fenómeno inflamatorio es bastante delimitado, incluso dentro del mismo individuo infectado (Escobar *et al.*, 1985; Fleury *et al.*, 2004). Esta observación nos permite proponer que en la interacción parásito-hospedero pudiera haber una regulación en la entrada de componentes de la respuesta inflamatoria dependiendo de diversos factores tanto del parásito, como del hospedero. En otras parasitosis que afectan al SNC, se ha observado que los parásitos pueden regular la expresión de componentes de la respuesta inmunológica para controlar el fenómeno inflamatorio en contra de ellos (Bauer *et al.*; 2002; Alsam *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Masocha *et al.*, 2004). Así el estudio de los factores por parte del parásito que pudieran estar participando en la patogenia de la enfermedad resulta fundamental.

1.9.- Estudios de genómica y variabilidad genética en *Taenia solium*

Según Hancock y colaboradores., (2001) el conocer la variabilidad genética de *Taenia solium* es importante para:

- 1.- Entender las interacciones hospedero-parásito
- 2.- Evaluar la efectividad de varios tratamientos con drogas
- 3.- Desarrollar métodos de diagnóstico
- 4.- Interpretar la epidemiología de la teniosis y la cisticercosis.

Hancock *et al.*, (2001) examinaron la variabilidad genética de *Taenia solium* secuenciando los genes que codifican para la citocromo oxidasa I, un transcrito interno especiador y un antígeno de diagnóstico Ts14, este trabajo se realizó con muestras de cisticercos provenientes de Perú, Colombia, México, India, China y Filipinas.

Al analizar los resultados, observaron que las secuencias para el gene de la citocromo oxidasa en cisticercos procedentes de cerdos de la misma región eran idénticas, por ejemplo en Perú, sin embargo diferían en 4 posiciones con respecto a los cisticercos procedentes de cerdos de Colombia, estas variaciones representan un cambio sencillo de un aminoácido. México varía de la secuencia del Perú en tres nucleótidos y esto provoca un cambio sencillo de aminoácido. En cambio Colombia y México difieren sólo en 1 nucleótido siendo por lo tanto muy similares.

Cuando compararon las secuencias de Perú con la de la India se tiene una diferencia en ocho nucleótidos lo que provoca un cambio de 2 aminoácidos. Perú y Filipinas varían en 7 nucleótidos lo que provoca un cambio en 2 aminoácidos, las secuencias de Perú y China difieren en 6 nucleótidos lo que provoca un cambio sencillo de aminoácido.

La tasa de variación vista en el gen COI entre las distintas poblaciones va del .25 a 2% que es menor a la de otras especies de tenias. Existe diferencia en la forma en que la enfermedad de la cisticercosis se manifiesta clínicamente entre Perú, India y China, y pudiera asociarse a variaciones en el parásito, sin embargo el autor menciona que la variación genética obtenida para este gen mitocondrial es muy pequeña para contribuir de manera significativa a estas diferencias clínicas. De hecho las diferencias en las manifestaciones clínicas es un proceso multifactorial en el que probablemente participen de manera conjunta factores del hospedero, del parásito y factores ambientales asociados con el ciclo de vida del parásito.

Okamoto *et al.*, (2001) por su parte analizó la secuencia parcial del gen de la citocromo c oxidasa subunidad I (*Cox I*) de cisticercos de *T. solium* obtenidos de varias regiones de Asia y América encontrando dos genotipos, el Asiático y el Americano.

Nakao *et al.*, (2002) por su parte examinaron el polimorfismo genético de *Taenia solium* en cisticercos provenientes de diversas localidades del mundo y lo realizaron comparando las secuencias de dos genes mitocondriales, el gen de la citocromo c oxidasa subunidad 1 *Cox I* (1620 pbs) y el gen del citocromo b (*Cytb*) (1068 pbs), las muestras provenían de China, Tailandia, Irian Jaya, India, México, Perú, Ecuador, Bolivia, Brasil, Tanzania, Mozambique y Camerún. Se propuso así la existencia de dos genotipos provenientes de regiones geográficas distintas, uno restringido a Asia y otro ampliamente expandido en África y América Latina formando un grupo, mientras que el de Asia forma un genotipo aparte. Las divergencias entre los dos grupos de genotipos fueron de .9 a 1.3% para el gen Cox 1 y de 1.6 a 2.1 para el gen Cytb.

El gen Cox 1 de la citocromo oxidasa ha sido ampliamente usado para diferenciar genotipos de *Taenia solium*, ejemplo de esto es que los nucleótidos que se encuentran en las posiciones 672, 690 y 723 muestran marcadores diagnósticos para especies de tenias, el nucleótido en posición 672 es para diferenciar la especie de tenia mientras que los que están en las posiciones 690 y 723 son para diferenciar entre dos genotipos de *Taenia solium* (Yamasaki *et al.*, 2004). Con esto se puede demostrar que existe variación genética entre los diferentes tipos de *Taenia solium* que existen en el mundo.

En algunos de los trabajos mencionados anteriormente se ha utilizado DNA mitocondrial para determinar la variabilidad genética de los tenidos. Los genomas mitocondriales son pequeños (generalmente menos que 20,000 pb en metazoarios), multicopiado en la célula y circular (McManus, 2006). El DNA mitocondrial es útil para la discriminación de organismos estrechamente relacionados por su relativa tasa de evolución. Por consiguiente como el DNA mitocondrial es haploide, alelos y haplotipos pueden ser determinados sin ambigüedad. El DNA mitocondrial tiene la ventaja adicional, de que es conocido, es maternalmente inherente y no recombina, lo que hace más simples los análisis

(McManus, 2006). Las comparaciones de las secuencias de DNA mitocondrial combinado, a su vez con un rango de diferentes criterios biológicos, epidemiológicos, bioquímicos y genético-moleculares proveen un fuerte argumento a favor de separar especies como ya se ha hecho con el género *Echinococcus*. Con el conocimiento de la secuencia del DNAmít y la tasa de sustitución es posible calcular la divergencia entre taxas, así por cada 2% de tasa de sustitución corresponde a un millón de años de divergencia, por ejemplo se ha calculado el porcentaje en la divergencia de nucleótidos entre *T. solium* y *Taenia asiática* que es del 14% lo que correspondería a 7 millones de años de divergencia entre estas dos especies; para *Taenia solium* y *Taenia saginata* se calculó un porcentaje de divergencia de 14.5 lo que equivaldría a 7.25 millones de años, comparando *T. saginata* con *T. asiatica* el porcentaje de sustitución de nucleótidos es de 4.5 lo que sugiere una divergencia de 2.25 millones de años, estas especies se consideran estrechamente relacionadas lo que explicaría que en el tiempo evolutivo ellas se separaron muchos millones de años después de la divergencia ocurrida entre *T. solium* y *T. saginata* (McManus, 2006).

Vega (2002) determinó el grado de variabilidad genética entre cisticercos provenientes de Madagascar (Africa) y México, dentro de este último diferenció varias regiones: México-Central y México-Sureste. A su vez también se llevo a cabo la diferenciación de las localidades dentro de México Central. Lo que obtuvo es que las poblaciones de *T. solium* de México y Madagascar se encontraron claramente diferenciadas genéticamente, así como también las regiones de centro y sureste de México están diferenciadas genéticamente. En cuanto a México Central el grado de diferenciación genética fue menor. Los altos valores de diferenciación genética se obtuvieron por la presencia de polimorfismos restringidos a países, regiones y localidades. Por otro lado los valores estimados de flujo genético entre las poblaciones con alta diferenciación genética resultaron bajos. Cuando se llevo a cabo el análisis entre las localidades comprendidas como México - Central la diferenciación genética es baja, mientras que el flujo génico es más alto, esto puede deberse a que fenómenos como la migración de humanos que pudieran ser portadores del estado adulto del parásito, al comercio de cerdos incluso a aquellos que pudieran estar infectados.

A pesar de que la variabilidad genética para *T. solium* es baja según los resultados obtenidos en este trabajo y siendo estimada por la diversidad genética de Nei, la heterocigosidad promedio total y en las subpoblaciones cuando esta es comparada con la obtenida para otras especies, existe una clara diferenciación genética entre las poblaciones de este parásito y está aumenta conforme aumente la distancia geográfica. Como discusión de su trabajo comenta que la baja variabilidad genética en *T. solium* podría explicarse considerando que esta especie presenta un método de reproducción por autofecundación, provocando de esta manera la endogamia, está a su vez lleva a las poblaciones a una disminución de la heterocigosidad y a que las poblaciones sean un conjunto de clonas separadas menciona citando a Hartl y Clark, (1989).

Otro estudio de variación genética en *T. solium* fue el realizado por Maravilla *et al.*, (2003) utilizando la técnica de RAPD-PCR, comparó cisticercos provenientes de varias regiones de 3 países. De México (Guerrero, Morelos y Yucatán), así como de Honduras y Tanzania. La combinación de oligonucleótidos utilizada permitió localizar 49 loci de los cuales 88% fueron polimórficos con un promedio de heterocigosidad de 0.077. El dendograma que construyeron separa en dos clados a los grupos los cisticercos provenientes de Morelos, Yucatán, Honduras y Tanzania mientras que el otro clado queda conformado por cisticercos de Guerrero y Morelos. Encontrando variaciones genéticas entre las distintas regiones analizadas y dentro de las mismas poblaciones en la misma región. Ellos comentan que estas características pueden tener importantes implicaciones epidemiológicas en aspectos como tasa de desarrollo del parásito, patogénesis o sensibilidad a los medicamentos. Este autor y colaboradores sugieren que *T. solium* posee linajes locales o líneas de descendencia con diferentes características por que es un parásito hermafrodita que en su hospedero definitivo experimenta deriva génica y efectos de endogamia y por consiguiente ha fijado varios alelos. Por consiguiente este parásito podría mantener y heredar un pool genético generado por reproducción sexual y/o mutación.

La variación genética, puede promover una expresión diferencial de genes que pudieran estar relacionados con variaciones en la relación huésped-parásito.

2.- ANTECEDENTES

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el estado larvario de *Taenia solium* que afecta a la porcicultura y a la salud humana. La gran mayoría de los casos de cisticercosis ocurren en países subdesarrollados de Latinoamérica, Asia y África (Sciutto *et al.*, 2000, Rodríguez- Canul *et al.*, 1999).

El complejo teniasis – cisticercosis por *Taenia solium* se caracteriza por una heterogeneidad en la susceptibilidad del hospedero tanto a nivel de la infección (entre individuos expuestos solo algunos se infectan), como de la enfermedad (de los infectados solo algunos se enferman desde leve a gravemente). En esta heterogeneidad pueden participar diferencias en la intensidad de la exposición al parásito así como diferencias entre características biológicas del hospedero (genes, género, edad) así como del parásito. En el humano se ha observado que la localización predominante en individuos de Latinoamérica es en el sistema nervioso central causando la NC, mientras que la presentación predominantemente de la cisticercosis africana es en el tejido subcutáneo (Vega *et al.*, 2003) si bien ancestralmente parecen tener la misma procedencia europea (Nakao *et al.*, 2002). A pesar de la gran variación de la localización del parásito y su importancia en la presentación y tratamiento de la enfermedad, se sabe poco acerca de la participación de factores del parásito asociados a esta heterogeneidad. A la fecha se han realizado importantes avances en el desarrollo de vacunas para su prevención (Sciutto *et al.*, 2000; 2002), se ha avanzado sustancialmente en nuevo y efectivos protocolos de tratamiento (Sotelo and Jung 1998), se han estudiado algunos de los posibles factores inmunomoduladores producidos por el cisticerco (Arechavaleta *et al.*, 1998; Molinari *et al.*, 2000) y sus interacciones con la respuesta inmune (Restrepo *et al.*, 2001) así como la variabilidad genética del cisticerco entre diferentes tejidos de cerdos de diferente origen geográfico (Vega *et al.*, 2003; Maravilla *et al.*, 2003). El conocimiento de la variabilidad genética y proteica de *Taenia solium* tanto en el cerdo como en el humano podría permitirnos determinar la participación de factores del parásito relacionados con la fisiopatología de la cisticercosis. Al respecto, recientemente, comparando regiones aleatorias del genoma de cisticercos de *T. solium* de diferentes áreas geográficas (centro y sudeste de

México, Madagascar) utilizando la técnica de “RAPDS” (de las siglas en inglés Random Amplified Polimorphic DNA assay) encontramos diferencias en su genoma que claramente establecen la existencia de diversidad en el parásito y que señalan que estas diferencias podrían estar participando en la heterogeneidad clínica en esta enfermedad (Vega *et al.*, 2003). Precisamente, resulta de especial interés investigar el efecto que podría tener la diferente expresión génica sobre la infección y localización diferencial de los cisticercos de *Taenia solium*. Para este propósito se identificarán y caracterizarán los genes que se expresen diferencialmente entre cisticercos del SNC de pacientes con neurocisticercosis de México.

Evolución histórica de la tenia: datos que sustentan su potencial capacidad de modificación.

Taenia solium pertenece a los eucéstodos los cuales se caracterizan por requerir de dos mamíferos como hospederos obligatorios, un intermediario y un carnívoro definitivo. La prevalencia del género *Taenia* se ha asociado a la domesticación de animales de consumo, evidencias filogenéticas indican que la tenia afectó a homínidos africanos antes de que ocurriera la domesticación y el desarrollo de la agricultura. Se ha propuesto que el ancestro común de la tenia pudo haber surgido desde hace un millón de años en herbívoros del África como antílopes, pudiendo haber sido los hospederos intermediarios leones y hienas que se alimentaban de estos herbívoros. De África el parásito se diseminó a otros continentes, como Europa y Asia y posteriormente a América. Durante este tiempo la tenia comenzó a modificarse con el fin de adaptarse a los nuevos ambientes y a la fecha se han reportado la existencia de 45 especies diferentes en este género clasificados en base a los hospederos que afecta en el estado larvario y en la fase adulta del parásito y a características morfológicas. De estas 45 especies, las más estudiadas son las 3 que afectan al hombre en su fase adulta (*Taenia solium*, Linnaeus 1758; *Taenia asiática*, Eom and Rim 1993 y *Taenia saginata* Goeze 1782), siendo el hospedero intermediario obligatorio el cerdo en las dos primeras y la vaca el hospedero de *T. saginata*. En México solo se han reportado la existencia de 2 de ellas (*Taenia solium* y *Taenia saginata*). Se ha documentado que *Taenia solium* llegó al nuevo mundo desde hace al menos 500 años (Crosby, 1972),

consolidando su presencia biológica en México a través de la explosión numérica de sus hospederos intermediarios (cerdo) y definitivos (humano).

Un caso particular lo constituye la *Taenia asiática*, una tenia que al igual que la *Taenia solium* afecta al ser humano produciendo neurocisticercosis con manifestaciones clínicas muy similares, aunque se caracteriza por invadir notoriamente el tejido muscular de los humanos afectados. Si bien esta tenia fue reportada originalmente en base a la morfología del estadio larvario y adulto, no fue hasta 1994 en que la disponibilidad de la secuencia completa de los genes mitocondriales permitió consolidarla como una nueva subespecie de *Taenia saginata* (Bowles and McManus, 1994).

3.-JUSTIFICACIÓN

La neurocisticercosis causada por *Taenia solium* es una enfermedad parasitaria compleja (Fleury *et al.*, 2004; 2006) en la que se ha sugerido que la variación genética del parásito podría estar asociada a las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad (Vega *et al.*, 2003). La variabilidad genética puede reflejarse en factores como la virulencia, tasa de crecimiento del parásito, especificidad por el hospedero, ciclo de vida, sensibilidad a las drogas y metabolismo (Thompson y Meloni, 1993). Así, en *Echinococcus granulosus* se ha reportado que la variabilidad genética da como resultado la formación, dentro de la especie, de varias cepas las cuales pueden diferir en caracteres fenotípicos que afectan el patrón del ciclo de vida, la especificidad del hospedero, la tasa de desarrollo, patogenicidad, antigenicidad y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos, dinámica de transmisión, epidemiología y control de la enfermedad (Thompson y McManus, 2002).

En el caso de la cisticercosis, la participación de factores del parásito en la susceptibilidad a la infección y a la enfermedad no se ha explorado ni en cerdos ni en humanos. La evaluación de variación genética así como de la expresión diferencial de genes podría contribuir críticamente al desarrollo de medidas terapéuticas para enfermedades multifactoriales. En este sentido, estudios similares al presente proyecto propuesto han permitido identificar que niveles incrementados de ciertas proteínas correlacionan con la sobrevida del parásito en su hospedero; *e.g.* la acetilcolinesterasa en *Nippostrongylus braziliensis* (Hussein *et al.*, 2002), una proteína similar a la mucina en *Toxocara canis* y una glicoproteína que contiene fosforicolina en *Acanthocheilonema viteae* (Harnett y Harnett, 2001). Estrategias similares parecen ser utilizadas por el cisticerco de *Taenia solium* para manipular la respuesta inmune del hospedero como la producción de una proteasa de cisteína que depleta linfocitos CD4 (Molinari *et al.*, 2000) y el factor metacestoide que inhibe la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4. Posibles variaciones en estas proteínas podrían estar involucradas en una diferente capacidad patogénica de los cisticercos.

Adicionalmente, los tejidos de diferentes mamíferos difieren fisiológicamente en términos de pH, grado metabólico, respuesta inmune efectora, entre otros factores. Así, diferentes combinaciones de estos factores podrían determinar medios ambientales diferenciales en los que el parásito podría instalarse y desarrollarse. Como resultado de estas diferencias, la expresión génica podría diferenciarse entre cisticercos que requieran diferentes estrategias y mecanismos para lidiar con las diferentes circunstancias que presentan los diferentes tejidos y hospederos. Diferencias en la expresión génica podrían reflejar e informarnos sobre las diferentes estrategias que puede utilizar el parásito en diferentes circunstancias ambientales. Por ejemplo, es factible que las estrategias que el parásito desarrolle varíen importantemente de acuerdo a los factores inmunológicos con los que localmente se enfrente y que los genes que se expresen más abundantemente en diferentes circunstancias reflejen estrategias comunes involucradas en la infección.

El método de expresión diferencial RT-PCR (en inglés DDRT-PCR) resulta el procedimiento adecuado para el análisis de la expresión de genes. El estudio de la biología molecular de este parásito, procedentes de cerdo por DDRT-PCR resulta factible considerando la poca cantidad de RNA requerida y permitirá, proveer la información relevante para abordar el problema planteado y extenderlo a otras relaciones hospedero-parásito.

En este trabajo se pretende identificar y caracterizar los genes que se expresen diferencial y abundantemente en diferentes circunstancias de la relación hospedero-parásito. Adicionalmente se estudiara si la variación genética del cisticerco pudiera estar asociada a una diferente capacidad de infección en el cerdo. La caracterización de estos genes y/o proteínas del cisticerco de *Taenia solium* procedentes de distintos tejidos del cerdo podrían ayudar a entender los mecanismos involucrados para favorecer su establecimiento y sobrevivencia en el cerdo y muy importantemente en el humano, así como ahondar en los fenómenos biológicos de la interacción entre el parásito y sus hospederos.

4.- HIPÓTESIS

Los cisticercos presentan diferentes perfiles de expresión de genes según el compartimiento en el que se alojan dentro y fuera del sistema nervioso central.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar si la variabilidad genética que existe entre poblaciones de *T. solium* se ve reflejada en una expresión diferencial de genes, y por consiguiente si esto influiría en la elección del sitio de alojamiento del parásito en el hospedero.

Objetivos Particulares:

- 1) Evaluar por RAPDs la identidad genética de cisticercos procedentes de distintas localizaciones dentro de un mismo cerdo.
- 2) Identificar y caracterizar por Differential Display la expresión diferencial de genes entre:

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Colección de los cisticercos

Los cisticercos utilizados en este trabajo provienen de un mismo cerdo, el cual se infectó en condiciones naturales de transmisión. El cerdo fue una hembra y proviene de una comunidad endémica para la cisticercosis en el Estado de Morelos.

El cerdo fue comprado a sus propietarios y traído a la CD. de México para ser sacrificado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. El sacrificio se realizó mediante descargas eléctricas directas al cerebro. El mismo día en que se sacrificó se obtuvieron los cisticercos, los cuales proceden de distintas regiones anatómicas. La colección de cisticercos se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Los cisticercos procedentes de músculo esquelético fueron extraídos de la pierna izquierda trasera. Mientras que los tomados del Sistema Nervioso Central (SNC) fueron del espacio subaracnoideo y del parénquima cerebral. Esta labor se realizó con la ayuda de la Dra. Aline Aluja de la FMVZ.

Para este trabajo sólo se utilizaron cisticercos en estado vesicular, los cuales fueron lavados con PBS estéril, se les extrajo el líquido vesicular y se eliminó el excedente con papel estéril, posteriormente se envolvieron en papel aluminio previamente esterilizado y se congelaron a -70°C para su posterior uso.

5.2.- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

5.2.1.- Colección de los cisticercos.

Los cisticercos utilizados para realizar las pruebas de RAPDs son del mismo cerdo y de las mismas localizaciones que los utilizados para el estudio de Differential Display - PCR. Proviene de un cerdo infectado de manera natural. Su estado era vesicular y las

localizaciones de donde se extrajeron son: músculo esquelético (pierna trasera) y Sistema Nervioso Central (espacio subaracnoideo y parénquima).

5.2.2.- Extracción de DNA y cuantificación.

La extracción del DNA se realizó por medio de un kit comercial GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit, Protocolo C (Pharmacia). El Procedimiento que se siguió fue el recomendado por el proveedor y se presenta a continuación:

5.2.3.- Lisis celular.-

- 1) Enfriar un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 600 μ l de solución de lisis celular (Tris[hidroximethyl]aminomethane, Ethylenediamine-tetraacetic acid [EDTA] y Sodium Dodecyl Sulfate [SDS]) en hielo y esperar a que la solución se ponga turbia.
- 2) Adicionar 10-20 mg de tejido (1cisticerco) al tubo con la solución de lisis celular, retirar del hielo y homogenizar rápidamente. Mantener las muestras homogenizadas en hielo hasta el paso 3.
- 3) Agregar 3 μ l de solución de Proteinasa K (20mg/ml) al lisado e incubar a 55 °C por toda la noche.

5.2.4.- Tratamiento con RNasa.-

- 1) Agregar 3 μ l (o 5 μ l) de solución con RNasa (4 mg/ml [>100 u/mg]) al lisado celular.
- 2) Mezclar la muestra volteando el tubo aproximadamente 25 veces e incubar a 37 °C por 30 min.

5.2.5.-Precipitación de Proteínas

- 1) Enfriar la muestra en hielo.

- 2) Agregar 200 μ l de solución de precipitación de proteínas (acetato de amonio) al lisado tratado con RNasa.
- 3) Agitar vigorosamente por 20 seg para mezclar la solución de precipitación de proteínas uniformemente con el lisado.
- 4) Centrifugar a 13,000 x g por 3 min. Las proteínas formarán un botón en el fondo del tubo.

5.2.6.- Precipitación de DNA

- 1) Colocar el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml limpio con 600 μ l de isopropanol al 100%.
- 2) Mezclar la muestra volteando 50 veces hasta que se observen hebras blancas de DNA formando un agregado.
- 3) Centrifugar a 13,000 x g por 2 min, el DNA formará un botón visible en el fondo del tubo.
- 4) Descartar el sobrenadante y secar el tubo en papel absorbente. Agregar 600 μ l de etanol al 70%. Voltar el tubo varias veces para lavar el botón de DNA.
- 5) Centrifugar a 13,000 x g por 2 min. Descartar el etanol sin desprender el botón de DNA.
- 6) Secar el tubo en papel absorbente y dejar secar la muestra por 15 min.

5.2.7.- Hidratación del DNA.-

- 1) Agregar 100 μ l de solución de hidratación de DNA (Tris [hidroximetil]aminometano y EDTA) al tubo con el botón de DNA.
- 2) Calentar a 65 °C por 1 hora, golpear periódicamente el tubo para ayudar a la hidratación del DNA.
- 3) Guardar las muestras a 2-8 °C.

5.2.8.-Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

En este trabajo se utilizó el kit comercial Ready-To-Go RAPD Análisis Kit (Pharmacia). El cual incluye un juego de 6 oligos (RAPD Análisis Primer Set, Pharmacia) diseñados específicamente para su uso en RAPDs. Los oligos son decámeros (10 bases) de secuencia arbitraria sin extremos complementarios, con un contenido de 60% de GC, la secuencia de los primers fue la sig.:

Tabla . Oligonucleótidos utilizados en los RAPDs

| Nombre | Secuencia |
|-------------------------------------|----------------------|
| RAPD Análisis Primer 01 (Pharmacia) | 5'-d[GGTGC GGAA]-3' |
| RAPD Análisis Primer 02 (Pharmacia) | 5'- d[GTTTCGCTCC]-3' |
| RAPD Análisis Primer 03 (Pharmacia) | 5'-d[GTAGACCCGT]-3' |
| RAPD Análisis Primer 04 (Pharmacia) | 5'-d[AAGAGCCCGT]-3' |
| RAPD Análisis Primer 05 (Pharmacia) | 5'-d[AACGCGCAAC]-3' |
| RAPD Análisis Primer 06 (Pharmacia) | 5'-d[CCCGTCAGCA]-3' |

Las reacciones de RAPDs incluyen:

- Dos polimerasas (AmplitagTM DNA polymerase y Stoffel fragment) que amplifican mejor que una.
- dNTPs (0.4 mM de cada dNTP en un volumen de 25 µl)
- Albumina de suero bovino (2.5 µg)
- Amortiguador (3mM MgCl₂, 30mM KCL y 10 mM Tris pH 8.3 en un volumen de 25 µl).
- 5 µl (25 pmol) de un sólo oligonucleótido
- 4 µl (20 ng) de la solución de DNA de cisticerco
- 16 µl de agua destilada (libre de Dnasas y Rnasas)

Dando un total de 25 µl por reacción.

Los ciclos de amplificación el PCR fueron:

95 °C por 5 min } 1 ciclo

95 °C por 1 min }
36 °C por 1min } 45 ciclos
72 °C por 2 min }

Al término de las reacciones se guardaron a 4 °C y posteriormente a -20 °C hasta su utilización en los geles de agarosa.

5.2.9.- Elaboración de los geles para RAPDs

Los productos obtenidos de la amplificación por PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% (100 ml TBE [Tris borate EDTA] y 2.0 g de agarosa). Con bromuro de etidio a 0.8 µg/ml en buffer de TBE durante 3:30 horas a 60 V.

Las muestras fueron corridas junto a un marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, Roche) para poder estimar, posteriormente, los pesos moleculares de las bandas, las bandas separadas por electroforesis fueron visualizadas posteriormente utilizando un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con película Polaroid Polapan 667 ISO 3000 (blanco y negro) utilizando una cámara fotográfica para geles (GelCam, Polaroid).

5.2.10.- Análisis de los geles

Las fotografías de los geles se digitalizaron por medio de un scanner y se guardaron en formato TIF. Las imágenes de los geles fueron analizadas por medio de un programa Gene Profiler (Scanalytics). Para determinar el patrón de bandeo. Este programa está diseñado para el análisis de geles en una dimensión de bandas de DNA formadas por PCR, RAPD, RFLP etc.

5.3. Expresión Diferencial de Genes (DDRT-PCR)

5.3.1.- Extracción de RNA Total y confirmación de la integridad del RNA

La extracción de RNA se realizó a través del método del Trizol (Gibco BRL), por este método es posible obtener un RNA de calidad, lo cual se confirmó cuando se vio la integridad en un gel de agarosa al 1.5% (Fig. 5)

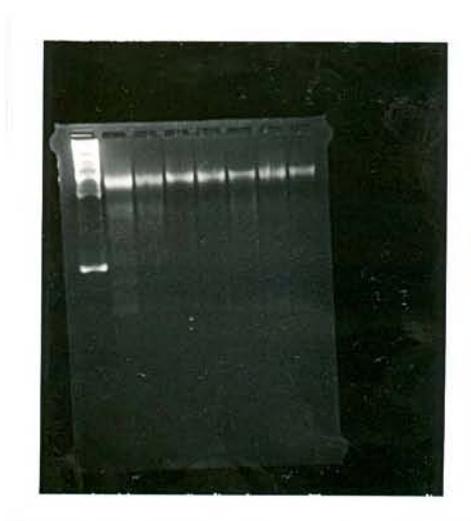


Fig 5. imagen de la integridad del RNA usado para las pruebas de Differential Display se colocaron 2 μ g de RNA en cada carril.

Los pasos de la extracción fueron los siguientes:

- 1) Se maceró el cisticerco con 1 ml del reactivo Trizol hasta homogenizarlo, sólo se utilizó un cisticerco individual por extracción. Posteriormente con una pipeta y punta estéril se transfirió el homogenizado a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Después se agregó 12.6 μ l de glicógeno (Roche, 20 mg) el cual ayuda a la precipitación de ácidos nucleicos y se incubó 5 min a temperatura ambiente y 3 min en hielo.
- 2) A continuación se agregó 220 μ l de Cloroformo grado reactivo (Sigma, Aldrich), y en seguida se homogenizó en un vortex incubándose 15 min en hielo, para después centrifugar a 10,000 rpm a 4 °C por 15 min. Lo que se obtiene como producto de la centrifugación son tres fases: una roja en el fondo del tubo, una blanca intermedia y

una superior transparente, es en esta donde se queda el RNA. Se extrae la fase acuosa superior y se transfiere a un tubo eppendorff estéril. Las otras dos fases son desechadas.

- 3) En seguida se agregaron 600 μ l de Isopropanol, dejándose toda la noche en refrigeración a 4 °C para una mejor precipitación del RNA. Una vez hecho esto se centrífugo a 13,000 rpm por 15 min, al terminar se desecho el sobrenadante y en el tubo se observo un botón de color blanquecino en el fondo del tubo correspondiente al RNA precipitado.
- 4) A continuación siguió el lavado con Etanol al 80% con Agua – DEPC, se agregó 1 ml por tubo, y se centrífugo 5min a 13,000 rpm, posteriormente se decanto el sobrenadante para después dejar secar el botón al aire libre en una zona estéril.

5.3.2- Cuantificación del RNA total

Una vez obtenido el RNA se llevó a cabo la cuantificación para lo que se utilizó un espectrofotómetro haciendo una dilución 1:250 (1 μ l de RNA y 249 μ l de H₂O) en agua estéril libre de DNasas y RNasas (GIBCO, Invitrogen Corporation).

Las lecturas en el espectrofotómetro se hicieron por duplicado y después se saco el promedio de las dos mediciones.

Una vez conocida la concentración de RNA se verificó la integridad del mismo, elaborándose en un gel de agarosa al 1.5% con 3 μ l de bromuro de etidio y se cargaron 2 μ g de RNA por cada pozo. Finalmente las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV, con una cámara especial para geles, estos fueron fotografiados, lo que se pudo observar fueron dos bandas en su caso o también cuando el RNA estaba degradado lo que se observa como un barrido. El RNA que se utilizó fue el que mayor integridad mostró en sus bandas y no estaba degradado.

5.3.3.- Transcripción reversa – PCR (RT-PCR)

La transcripción reversa se llevo a cabo una vez que se confirmo que el RNA era de la calidad deseada y se realizó de la siguiente forma:

- Se utilizaron 200 ng de RNA
- Primer de anclaje 2 µl (10 µM, Invitrogen)
- Agua estéril libre de RNAsas (GIBCO, Invitrogen Corporation).

La secuencia del oligonucleótido de anclaje se muestra en la tabla 1

Tabla 1 secuencia del oligonucleótido utilizado para la RT

| Nombre | Secuencia |
|---------------------|-------------------------------|
| Primer de anclaje C | 5´-[AAG CTT TTT TTT TTT C]-3´ |

Todo se colocó en un tubo de PCR y aforándose a un volumen de 11µl con agua estéril y colocándose posteriormente en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) con el siguiente ciclo:

- 70 °C / 10 min y después 2 min en hielo

Después se agregó 9 µl de la mezcla que contenía:

- 4µl buffer 5X (Invitrogen)
- 2µl DTT (100mM, Invitrogen)
- 0.4µl RNAGuard (Amersham, Biosciences)
- 1.6µl dNTPs (250 µM, Invitrogen)
- 1µl RT (Invitrogen)

Todo esto para una reacción. En seguida se colocó la mezcla en el termociclador a los siguientes tiempos :

- 25 °C, 5 min / 37 °C 1 h / 95 °C 5 min

Una vez realizada la transcripción reversa (RT) se llevo a cabo la amplificación por PCR para esto se utilizó 2µl del cDNA obtenido del RT y 18µl de una mezcla que contenía:

- 2 µl de buffer 10X Invitrogen)
- 1.2 µl de MgCL₂ (25mM, Invitrogen)
- 1.6 µl dNTPs (25µM, Invitrogen)
- 2 µl primer de anclaje C (10µM, Invitrogen)
- 2 µl primer de amplificación (2µM, Invitrogen)
- 0.2 µl Taq Pol (DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen)
- 1 µl azufre radioactivo ³⁵S (Amershan Biosciences)
- 8.0 µl de agua estéril libre Dnasas y Rnasas (Gibco, Invitrogen Corporation).

Los oligonucleótidos de amplificación son decámeros arbitrarios (diez bases), y se utilizaron cuatro diferentes con la siguiente secuencia que se muestra en la tabla número :

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para Differential Display – PCR

| Nombre | Secuencia |
|--------------------------|------------------------|
| Primer DDL1 (Invitrogen) | 5'-d[TCG ATA CAG G]-3' |
| Primer DDL2 (Invitrogen) | 5'-d[TCG GTC ATA G]-3' |
| Primer DDL3 (Invitrogen) | 5'-d[CTT TCT ACC C]-3' |
| Primer DDL4 (invitrogen) | 5'-d[CTG ATC CAT G]-3' |

Una vez hecho esto se colocaron dentro del termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) con los siguientes ciclos:

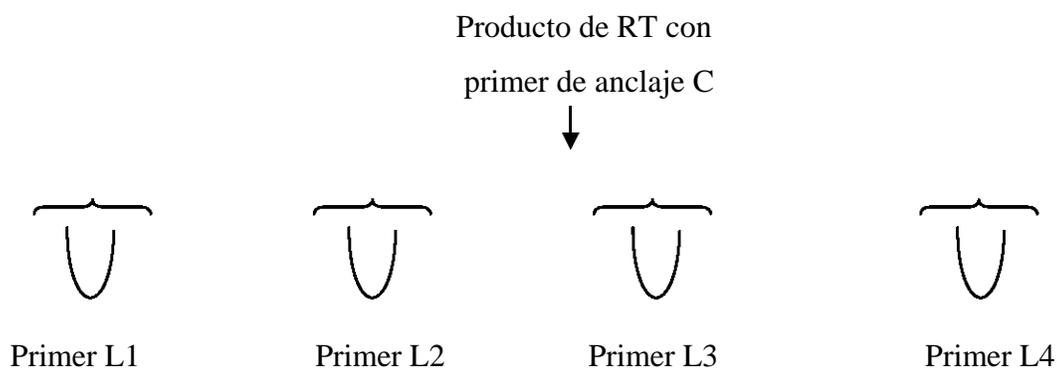
94 °C 5 min

94 °C 50 seg }
40 °C 90 seg } 35 ciclos
72 °C 60 seg }

72 °C 5 min

Cuando finalizaron los ciclos del PCR los productos fueron guardados en el refrigerador a -20°C para su posterior uso.

El oligonucleótido de anclaje se combinó con un oligonucleótido de amplificación, dando como resultado cuatro combinaciones que amplificaran de distinta forma y darán un patrón de bandeo distinto.



Además se colocaron tubos control negativos que contenían toda la mezcla de reacción para PCR pero sin cDNA, que fue sustituido con agua estéril.

A su vez una muestra con RNA de bazo de cerdo fue tratada como todas las demás y cuyo patrón de bandeo nos servirá como standard para poder analizar los geles en el programa Quantity One (Bio Rad).

5.3.4.- Electroforesis

La electroforesis se realizó en una cámara de secuenciación (Gen Hunter) y los pasos a seguir son los sig:

- Lavado de vidrios con NaOH 2 N y etanol
- Lavado de peines y separadores
- Elaboración del stock de gel de poliacrilamida 6% y Urea 8 M (Sigma). Para esto se agrega 240 g de Urea, 75 ml acrilamida - bisacrilamida 40:1 (Plus One Amershan Biosciences) y TBE 10X 50 ml, a continuación se filtró a través de un papel filtro, para después aforarlo a 500ml con agua bi-destilada. Esta es la solución stock.
- Preparación del gel.- Se toman 100 ml de la solución stock y se le agrega 330 μ l de persulfato de amonio 30% (Bio Rad), también se le añade 20 μ l de TEMED (Bio Rad) se agita para después vaciarlo en el molde y se deja solidificar por 2 h.

A las dos horas se colocó el gel en la cámara y se llenaron los depósitos con buffer, para el depósito superior se le agregó 500 ml de buffer TBE .5X, para el depósito inferior TBE 1X también 500 ml.

Para cargar las muestras en el gel se realizó lo sig:

Se mezcló 5.5 μ l de las muestras con 2.5 μ l de buffer de carga para secuenciación. Las muestras fueron hervidas por 2 min y posteriormente colocadas en hielo.

Posteriormente las muestras se cargaron en el gel colocando 5 μ l de la muestra en el pozo. Se conectó la cámara a la fuente de poder (Bio Rad Power Pac HV) y se programaron los límites de corrida que fueron:

| | | | |
|--------|---------|-----------|-------|
| 2000 V | 65 mA | 65 W | 60 W |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Límite | Voltaje | Corriente | Poder |

Una vez que el amortiguador de carga llegó hasta el final del gel, se detuvo la fuente de poder y los vidrios se retiraron de la cámara, también se retiró el peine y los separadores, y de un extremo del vidrio con una navaja se abrieron los vidrios, quedándose el gel adherido sobre el vidrio grande, a continuación con un papel filtro (Bio Rad, Model 583, Filter paper) de 35 x 45cm se colocó sobre el gel todavía húmedo, quedando adherido al papel filtro.

El siguiente paso es el secado, para ello una vez que se tiene el gel adherido al papel filtro se cubre con un plástico Kleen- Pac comercial y se coloca en el secador (Bio Rad Model 583 Gel Dryer) por un tiempo de 2h a 80°C. Llevándose a cabo la deshidratación del gel con ayuda del vacío conectado al secador y a su vez sea secado con calor, una vez cumplidas las 2h, se retiró del secador y el plástico desprendido del gel.

5.3.5.- Secado del gel y exposición de la placa fotográfica

Ya con el gel seco, se expuso a una placa fotográfica (Kodak BioMax de 30 x 40 cm) dentro de un cassette, para esto el gel fue pegado con cinta adhesiva al cassette y encima la placa fotográfica la cual tiene dos caras una brillante y otra opaca, la opaca va pegada al gel, después con una pluma, se marcaron los bordes de la placa sobre el papel filtro esto con la finalidad de tener la orientación de la placa sobre el gel. Así se dejó 48h o más y después fue revelada la placa con líquido revelador y fijador.

Una vez obtenida la placa fotográfica, la imagen fue analizada con el software Quantity One, el cual sirve para analizar geles de Differential Display.

5.3.6.- Análisis de los geles

El análisis de los geles se hizo mediante el software Quantity One de BioRad y este consistió en los siguientes pasos:

- 1) Primero se capturó la imagen por medio de un scanner Fluor – S Multimager, lo cual consistió primero en seleccionar la aplicación que para este caso fue ácidos nucleicos, Rayos - X. Las otras variables fueron selección de foco y tiempo de exposición. Una vez adquirida la imagen deseada se guardó en formato TIF.
- 2) Posteriormente se modificó la imagen para su análisis escogiendo variables como contraste, brillo, se trató de eliminar lo más posible el background.
- 3) El paso siguiente fue la delimitación de los carriles lo que se hizo manualmente y posteriormente se definió las bandas, para esto algunas fueron colocadas manualmente ya que el programa no era capaz de reconocerlas, también se seleccionó la sensibilidad.
- 4) A continuación se llevó a cabo la alineación de las bandas para esto se escogió un carril que contuviera el mayor número de bandas compartidas con el resto de carriles y se escogió este para hacer el match. Cabe señalar que la alineación se hizo con cada un carril de cada localización para todas las bandas con expresión diferencial fueran tomadas en cuenta. En seguida se procedió al análisis de Differential Display, escogiendo esta opción del comando de control.
- 5) Ya que las bandas que se expresaron diferencialmente fueron localizadas y numeradas se procedió a obtener la densidad óptica de cada banda diferencial.
- 6) Con estos valores se elaboró las tablas de D.O. correspondientes para cada gel.

6.- RESULTADOS

6.1 Variación genética de cisticercos procedentes del mismo cerdo

Para evaluar si los cisticercos procedentes del cerdo del cual se colectaron los cisticercos para el estudio de expresión diferencial son genéticamente iguales se realizó un estudio de variabilidad genética. Los cisticercos se colectaron de las mismas localizaciones que los utilizados para los estudios de expresión diferencial. Las imágenes de los geles obtenidos por RAPDs se muestran en la figura 6. Se utilizaron 6 oligonucleótidos con los cuales se han detectado variaciones genéticas en *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*. Se observa un patrón de amplificación idéntico en los cisticercos procedentes de músculo esquelético, así como de los procedentes de las 2 regiones anatómicas del SNC del cerdo (espacio subaracnoideo de la base y parénquima). Esto se observó con los 6 oligonucleótidos utilizados.

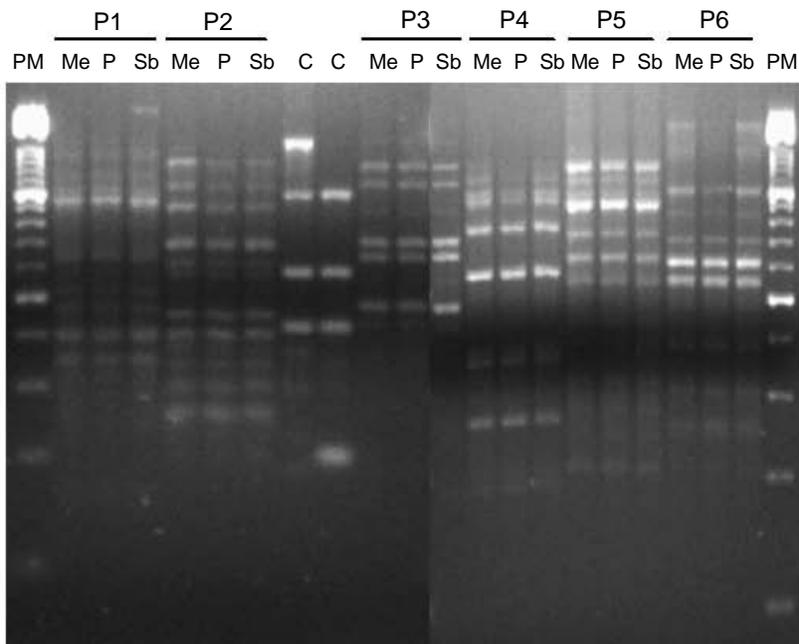


Figura 6: RAPDS de los cisticercos procedentes de las tres regiones anatómicas del cerdo (Me: músculo esquelético, P: parénquima, Sb: espacio subaracnoideo) y con los 6 oligonucleótidos empleados (P1 a P6). PM= peso molecular. Se observa que con cada primer los cisticercos de los tres compartimentos anatómicos muestran un patrón de bandeo idéntico. Como control de amplificación específico se incluyeron muestras de tejido de cerdo (C) las cuales solo se amplificaron con el primer P1.

Como puede apreciarse la amplificación fue específica para tejido de cisticerco.

6.2. Expresión diferencial de genes

Considerando que se trata de cisticercos genéticamente idénticos, se realizó un estudio de expresión diferencial con la finalidad de evaluar si los distintos compartimentos conducen a que el parásito exprese diferencialmente los genes. Para este estudio se utilizaron 1 primer de anclaje y 4 de amplificación.

6.2.1. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 1 (P1)

Con el primer 1, se amplificaron diferencialmente 9 bandas de los cisticercos localizados en el Sistema Nervioso Central.

Banda 1:

La banda 1 es expresada en dos de los tres cisticercos del espacio subaracnoideo y en el cisticerco 2 de parénquima; aunque su expresión diferencial es clara, su nivel de expresión medido en densidad óptica es bajo.

Banda 2:

La banda 2 se expresa en dos de los tres cisticercos del espacio subaracnoideo así como en dos cisticercos de parénquima, también es una banda con un expresión diferencial clara y los valores de densidad óptica son mayores que para los de la banda 1.

Banda 3:

La banda 3 se expresa en cisticercos del espacio subaracnoideo como en los del parénquima y su D.O. tiene valores altos pero no es una banda bien definida.

Banda 5:

La banda 5 se expresa en los tres cisticercos del espacio subaracnoideo y del parénquima, también posee valores de D.O. altos pero al igual que la banda 3, no se define correctamente y esto se debe a la cercanía con otras bandas del gel,

Banda 12.

La banda 12 es una banda bien definida que se expresa en todos los cisticercos del sistema nervioso central, y en ninguno de los cisticercos del músculo esquelético, por lo que es un candidato de clonación y secuenciación.

Banda 13:

La 13 sólo se amplificó en un cisticerco (el cisticerco 3) del parénquima.

Banda 22:

La 22 se expresa en todos los cisticercos del sistema nervioso central con valores de densidad óptica bajos pero es una banda muy bien definida especialmente de los cisticercos del espacio subaracnoideo, es por lo tanto otro candidato a la secuenciación.

Banda 27:

La banda 27 presenta bajos niveles de expresión en relación a la D.O., no está claramente definida por lo que no se considera un candidato.

Tabla 1. Números de bandas por cada cisticerco, D.O. de cada banda, bandas expresadas

| Región anatómica | Músculo esquelético | | | Espacio subaracnoideo | | | Parénquima | | | |
|---|---------------------------|----|----|-----------------------|------|-------|------------|-------|-------|-------|
| | Muestra de cisticerco | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| No. Total de bandas en cada cisticerco | 29 | 29 | 33 | 30 | 37 | 38 | 37 | 33 | 34 | |
| <i>Bandas expresadas Diferencialmente</i> | <i>D.O. de cada banda</i> | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | 20 | 36.5 | | 43 | | |
| 2 | | | | | 40.5 | 69 | | 58.5 | 60.5 | |
| 3 | | | | 26.5 | 104 | 136.5 | | 112.5 | 101 | 80 |
| 5 | | | | 62 | 151 | 156.5 | | 138.5 | 127.5 | 109.5 |
| 12 | | | | 46 | 92 | 97.5 | | 35.5 | 19 | 23 |
| 13 | | | | | | | | | | 63.5 |
| 22 | | | | 43.5 | 64.5 | 84 | | 35 | 57 | 65.5 |
| 27 | | | | 29 | 45 | 48 | | 23.5 | 51.5 | 75 |
| 28 | | | | 29 | 35 | 44.5 | | 11.5 | 32 | 56 |

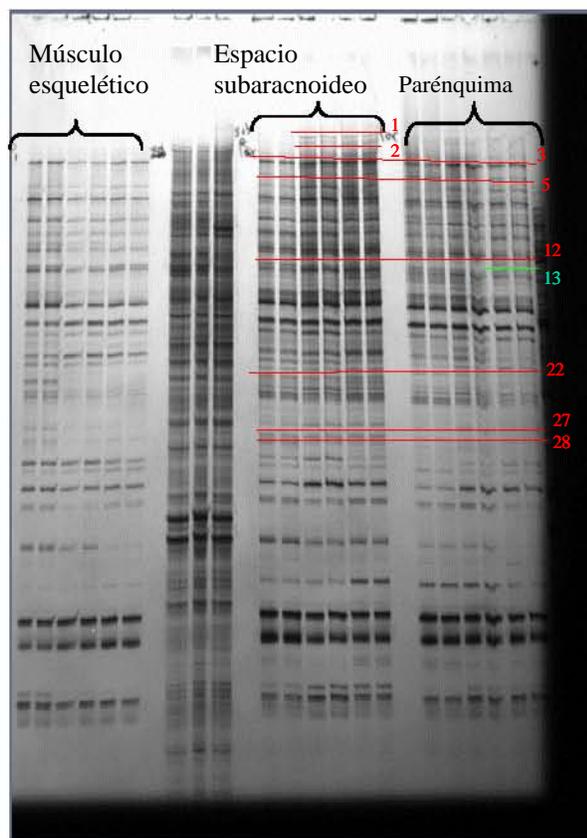


Fig. 7 Imagen del gel con el oligonucleótido núm. 1

6.2.2. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 2 (P2)

Banda 22

Con el oligo 2 solamente se obtuvo una banda diferencial localizada en espacio subaracnoideo de dos de los tres cisticercos (cisticercos 2 y 3), así como en un cisticerco de parénquima que fue el 2. El número que le corresponde a la banda en el gel es el 22, es una banda no bien definida por lo que no se recomienda su uso para un tratamiento posterior (reamplificación, secuenciación y clonación) .

Tabla 2. Número de bandas por cada cisticerco ,D.O. de cada banda, bandas expresadas.

| Número de cisticerco | Región anatómica | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|----|----|-----------------------|----|----|------------|----|----|----|--|--|
| | Músculo esquelético | | | Espacio subaracnoideo | | | Parénquima | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | | | |
| Número total de bandas en cada cisticerco | 29 | 29 | 33 | 30 | 37 | 38 | 37 | 33 | 34 | | | |
| <i>Banda expresada Diferencialmente</i> | D.O. de cada banda | | | | | | | | | | | |
| 22 | | | | 67 | | | 58 | | | 57 | | |

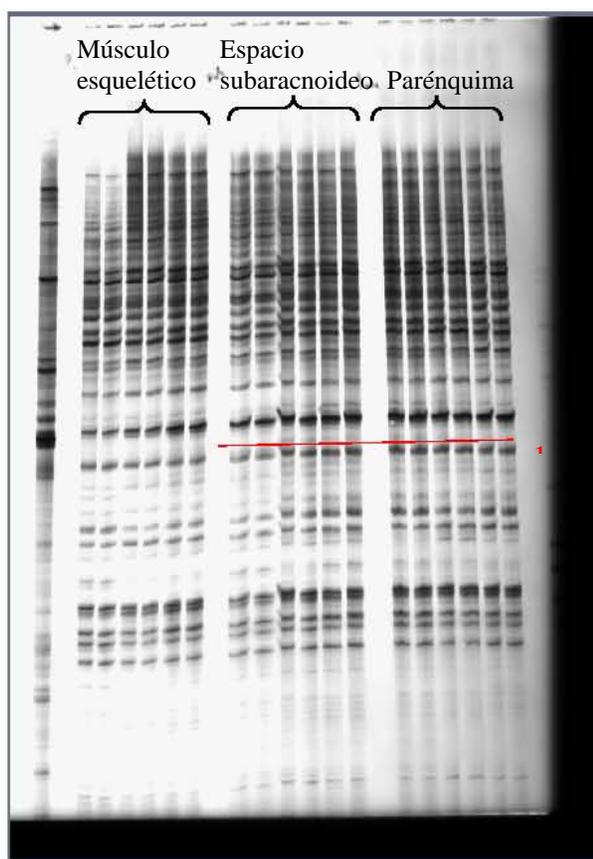


Fig. 8 Imagen del gel con el oligonucleótido núm 2

6.2.3. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 3 (P3)

Banda 17

De manera similar al primer 2 con el primer 3 sólo se obtuvo una banda diferencial para Sistema Nervioso Central, banda que se expresa en todos los cisticercos localizados en SNC. No es una banda clara.

Tabla 3. Número de bandas por cisticerco, D.O. por banda, bandas expresadas diferencialmente

| Muestra cisticerco | Región anatómica | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|----|----|-----------------------|------|----|------------|----|----|----|----|------|
| | Músculo esquelético | | | Espacio subaracnoideo | | | Parénquima | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | | | |
| Número total de bandas en cada cisticerco | 54 | 55 | 57 | 54 | 60 | 59 | 60 | 61 | 58 | | | |
| <i>Banda expresada Diferencialmente</i> | D.O. de cada banda | | | | | | | | | | | |
| 17 | | | | 25 | 33.5 | 32 | | | | 27 | 28 | 19.5 |

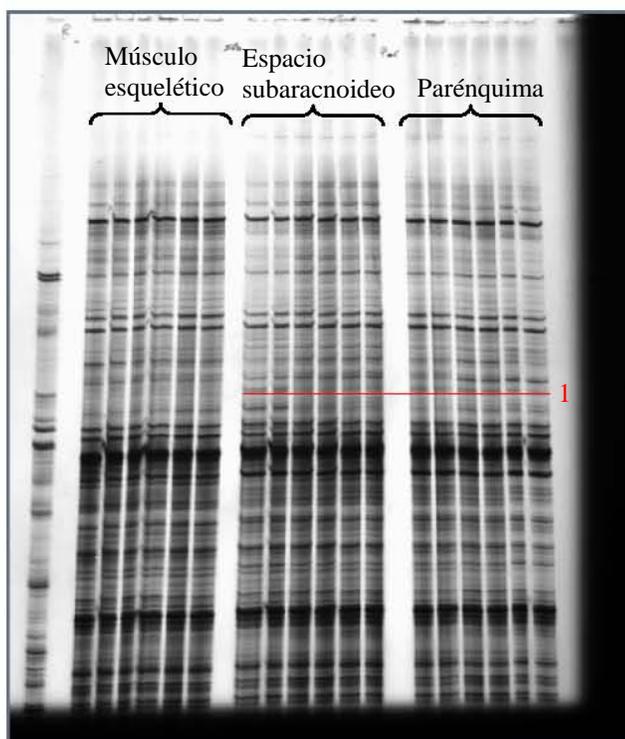


Fig. 9 Imagen del gel con el oligonucleótido 3

6.2.4. Productos de amplificación con la secuencia de oligonucleótidos 4 (P4)

Con el oligonucleótido 4 se obtuvieron 10 productos de amplificación, de los cuales cuatro fueron diferenciales para tejido de Sistema Nervioso Central, mientras que 5 fueron para músculo esquelético.

Banda 2

Es una banda con una expresión en todos los cisticercos del sistema nervioso central y tiene valores de expresión altos medidos por la densidad óptica de la banda. El cisticercos 2 de músculo esquelético también presenta expresión para esta banda, a pesar de esto se recomienda para ser extraída, secuenciada y clonada.

Banda 3

La banda 3 tiene valores de expresión bajos con respecto a los obtenidos con otras bandas del mismo gel, no es una banda clara y al igual que la banda de este mismo gel también el cisticercos 2 de músculo esquelético presenta expresión para esta banda.

Banda 6

La banda 6 se expresa sólo en tejido nervioso, en los cisticercos 2 y 3 de espacio subaracnoideo y en los tres cisticercos de parénquima, sus valores de expresión son bajos por lo que no se recomienda su uso posterior.

Banda 7

La banda es clara y bien definida pero sus valores de expresión son bajos, se expresa únicamente en los cisticercos de sistema nervioso central.

Banda 14

Esta banda se expresa en cisticercos de músculo esquelético cabe señalar que esta combinación de oligos fue la única que mostró bandas diferenciales para músculo esquelético. Se expresa en los tres cisticercos de músculo esquelético y en los cisticercos 2 y 3 de espacio subaracnoideo. Hay que mencionar que esta es la única banda de todas las obtenidas que presenta una expresión conjunta tanto en músculo esquelético como en tejido de sistema nervioso central. Aunque sus valores de expresión son altos no se recomienda para su uso posterior.

Banda 30

La 30 es de expresión única para el cisticerco 2 de espacio subaracnoideo. Su valor de densidad óptica es bajo.

Banda 34

La banda 34 es de expresión única para el cisticerco 3 de músculo esquelético su valor de densidad óptica es alto.

Banda 42

La banda 42 es exclusiva para músculo esquelético, expresándose en los cisticercos 2 y 3 de esta localización, se encuentran bien definidas por lo que su uso posterior está recomendado. Sus valores de densidad óptica son altos por lo que su expresión también es alta.

Banda 44

Al igual que la banda 42, la banda 44 se presenta en los 3 cisticercos de músculo esquelético sus valores de D.O. son los más altos siendo una banda muy bien definida lo que la hace un candidato idóneo para ser extraída y secuenciada. Además de que es la única banda diferencial para músculo esquelético que se expresa en los tres cisticercos.

Banda 60

A su vez la Banda 60 es única para el cisticerco 1 de músculo esquelético.

Tabla 4. Núm de bandas por cisticerco, D.O. de cada banda, bandas expresadas diferencialmente

| Muestra de cisticerco | Región anatómica | | | | | | | | |
|--|---------------------|-------|------|-----------------------|------|------|------------|------|------|
| | Músculo esquelético | | | Espacio subaracnoideo | | | Parénquima | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Número de bandas totales en cada cisticerco | 42 | 49 | 47.5 | 48 | 45.5 | 47 | 47.5 | 51 | 50 |
| <i>Bandas expresadas diferencialmente</i> | D.O. de cada banda | | | | | | | | |
| 2 | | 64 | | 39.5 | 49.5 | 59 | 63.5 | 52.5 | 47.5 |
| 3 | | 26 | | 10 | 27 | 18.4 | 19 | 18.5 | 32.5 |
| 6 | | | | | 39 | 41.4 | 36.5 | 24 | 25 |
| 7 | | | | 36.5 | 36 | 43 | 28 | 18.5 | 17 |
| 14 | 49.5 | 75.5 | 73.5 | | 42 | 66.5 | | | |
| 30 | | | | | 17.5 | | | | |
| 34 | | | 88.5 | | | | | | |
| 42 | | 89 | 91 | | | | | | |
| 44 | 83 | 102.5 | 92 | | | | | | |
| 46 | 60.5 | | | | | | | | |

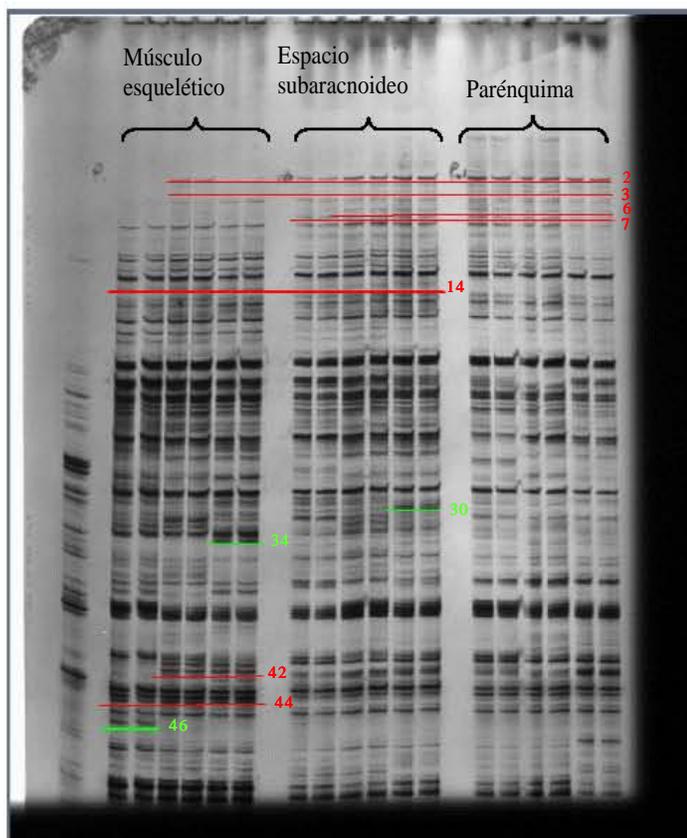


Fig. 10 Imagen del gel con el oligonucleótido 4

En la tabla 5 se resume el número de bandas diferenciales obtenidas utilizando un sólo primer de anclaje y 4 oligonucleótidos de amplificación, según la región anatómica en el cerdo de donde se extrajeron los cisticercos, así como el número total de productos diferenciales amplificados para cada localización.

Tabla 5. Número de bandas diferenciales totales por localización y por primer

| Región anatómica | Músculo esquelético | | | | Espacio subaracnoideo | | | | Parénquima | | | |
|---|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | <i>p1</i> | <i>p2</i> | <i>p3</i> | <i>p4</i> | <i>p1</i> | <i>p2</i> | <i>p3</i> | <i>p4</i> | <i>p1</i> | <i>p2</i> | <i>p3</i> | <i>p4</i> |
| Número de bandas diferenciales amplificadas por oligo | 0 | 0 | 0 | 5 | 8 | 1 | 1 | 6 | 9 | 1 | 1 | 4 |
| Total | 5 | | | | 16 | | | | 15 | | | |

Las bandas diferenciales expresadas en sistema nervioso central se presentan de manera conjunta tanto en espacio subaracnoideo como en parénquima cerebral. Mientras que las obtenidas para músculo esquelético a excepción de la banda 14 del oligo 4, son exclusivas para este tejido.

Con la finalidad de continuar este trabajo en estudios posteriores, y utilizar los productos de amplificación obtenidos en esta investigación, se seleccionaron para ser extraídas del gel, reamplificadas, clonadas y secuenciadas, 6 bandas de las cuales 4 fueron expresadas por cisticercos alojados en sistema nervioso central (bandas 12 y 22, del oligo num 1 y las bandas 2 y 7 del oligo 4) y dos fueron expresadas por cisticercos alojados en el músculo esquelético (bandas 42 y 44 amplificadas con el oligo 4).

7.- Discusión

La forma larvaria de *Taenia solium*, el cisticerco, puede alojarse en distintos tejidos del huésped intermediario, así en el cerdo se ha observado la presencia de cisticercos en casi todos los tejidos incluyendo, músculo esquelético, corazón, hígado, maseteros, lengua, y cerebro (Larralde *et al.*, 2006). En el ser humano, en cambio, la predilección del sitio donde se establece el parásito varía de acuerdo con las regiones geográficas. Así en países de África y Asia es frecuente encontrar casos conjuntos de localización del cisticerco en tejido extraneural (corazón, músculo esquelético y tejidos subcutáneo) así como en tejido neural (cerebro principalmente), mientras que en países de América latina, es muy poco frecuente o poco documentada la cisticercosis extraneural (Vega *et al.*, 2003). Esta heterogeneidad del parásito no sólo se refleja en su localización extraneural/neural, aún en el sistema nervioso central puede alojarse en distintos tejidos (parénquima, espacio subaracnoideo de la base o intraventriculares) con distintos grados de gravedad. A la fecha se desconocen aún los mecanismos a través de los cuales se dan estas diferencias en la localización y la gravedad en la cisticercosis, pero podrían estar asociados a factores del huésped, del parásito o de su interacción. Estudios previos en nuestro grupo de investigación mostraron que existe variabilidad genética en cisticercos procedentes de diferentes regiones geográficas y aunque en menor grado variaciones genéticas entre cisticercos procedentes de un mismo cerdo (Vega *et al.*, 2003). Así los cisticercos procedentes de cerdos infectados de Madagascar tuvieron una variabilidad genética cuando se compararon con cisticercos procedentes de cerdos de distintas regiones de la República Mexicana. Estas variaciones genéticas, sin embargo, no necesariamente señalan diferencias en expresión de los genes, ya que las diferencias genéticas podrían caer en regiones no codificantes. Las diferencias entre organismos podrían relacionarse con distintas capacidades patogénicas de los agentes infecciosos y en consecuencia con distintas formas de presentación de la enfermedad. En la cisticercosis humana, cuando el cisticerco se localiza en el sistema nervioso central, la presencia del parásito puede cursar de forma asintomática o bien presentar un espectro clínico de manifestaciones clínicas que van desde la forma benigna hasta las formas graves que pueden comprometer la vida de los pacientes.

Considerando las diferencias en la presentación de la enfermedad, evaluamos si variaciones genéticas entre cisticercos se asociaban en una localización preferencial del parásito dentro y fuera del sistema nervioso central. Así para un primer nivel de análisis, se colectaron cisticercos de un mismo cerdo procedentes de distintas regiones anatómicas: músculo esquelético, y de dos regiones distintas del cerebro: espacio subaracnoideo de la base y parénquima. La selección de estas regiones obedece en primer lugar a que la cisticercosis subcutánea es muy poco frecuente o poco documentada en México, comparado con lo que sucede en otros países de Asia y África. Una primera pregunta a resolver es si existen variaciones genéticas y/o de expresión diferencial de genes entre los cisticercos instalados en compartimentos fuera del sistema nervioso central con aquellos que se localizan en el compartimiento cerebral. Como se puede observar en la Figura 6 los cisticercos del músculo esquelético presentan un patrón de RAPDS idéntico con los cisticercos localizados en el cerebro por lo que la localización preferencial del cisticerco en ciertos tejidos del cerdo no parece depender de variaciones genéticas entre los parásitos. Tampoco se observaron variaciones genéticas entre los cisticercos localizados en el espacio subaracnoideo de la base y los localizados en el parénquima cerebral. Así estos resultados señalan que tampoco la localización del cisticerco en las dos localizaciones preferenciales en el sistema nervioso central depende de diferencias genéticas del parásito. Cabe señalar que los oligos utilizados en este estudio para RAPDS sí permitieron detectar variaciones genéticas entre cisticercos procedentes de cerdos de Madagascar y del centro y sudeste de México. Por lo que son secuencias que sí son capaces de identificar variaciones genéticas (Vega et al., 2003).

Se ha encontrado que la variabilidad genética puede, en otros parásitos, definir factores como virulencia, ciclo de vida, hospedero, resistencia a drogas entre otros, (Thompson *et al.*, 1996) pero en este caso al ser los parásitos genéticamente iguales, variaciones en su expresión de proteínas, capacidad patogénica o resistencia a drogas pudiera deberse a factores micro-ambientales propios del tejido más que a diferencias genéticas del parásito.

Aún cuando se trate de cisticercos genéticamente idénticos, la expresión de los genes puede variar dependiendo del ambiente al que se encuentren sujetos. Con base en esto, se evaluó si los genes de los cisticercos localizados en las tres regiones anatómicas estudiadas presentan expresión diferencial. En este primer análisis parcial, se utilizó un solo primer de anclaje (Oligo T), y 4 primers de amplificación. Esta combinación permite evaluar aproximadamente un 5% del total del RNA mensajero (Liang y Pardee, 1994). Si bien el porcentaje cubierto es bajo, nos permitió evaluar diferencias de expresión entre los cisticercos según el sitio en que se alojen. El número total de bandas expresadas diferencialmente fueron 21 que se repartieron entre las 3 distintas localizaciones, algunas de ellas fueron exclusivas para un sólo cisticerco en alguno de los tejidos. Se encontraron diversas bandas que pueden distinguir los cisticercos localizados en el cerebro y en el músculo esquelético, mientras que entre los cisticercos localizados en el cerebro en las dos localizaciones no se encontró ninguna banda que de expresión diferencial.

Con el primer 1 se obtuvieron 8 bandas de amplificación para cisticercos localizados en el espacio subaracnoideo y 9 para parénquima, mientras que con el primer 4 se obtuvieron 5 para espacio subaracnoideo y 4 para parénquima. Para músculo esquelético fueron tres las bandas de expresión diferencial que se obtuvieron esto se llevo a cabo con el oligo número 4, este fue el único que proporcionó diferencias en la expresión con respecto a tejido de sistema nervioso central. Estos resultados muestran que hay un claro incremento de expresión de mRNA en cisticercos localizados en el sistema nervioso central, así el ambiente que proporciona este tejido promueve la expresión de proteínas que no se expresan en sitios extraneurales. Resultados similares se han observado en otras enfermedades parasitarias como lo demuestra el estudio realizado por Lovegrove *et al.*, (2006) en un modelo experimental murino de malaria donde se analizó la expresión diferencial de genes del parásito a *Plasmodium berghei* través de microarreglos en órganos que son blanco del parásito y en dos cepas de ratones una de ellas susceptible (C57BL/6) a malaria cerebral y otra resistente (BALB/c). En este estudio se observó que la expresión de genes del parásito de la malaria esta influenciada por el background genético del hospedero y por el microambiente del tejido en el cual se aloja. Estos genes llevan a cabo funciones en vías energéticas, moléculas de señalización celular y genes que codifican para proteínas de

choque térmico, así se propuso que algunas de estas moléculas pueden constituir la respuesta del parásito a la defensa del hospedero. Adicionalmente, en este estudio se observó que en el pulmón (sitio donde el parásito realiza importantes vías del metabolismo y reproducción dentro del ratón) el parásito expresa un mayor número de genes específicos. En otro estudio realizado por Leifso *et al.*, (2006) utilizando también microarreglos en *Leishmania major* se observó que de acuerdo al estado en el ciclo de vida del parásito hay una expresión diferencial de genes que le permite adaptarse a las diferentes temperaturas y pH del medio, así cuando se encuentra en macrófagos (amastigotes) expresa genes que le permiten adaptarse a un pH ácido y temperaturas de 37°C, mientras que en el intestino del insecto (promastigotes) expresan genes que le permiten adaptarse a un pH más neutro pero a temperaturas menores.

Así la expresión diferencial encontrada en los cisticercos pudiera reflejar de forma similar estrategias del parásito para adaptarse en distintos tejidos del hospedero con diferentes potenciales inmunoinflamatorios.

La clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados diferencialmente entre tejidos neurales y extraneurales será de gran relevancia para la comprensión de la biología del parásito y de su relación con el huésped.

Cabe señalar que hubo bandas que fueron expresadas por un solo cisticerco de los tres que se obtuvieron de la misma localización, esto pudiera deberse a la relación hospedero – parásito que existe y a variaciones entre los cisticercos, independientemente de que se encuentren en el mismo tejido y sean genéticamente iguales, por ejemplo, el propio reloj biológico que cada organismo tiene, así por ejemplo los cisticercos aún cuando vengan de la misma infección pudieran ser algunos más vulnerables a la respuesta inmune que otros y esto provocar una expresión de proteínas diferentes, ya sea porque comiencen mecanismos de muerte por apoptosis o por otro mecanismo.

También se ha observado que en algunos casos los parásitos pueden estar asociados a procesos inflamatorios graves (Escobar *et al.*, 1985; Fleury *et al.*, 2004), lo que nos

ayudaría a explicar en parte por qué la expresión diferencial de genes en relación al tejido. Al respecto Aguilar – Rebolledo *et al.*, (2001) argumentan que la reacción inflamatoria difiere cuando el cisticerco se encuentra en parénquima o en espacio subaracnoideo o en sistema ventricular. En este caso nosotros encontramos que la expresión es muy similar entre los cisticercos de espacio subaracnoideo y parénquima pero es diferente con músculo esquelético, esto puede deberse a que la relación hospedero - parásito en cada tejido que presenta procesos inflamatorios y la expresión de proteínas del parásito puede diferir. Así por ejemplo se sabe que los cisticercos de *Taenia solium* expresan un conjunto complejo de antígenos de origen proteico, glicoproteico, y lipídico (Plancarte *et al.*, 1994; Prabhakaran *et al.*, 2004; López – Marín *et al.*, 2002 en Larralde *et al.*, 2006) y algunos de estos antígenos se cree le ayudan a sobrevivir durante periodos prolongados dentro de su hospedero gracias a la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Larralde *et al.*, 2006). La expresión diferencial de este tipo de moléculas inmunomoduladoras ayudaría a comprender la reacción inflamatoria alrededor un parásito localizado en el mismo tejido de otro que carece de reacción inflamatoria.

En *Taenia solium* hay algunas proteínas de esta naturaleza que podrían expresarse diferencialmente en los cisticercos dependiendo de su localización. Dentro de estas proteínas, destacan dos principalmente, la paramiosina que es una proteína que inhibe la reacción del complemento ya que se une a C1q que es una estructura cuaternaria con dominio amino – terminal, además de ser un subcomponente del complemento, esta unión trae consigo la inhibición del complemento el cual forma parte de la respuesta inmune humoral (Laclette, *et al.*, 1992) y la proteasa de cisteína que es un producto de secreción / excreción que disminuye la expresión de CD4 (Molinari *et al.*, 2000). Esta proteasa de cisteína secretada en los tejidos del hospedero puede modular la respuesta inmune humoral y celular, además que hidroliza muchas diferentes proteínas en el medio ambiente inmediato que rodea al parásito y modula también la nutrición del mismo y la patología Molinari *et al.*, (2000)

Cabe señalar que la cisticercosis cerebral del cerdo cursa de manera muy diferente a cómo evoluciona en el ser humano, ya que en el cerdo no es común encontrar cuadros graves de

neurocisticercosis (Larralde *et al.*, 2006). Es posible que la ausencia de sintomatología en el cerdo pudiera relacionarse con la ausencia de expresión diferencial entre los cisticercos localizados en el parénquima y en el espacio subaracnoideo de la base. Actualmente se ha comenzado a realizar un estudio de expresión diferencial de cisticercos procedentes de individuos con neurocisticercosis que por sus características clínicas y de evolución de la enfermedad ameriten de cirugía. Este estudio permitirá por una lado evaluar si en individuos con una sintomatología clara, si hay diferencias de expresión en los cisticercos localizados en los distintos compartimentos cerebrales. Y por otro lado permitirá evaluar si hay expresión diferencial entre los cisticercos localizados en cerebro de cerdos y de humanos

8.- CONCLUSIONES

- No se observó variabilidad genética en los cisticercos procedentes de un mismo cerdo con distinta localización anatómica utilizados en este trabajo a través de RAPDs.
- La expresión diferencial de genes observada en cisticercos de acuerdo a su localización anatómica en el cerdo, no se debe a la variabilidad genética del parásito ya que los cisticercos son genéticamente iguales.
- La expresión diferencial de genes en cisticercos procedentes de distintas localizaciones se debe a condiciones del microambiente específico de cada tejido.
- Los cisticercos localizados en el sistema nervioso central no mostraron diferencias en expresión con respecto a las dos localizaciones estudiadas.
- En el sistema nervioso central hay un mayor número de genes expresados de manera diferencial con respecto a los genes expresados en cisticercos localizados en el músculo esquelético.

9.- APENDICES

Apéndice 1

Estudios de expresión diferencial realizados en distintos organismos.

La técnica differential display ha sido utilizada en diversos organismos con distintos objetivos y para distintas aplicaciones, es por eso que se ha utilizado para fines médicos, ecológicos etc.

Colonia – Romano *et al.*, (1998) realizaron un estudio con el objetivo de identificar y caracterizar genes de *Histoplasma capsulatum* que estén involucrados en las etapas previas y durante el proceso de interacción e internalización por el macrófago. La técnica utilizada fue el Differential Display – PCR, y realizaron varias combinaciones de primers, con 13 primers arbitrarios combinados con tres primers de anclaje oligo H-dt₁₁M y los tiempos a los que se midió la expresión fueron : tiempo cero, 15 m y 1 h después de la infección. Sus resultados fueron que al menos 20 cDNAs aparecieron para ser expresados diferencialmente, los cuales fueron identificados, reamplificados y subclonados. De esas 20 bandas escogieron 5 que confirmaron inducción gen específica por medio de RNA slot blots, mientras que otra banda se confirmo por tener una expresión – baja, las clonas fueron : pHc12, pHc16, pHc2, Pys-1, pHc20 y pHc23. Ellos observaron que algunas de estas clonas tuvieron una mayor expresión durante la fase de infección incrementándose hasta tres veces con respecto al tiempo inicial, sólo una clona redujo su expresión con respecto al tiempo inicial y fue la pYs -1.

De las seis clonas sólo la pHc12 al ser comparada con una base de datos tuvo una homología 31%, 31% y 30% a nivel de nucleótidos con la p105KD de rata, y con la p100KD co-activador de proteínas humana y de *Caenorhabditis elegans* respectivamente. También la secuencia de aminoácidos de la clona revela la presencia de un marco de lectura con 48%, 48% y 43% de identidad o conservación a la región COOH – Terminal de las proteínas antes mencionadas respectivamente. Las demás clonas no tuvieron homología con ninguna secuencia de la base de datos a nivel de nucleótidos y de aminoácidos.

Gutiérrez *et al.*, (2001) por medio de la técnica Differential Display – PCR, estudiaron el patrón de expresión en el parásito de *Leishmania panamensis*, comparando la expresión en sus distintos estadios de vida los cuales son : promastigote el cual se desarrolla en el aparato digestivo de la mosca de la arena , mientras que el amastigote se desarrolla en los macrófagos de los vertebrados. Utilizaron un sólo primer de anclaje que fue dTCG y un conjunto de primers arbitrarios. El procedimiento que siguieron fue el mismo que se realiza para esta técnica una vez detectadas las bandas de interés, cortaron, reamplificaron, clonaron y secuenciaron las bandas. Ellos localizaron una clona a la cual nombraron C2 de 230 pb, y que eligieron para caracterización molecular, la expresión diferencial fue confirmada por RT – PCR. La búsqueda en la base de datos reveló una homología en sus secuencia del 97% con una proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) de *Leishmania donovani* y 66% con otra MAPK de *Trypanosoma brucei* a nivel de aminoácidos. La secuencia mostraba los típicos subdominios serina/treonina característicos de las proteínas quinasas de especies eucarióticas. Citando a Alberts *et al.*, (1995) concluyen que la fosforilación de proteínas controla pasos importantes de proliferación y diferenciación en organismos eucarióticos. En el mismo artículo mencionan que varias proteínas quinasas en tripanosomatideos han sido parcialmente o completamente identificadas ya sea por técnicas bioquímicas o genéticas (Boshart y Mottram 1997). También mencionan en el artículo que factores ambientales incluyendo stress o factores bioquímicos, pueden modular la actividad de las proteínas quinasas y este podría ser el caso en la diferenciación de *Leishmania*. Por otro lado mencionan que los parásitos están expuestos a moléculas del hospedero tales como inmunoglobulinas y factores de crecimiento y citando a Gomes *et al.*, (1998) mencionan que el factor de crecimiento tipo insulina IGF-I puede mediar la fosforilación en *L. mexicana* promastigotes y amastigotes mediante una vía de tipo- PKC.

Otro trabajo en el cual utilizaron DD-PCR fue el realizado por Bruchhaus, I. *et al.*, (2002) en la ameba *Entamoeba histolytica*, este organismo es un protozooario parásito que se transmite por la vía fecal-oral, normalmente es residente en el intestino y puede persistir por meses inclusive años como una parasitosis asintomática. Sin embargo ocasionalmente, el parásito penetra la mucosa intestinal e induce colitis o se disemina a otros órganos, como

el hígado, donde induce la formación de abscesos (Knobloch y Mannweiler, 1983; Wynants *et al.*, 1995). Los mecanismos por los cuales se dispara la invasión son desconocidas. Por eso ellos consideran que la invasión al hígado es acompañada por una respuesta la cual compromete la regulación de proteínas de la amiba y el conocer los mecanismos de esta respuesta puede ayudar a entender mejor la patogenicidad de la amiba.

En este trabajo utilizaron amibas de *E. Histolytica* provenientes de abscesos en hígado de cerdos los cuales fueron comparados con controles de *E. histolytica*. Para este trabajo utilizaron una combinación de tres primers de anclaje y 50 primers aleatorios lo que obtuvieron fue 55 bandas que estuvieron presentes o ausentes en el cDNA de abscesos derivados de la amiba. 42 de estas bandas fueron exitosamente clonadas y secuenciadas, el largo de estos fragmentos está entre los 80 y 300 pb. La comparación en una base de datos de la secuencia de estos fragmentos reveló que 29 corresponden a genes independientes de la amiba. Utilizando el Northern blot para confirmar la expresión diferencial, reveló que 9 de los 12 genes eran genes de secuencia ya conocida y de estos genes las proteínas para las que codifican son: proteínas ribosomales L37A y S30, enzima Ubiquitin-conjugada UbcC, proteína de unión- GTP RAB7D, ferredoxina 2, ciclofilina, histona 3, flavoproteína y grainina. Mientras que las tres secuencias restantes codifican para proteínas desconocidas.

Posteriormente estudiaron si los fragmentos expresados diferencialmente derivados de abscesos es resultado simplemente de una respuesta a stress o corresponden a genes específicos implicados en mecanismos de invasión y sobrevivencia, los 12 genes fueron hibridizados a RNA de trofozoitos de *E. histolytica* que estuvieron bajo condiciones de temperatura elevada. Los resultados fueron que comparados con un grupo control en condiciones de cultivo normal, ocho de los genes son sobre o bajo regulados al stress calórico, de los cuales 5 revelaron un perfil de expresión similar al encontrado en amibas derivadas de absceso. Interesantemente RNAs que corresponden a los genes para ferredoxina 2, ciclofilina y proteína ribosomal S30 son de baja expresión en células inducidas a calor pero aumentaron en trofozoitos derivados de abscesos. El papel de la ferredoxina 2 no está elucidado todavía en *E. histolytica*, mientras que el de las ciclofilinas

son necesarias para un apropiado plegamiento de las proteínas, y además se cree que juegan un papel importante en la regulación de la transcripción y diferenciación celular (Andreeva *et al.*, 1999) esto puede ser importante para la adaptación de las células a ambientes extraños tales como tejido inflamatorio de hígado. Otros cuatro genes revelaron una no regulación en stress calórico en comparación con cultivos normales, pero son regulados en amibas derivadas de abscesos, estos son los que codifican para la proteína ribosomal L37A y la proteína de unión a GTP, RAB7D, los cuales tuvieron una expresión incrementada, mientras que los dos restantes fueron de las secuencias que no mostraron similitud con la base de datos y su expresión fue decrecida. Para la proteína ribosomal L37A los autores especulan que pueden estar involucradas en modular o efectuar cambios en respuesta celular y patrones de crecimiento como parte de una vía de función extrarribosomal, mientras que la proteína RABD7, puede estar involucrada en un acelerado vaciamiento de vesículas y subsecuentemente liberación del contenido vesicular, lo cual se cree, contribuye a la patogenicidad de *E. histolytica*. Los autores concluyen de esta forma que los genes identificados y que son específicamente regulados en amibas derivadas de abscesos respaldan la aseveración de que la sobrevivencia de *E. histolytica* dentro del hígado requiere cambios sustanciales en aspectos básicos del metabolismo celular y es notable que la mayoría de los genes son asociados con respuesta a invasión del hígado.

Estudios de expresión diferencial en cestodos parásitos

El estudio del genoma y de la expresión diferencial de genes en parásitos con interés para los humanos, se hacen con fines a desarrollar un mayor conocimiento de los genes implicados en procesos como la patogenicidad del parásito, desarrollo de los diferentes estados del ciclo de vida, especificidad del hospedero, sensibilidad a drogas, tasas de desarrollo, dinámica de transmisión etc, con el fin de poder usarlos como candidatos para desarrollar una vacuna y/o nuevas drogas contra los distintos parásitos.

Existen pocos estudios de expresión diferencial de genes en cestodos, Zhang, W. et al., (2003) trabajaron con *Echinococcus granulosus* un cestodo que reside en el intestino de su hospedero definitivo el perro o los lobos. Este estudio se realizó comparando el nivel de

expresión de gusanos adultos inmaduros es decir que no eran todavía capaces de producir huevos contra gusanos adultos maduros capaces de producir huevos embrionados presentes en el útero. La técnica utilizada para lograr este objetivo fue la de Differential Display – PCR, para esto se utilizaron 3 primers de anclaje y 4 primers aleatorios, obteniendo 28 fragmentos de expresión diferencial entre los estadios los cuales fueron, clonados y secuenciados, después de que seis fragmentos de cDNA fueron determinados por Northern blot por ser específicos para los gusanos adultos maduros, confirmando con RT – PCR su especificidad para el estado adulto maduro. Lo que encontraron fue que los gusanos maduros contienen transcritos de RNAm asociados con la producción de huevos y el desarrollo. Ellos concluyen que el estudio de la expresión diferencial de genes de los distintos estados de vida de *E. granulosus* pueden proveer información nueva sobre la función de genes e identificar moléculas que pueden ser de valor en diagnóstico, o nuevos genes que pueden ser expresados como candidatos a vacunas.

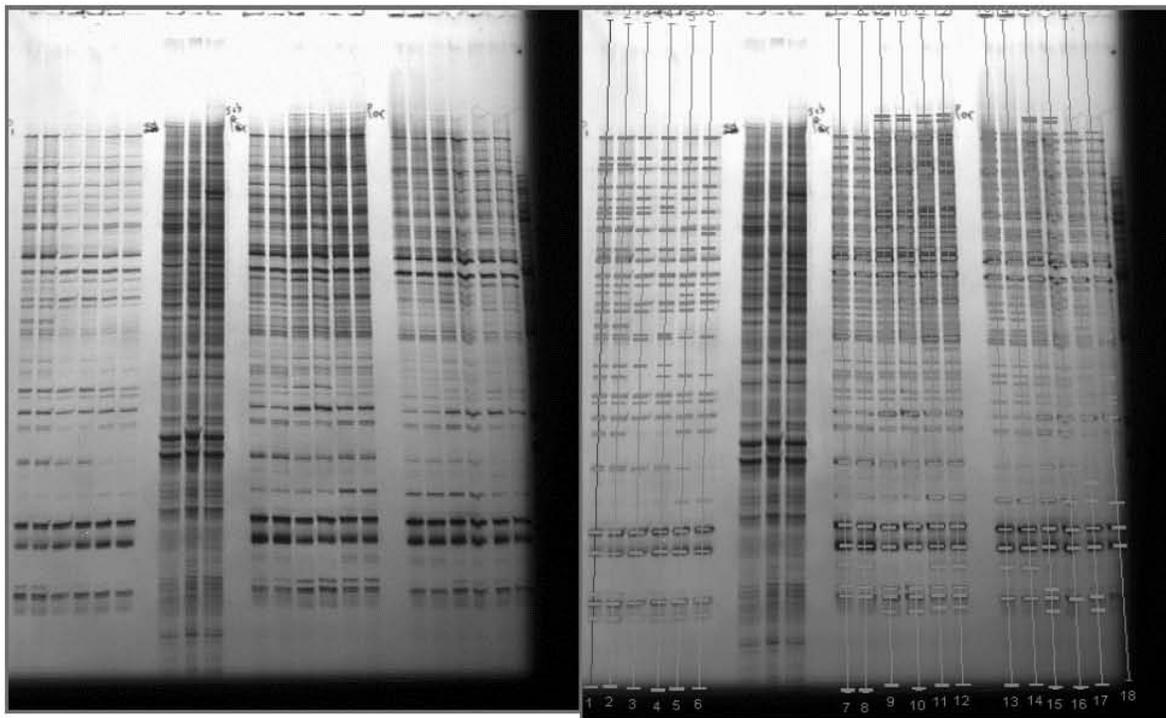
Otro estudio realizado fue el realizado por Liu. D., *et al.*, (2004) en *Spirometra erinaceieuropaei* un cestodo de carnívoros salvajes o domesticados el cual se encuentra comúnmente en Oriente y el sureste Asiático, en este parásito el hospedero intermediario de la larva llamada plerocercoides son usualmente anfibios y serpientes, mientras que el adulto habita en perros o gatos. La larva plerocercoides puede infectar al humano y alojarse en tejido subcutáneo, músculo y ojo causando la esparganosis. En este trabajo se comparó la expresión de genes entre el estadio larvario (plerocercoides) y el gusano adulto. La técnica utilizada fue Differential Display – PCR. En este trabajo los autores se enfocan a investigar la expresión diferencial de genes en el estado larvario versus el estado adulto. En su trabajo utilizan 4 tipos de primer de anclaje con dos bases en el extremo lo que deja una posibilidad de 8 combinaciones y un primer aleatorio de amplificación. Lo que obtuvieron fueron 11 bandas expresadas diferencialmente de tamaño que va desde 170 a 500 pb, después procedieron a cortar las bandas del gel y reamplificaron los fragmentos. Con las bandas que obtuvieron las utilizaron como sondas para un Northern blot lo que dio como resultado la identificación de tres bandas de distinto peso molecular. Posteriormente los fragmentos de cada uno de los 3 tipos de bandas fue secuenciado y obtuvieron productos del fragmento 1 de 238 pb y 66 aminoácidos y del fragmento 2 de 383 pb y 34 aminoácidos pero al

compararlo con el Genbank no encontraron ninguna homología con alguna secuencia reportada anteriormente estos dos fragmentos fueron expresados unicamente en el plerocercoides, el fragmento 3 tuvo una homología con muchos tipos de 28S rRNA y su tamaño es de 433 pb y se encontró tanto en plerocercoides como en el adulto.

Por otra parte en un estudio realizado en *Dipylidium caninum* realizado por Miranda *et al.*, (2004) en proglótidos de individuos adultos pero en distintos estados de desarrollo (inmaduros, maduros y grávidos), ellos utilizaron DD-PCR con una combinación de 10 primers aleatorios. Lo que encontraron fueron dos bandas de peso molecular de 230 pb en proglótidos grávidos y 390 pb en inmaduros expresadas diferencialmente. Posteriormente reamplificaron, clonaron y secuenciaron con éxito solamente una de las bandas (230 pb) y lo que obtuvieron fue una secuencia de 198 pb, que al ser comparada con el Genbank tuvo homología a la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa de *Ostrinia nubilalis*. Los autores no pueden decir si este gen sea específico del desarrollo pero es probable que no, sin embargo aseguran que este tipo de trabajo abre las puertas hacia el conocimiento del genoma y la consecuente aplicación de herramientas de biología molecular para el estudio de este parásito.

Otro estudio realizado en expresión diferencial de genes es el llevado a cabo por Reed., *et al.*, (1998) pero este trabajo fue realizado en *Fasciola hepática* ellos compararon mediante el Differential Display la expresión en el estado adulto y el inmaduro, los gusanos adultos fueron de 35 semanas después de la infección y el gusano inmaduro de 5 semanas después de la infección. Dependiendo de la combinación del primer utilizada y de la muestra de RNA en general se obtuvo un promedio de 71 bandas por reacción, de estas ellos seleccionaron ocho bandas las cuales fueron extraídas del gel, siete de estas corresponden a productos de PCR provenientes del estadio inmaduro, mientras que el otro corresponde a el estadio adulto.

Apéndice 2



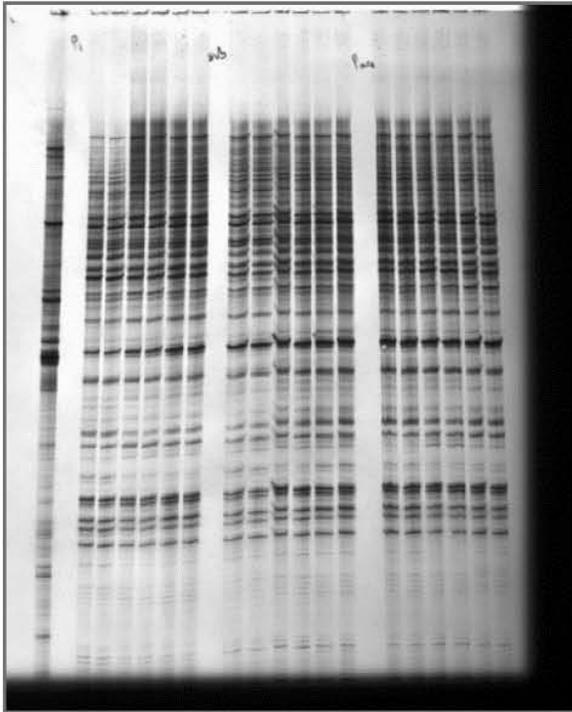
Gel 1 sin modificar

Patrón de bandas



Oligonucleótido 1

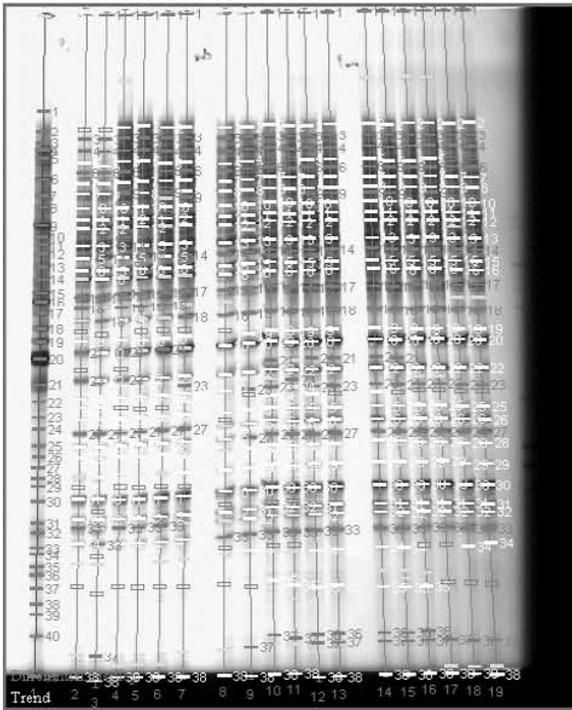
Análisis de los gels con el oligonucleótido 1



Análisis del gel con el oligonucleótido 2

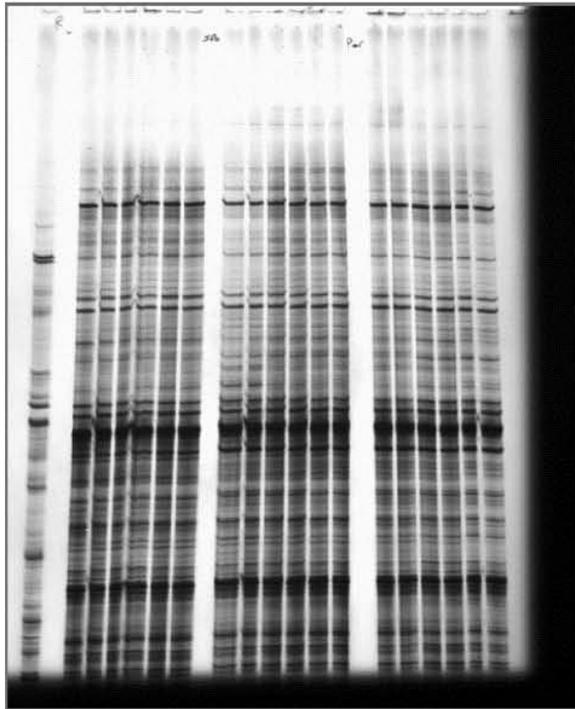


Gel 2 sin modificar

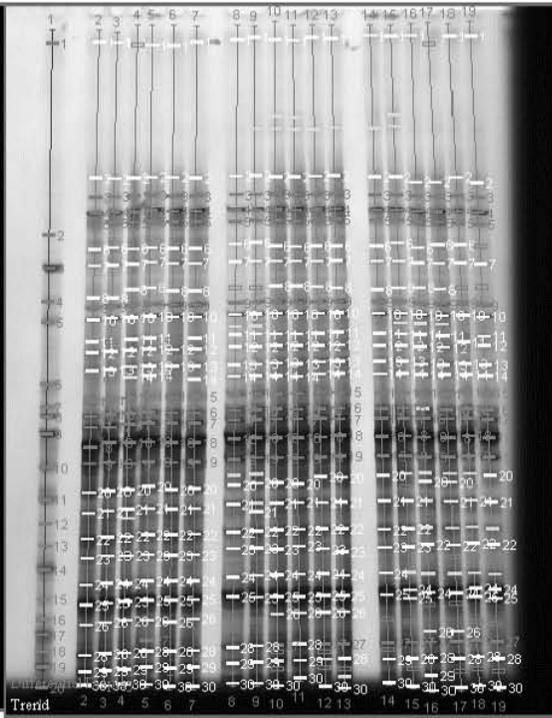


Análisis y Match con el oligonucleótido 2

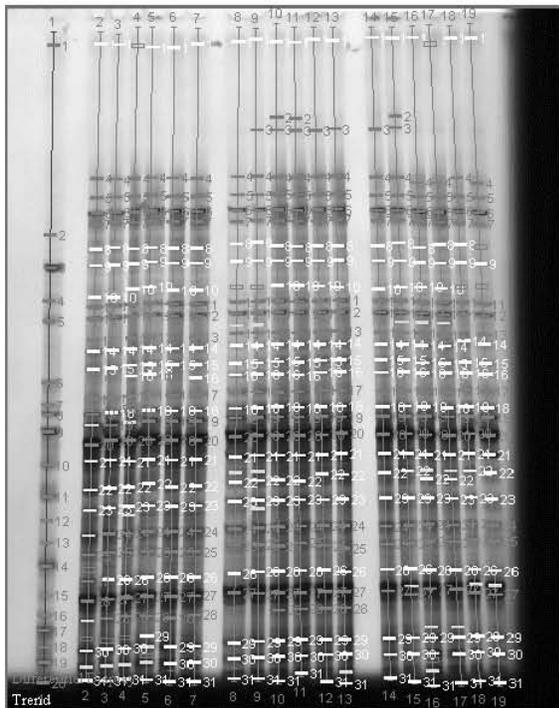
Oligonucleótido 2



Gel sin modificar oligonucleótido 3

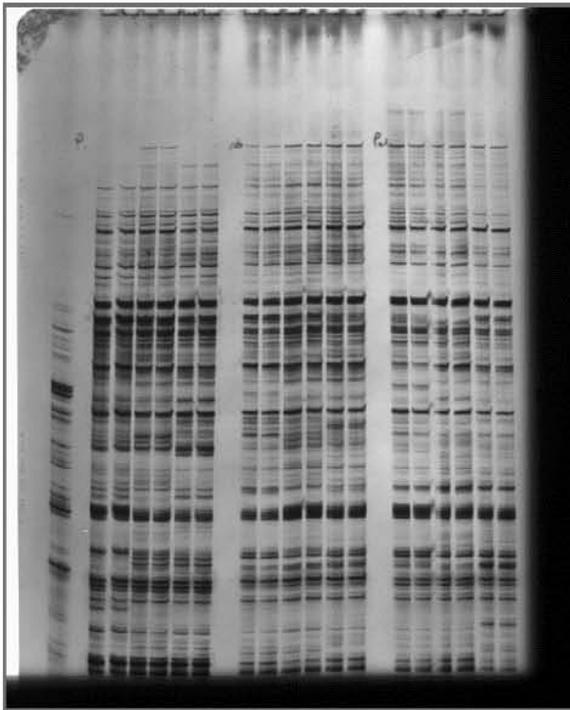


Análisis y Match

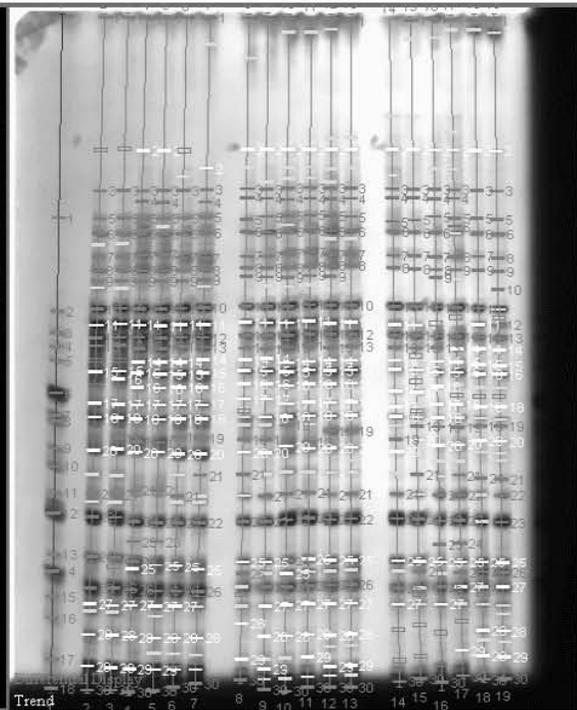


Análisis y match en Espacio subarcoideo

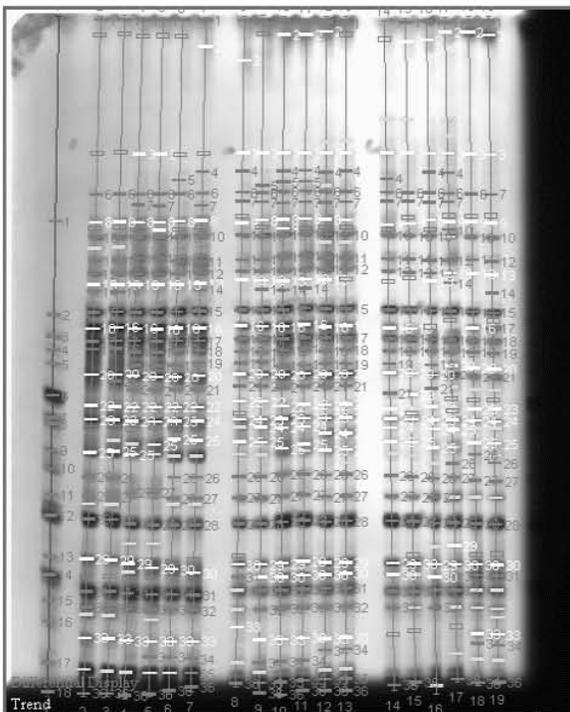
Oligonucleótido 3



Gel sin modificar



Análisis y Match en músculo esquelético



Análisis y Match en espacio subaracnoideo

Oligonucleótido 4

Apéndice 3

Random Amplified Polymorphic DNA

Esta técnica fue simultáneamente desarrollada por Williams y colaboradores (1990) y se denomina RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) y por Welsh y McClelland (1990) denominada como AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR), se basa en la aplicación de segmentos de DNA al azar utilizando oligonucleótidos simples y sencillos de secuencia nucleotídica arbitraria que demuestran polimorfismos por la presencia o la ausencia de un segmento de DNA amplificado (Black,1996). Entre sus ventajas se encuentra la de ser de bajo costo con respecto a otras técnicas utilizadas para identificar polimorfismos, además de que no requiere información previa del genoma del organismo a estudiar. Esta técnica se ha utilizado en ecología molecular para conocer la estructura poblacional de algunos, taxonomía molecular, y genética de poblaciones para determinar identidades taxonómicas, estimar la variabilidad intra e interespecífica, estimar relaciones de parentesco, analizar muestras genómicas mezcladas y para crear sondas específicas (Hadrys *et al.*, 1992).

Métodos utilizados para el análisis de la expresión diferencial de genes

En las dos décadas pasadas han sido desarrollados diversos métodos para el estudio de análisis comparativo en la expresión de genes entre células o tejidos. Los métodos más sencillos van desde el gel de electroforesis para comparar expresión de proteínas hasta métodos que se enfocan en el análisis de RNAm, estos han evolucionado y se han vuelto más sofisticados como resultado del advenimiento de tecnologías del DNA recombinante, secuenciación del DNA y tecnologías de PCR.

Liang y Pardee (2003) agrupan estas tecnologías en seis categorías las cuales son:

1).-Gel de electroforesis para proteínas.- En esta categoría se encuentran geles de 1 dimensión los cuales son utilizados para comparar células que se encuentran bajo ciertas

condiciones contra otras células con distintas características, en este grupo se encuentran incluidos también los geles en dos dimensiones los cuales separan las proteínas por tamaño y carga, lo que permite una visualización más completa de la expresión de proteínas celulares. Las desventajas de estos métodos es que es difícil recuperar cantidades suficientes de proteínas expresadas diferencialmente para que sean caracterizadas posteriormente. Robert Croy y Arthur Pardee (1983) en un estudio realizado en células cancerígenas argumentaron que este método no fue lo bastante sensible ya que sólo detectó 2,000 de los 10,000 o más proteínas diferentes que son expresadas en la célula.

2).- Hibridación diferencial.- Con el advenimiento de la tecnología de DNA recombinante el estudio de expresión diferencial de genes comparativo se disparó utilizando RNAm y DNA complementario. Uno de los primeros métodos fue la hibridación diferencial, esta consiste en que el par de muestras de RNAm se someten a una transcripción reversa y marcadas con un elemento radiactivo que podría ser ^{32}P , la transcripción reversa se realiza utilizando primers oligo - dt que anillan a la cola de poliadeninas que está presente en el extremo 3' terminal del RNAm en los eucariontes. El resultado son dos sondas de cDNA, las cuales pueden hibridar cuando son colocadas en una librería de cDNA. La comparación de los patrones de hibridación entre las sondas de RNAm permitirá la identificación de genes que son expresados únicamente en uno de los RNAm pero no en la otra.

3).- Hibridación substractiva.- En los principios de los años 80's Zimmerman et al., diseñaron un método denominado Hibridación Substractiva, que detecta sondas de cDNA que representan RNAm que son exclusivamente expresados en una célula pero no en otra. Este método remueve la mayoría del cDNA que representa los genes que son comúnmente expresados en las células que están siendo comparadas, dejando como cDNA de hebra sencilla los fragmentos que representan los genes expresados diferencialmente. Las sondas de cDNA son chequeadas por Northern blot para su confirmación.

4).- Differential Display.- Liang y Pardee en 1992 desarrollaron una técnica denominada Differential Display (DD- PCR). Este método puede ser aplicado en sistemas donde la

muestra biológica escasea o es poco el material con que se cuenta. Con este método se puede realizar una completa búsqueda de todos los genes expresados en una célula. El Differential Display fue desarrollado integrando dos de los más comunes, simples y poderosos métodos de la biología molecular, los cuales son el PCR y secuenciación de DNA por gel de electroforesis. En esencia el Differential Display trabaja sistemáticamente amplificando la región 3' terminal del RNAm eucarionte por transcripción reversa – PCR usando uno de tres primers de anclaje oligo – dt, posteriormente para la síntesis de la segunda hebra y la amplificación por PCR se utilizan primers aleatorios de secuencia corta generalmente decameros. Una de las principales ventajas del DD - PCR es su simplicidad técnica y su accesibilidad. A diferencia de los microarreglos no requiere de conocimiento previo del RNAm o secuencias de genes, lo que permite que sea un sistema abierto, aplicable a cualquier organismo eucariótico.

5).- Microarreglos.- Los microarreglos son basados en la estrategia de hibridación diferencial, en las cuales placas de cDNA

Differential Display – PCR

La elucidación de los cambios en la expresión de genes asociados con los procesos biológicos es un proceso central en una variedad de sistemas biológicos. El differential display ha demostrado ser una herramienta bastante útil para encontrar genes que se expresen diferencialmente en invertebrados así como en vertebrados, muchos investigadores han utilizado esta técnica exitosamente para identificar genes que son de importancia : en el desarrollo, mediar respuesta inmune y respuesta celular a distintos tipos de ambientes, en diferentes tipos de estadios y stress ambiental

El Differential Display es una técnica que compara patrones en la expresión a nivel de RNA mensajero con muestras provenientes de diferentes tipos o bajo condiciones biológicas diferentes (Liang y Pardee, 1992). La técnica produce fragmentos parciales de cDNA utilizando una combinación de transcripción reversa (RT). La transcripción reversa se realiza a través de un primer oligo-d(T) que consiste en 11 o 12 Ts más dos bases

adicionales 3' las cuales proveen especificidad (Liang et al., 1993). La amplificación se realiza por medio de PCR con primers aleatorios decameros oligodesoxinucleótidos de secuencia arbitraria y se amplifica por PCR.

El differential display posee algunas características son:

- 1) Su simplicidad para detectar genes expresados y no expresados.
- 2) Análisis de varias muestras en paralelo.
- 3) Identificación de raros y abundantes mensajeros.
- 4) La técnica requiere pequeñas cantidades de RNA y es rápida.

La elucidación de los cambios en la expresión de genes asociados con los procesos biológicos es un proceso central en una variedad de sistemas biológicos.

10.- BIBLIOGRAFÍA

Adreeva, L., Heads, R., y Green, C.J.(1999).Cs and their possible role in the stress response. Int. J. Exp. Pathol. Vol. 80 : 305-315 pp.

Aguilar – Rebolledo, F., Cedillo – Rivera, R., Llaguno – Violante, P., Torres – López, J., Muñoz – Hernández, O., y Enciso – Moreno, J.A.(2001). Interleukin Levels in Cerebrospinal Fluid From Children With Neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 64(1,2): 35-40

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., y Watson, J.(1995). Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., Garland Publishing, Inc., NY, 759 pp.

Alsam, S., Kim, K.S., Stins, M., Rivas, A.O., Sissons, J., Khan, N.A.(2003). Acanthamoeba interactions with human brain microvascular endothelial cells. Microb. Pathog. December; 35(6):235-241.

Andriantsimahavandy, A., Lesbordes, J.L., Rasoaharimalala, B., Peghini, M., Rabarijaona, L., Roux, J. Y Boisier, P.(1997). Neurocysticercosis: a major aetiological factor of late-onset epilepsy in Madagascar. Tropical Medicine and International Health. 2(8):741-746.

Arechavaleta, F., Molinari, J.L., y Tato, P. (1998). A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. Parasitol. Res.; 84(2):117-122.

Bern, C., García, H.H. Evans, C., GonzálezA.E., Verastegui, M., Tsang, V.C.W.(1999). Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. Curr. Infect. Dis. Vol.29 : 1203-1209 pp.

Black, W.C. IV. (1996). Statistical analysis of arbitrary primed PCR patterns in molecular taxonomical studies. En Clapp, J.P., Ed. 1996. Methods in molecular biology, species diagnostics protocols, PCR and other nucleic acids methods. Vol. 50. Human Press, USA.

Boshart, M., y Mottram, J.(1996). Protein phosphorylation and protein kinases in trypanosomatids. In G Hide, J, Mottram, G., Coombs, P., Holmes (eds), Trypanosomiasis and Leishmaniasis, CAB International, Wallingford, UK; 227-244 pp.

Botero, D., Tanowitz, H., Weis, L., y Wittner, M. 1993. Taeniasis and cisticercosis. Infect Dis Clin North Am, 7:683-697. En Cruz *et al.*, 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cisticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. Am J Trop Med hyg, 51(4):405-407.

Bowles, J., Mcmanus, D.P. (1994). Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans. Am. J. Trop. Med. Hyg., Jan;50(1):33-44.

Bruchhaus, I., Roeder, T., Lotter, H., Schwerdtfeger, M., y Tannich, E.(2002).Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. Molecular Microbiology, vol 44 (4) : 1063-1073 pp.

Bueno, E.C., Vaz, A.J., Machado., L.R., Livramento, J.A., Avila, S.L. y Ferreira, A.W. 2001. Antigen- specific supresión of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. Clin. Exp. Immunol., Nov; 126(2):304-310.

Carpio, A.(2002). Neurocysticercosis. The Lancet Infectious Diseases. 2:751-762.

Chavarria, A., Fleury, A., Bobes, R.I., Morales, J., Fragoso, G., y Sciutto, E.(2006). A depressed peripheral cellular immune response is related to symptom neurocysticercosis. Microbes Infect.; 8(4): 1082-1089 pp.

Chavarría, A., Fleury, A., García , E., Márquez, Carlos., Fragoso, G., y Sciutto, E. (2005). Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. Clinical Immunology, vol 116, (3), 271-278 pp.

Chavarría, A., Roger, B., G., Tapia, G., Fleury, A., Dumas, M., Dessein, A., Larralde, C., y Sciutto, E.(2003). TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* neurocysticercosis. *Microbes Infect.*; Oct.; 5(12):1109-1115 pp.

Colonna-Romano, S., Porta, A., Franco, A., Kobayashi, G.S. y Maresca, B.(1998). Identification and isolation by DDRT – PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophages infection. *Microbial Pathogenesis*, vol. 25; 55-66 pp.

Crosby, A.W.(1972). *The Columbian Exchange (Contributions in American Studies, num 2)*; Greenwood Press, Connecticut.

Cruz, I., Cruz, M.E., Teran, W., Schantz, P.Z., Schantz, P.M., Tsang, V.C., y Dumas, M.1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.

Cruz, M.E., Cruz, I., Schantz, P.M., y Dumas, M.(1995). Headache and cisticercosis in Ecuador, South America. *Headache J. Vol.35* : 93-97 pp.

Del Brutto, O.H., García, E., Talamas, O., y Sotelo J.(1988). Sex – related severity of inflammation in parenchymal brain cisticercosis. *Arch. Intern. Med.*; Mar;148(3):544-546 pp.

Del Bruto, O.H.(1998). Neurocysticercosis in children: clinical and radiological analysis and prognostics factors in 54 patients. *Rev. Neurol.*; Nov; 25(147): 1681-1684 pp.

Dixon, H.B.F., y Lipscomb, F.M. 1961. Cysticercosis , an analysis and follow up of 450 cases. *Med Res Coun Spec Rep Ser (Lond)*. 299:1-58 En Cruz *et al.*, 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.

Dumas, M., Grunitzky, K., Belo, M., Dabis, F., Deniau, M., Bouteille, B., Kassankogno, Y., Catanzano, G., y Alexandre, M.P. 1990. Cisticercosis and neurocysticercosis: epidemiological survey in north Togo. Bull Soc Pathol Exot, 83(2):263-274.

Eom, K.S. y Rim, H.J.(1993). Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp.n. Korean J Parasitol. Mar; 31(1):1-6

Escobar, A., Aruffo, C., Cruz-Sanchez, F., Cervos-Navarro.(1985).Neuropathologic findings in Neurocysticercosis. Arch Neurobiol, May-Jun; 48(3):151-6.

Evans, C.A., García, H.H., Hartnell, A., Gilman, r.h., Jose, P.J., Martinez, M., Remick, D.G., Williams, T.J., Friedland, J.S.(1998). Elevated concentrations of eotaxin and interleukin – s in human neurocysticercosis. Infect. Immun. Sep.; 66(9); 4522-4525 pp.

Fleury, A., Morales, J., Bobes, R.J., Dumas, M., Yanez, O., Pina, J., Carrillo-Mezo, R., Martínez, J.J., Fragoso, G., Dessein, A., Larralde, C., y Sciutto, E.(2006). En epidemiologic study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.; 100(6):551-8

Fleury, A., Dessein, A., Preux, P.M., Dumas, M., Tapia, G., Larralde, C., y Sciutto, E. (2004). Symptomatic human neurocysticercosis –age, sex and exposure factor relating with disease heterogeneity. J. Neurol. Jul;251(7):830-837 pp.

Fleury, A., Hernández, M., Fragoso, G., Parkhouse, R.M., Harrison, L.J. y Sciutto, E. (2003). Detection of secreted cysticercal antigen: a useful tool in the diagnosis of inflammatory neurocysticercosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Sep-Oct; 97(5):542-546 pp.

Flisser, A., Sarti, E., Lightowlers, M., y Schantz, P.(2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. Acta Tropica, vol. 87: 43-51 pp.

Flisser, A., Madrazo, I., y Delgado,(1997). Cisticercosis humana. Universidad Nacional Autónoma de México, ed. El Manual Moderno s.a de c.v., primera edición: 80 pp

Gomes, C.M., Monteiro, H.P., Gidlund, M., Corbett, C.E., Goto, H.(1998). Insuline-like growth factor – 1 induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *J. Eukaryot Microbiol.*, vol. 45: 352-355 pp.

Grewal, J.S., Kaur, S., Bhatti, G., Sawhney, T.M., Ganguly, N.K., Mahajan, R.C., y Malla, N.(2000). Cellular immune response in human neurocysticercosis. *Parasitol. Res. Ju*; 86(6):500-503 pp.

Gutiérrez, J.A., Puentes, F., Moreno, A., Elkin, M., y Murillo, L.A.(2001). Identificaction of a Differentially Expressed mRNA in Axenic *Leishmania panamensis* Amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Vol 96(6): 835-838 pp.

Hadrys, H., Balick, M. y Schierwater.(1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (Rapl) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1:55-63.

Hancock, K., Broughel, D.E., Moura, I.N.S., Khan, A., Pieniazek, N.J., Gonzalez, A.E., García, H.H., Gilman, R.H., Tsang, V.C.M. (2001). Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *International Journal for Parasitology*, vol 31 : 1601 – 1607 pp.

Harnett, W., Harnett, M.M.(2001). Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoprotein secreted by parasitic filarial nematodes. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1539 (1-2):7-15.

Hartl, D.L. y Clark, A.G. (1989). *Principles of Populations Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates. USA.

Knobloch, J., y Mannweiler, E.(1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 32: 727-732

Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. J. Immunol.; 148(1):124-8

Larralde, C., y De Aluja, S.A.(2006). Cisticercosis guía para profesionales de la salud. Fondo de Cultura Económica, Primera Edición; 252 pp.

Leifso, K., Cohen-Feue, G., Dogra, N., Murray, A., y McMaster, W.R.(2006). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. Molecular and Biochemical parasitology; 152(1):35-46.

Liang, P. y Pardee, A.B. (2003). Analysing differential gene expression in cancer. Nature Reviews Cancer. Vol 3; 869 –876 pp

Liang, P., y Pardee, A.B.(1994). Methods Mol. Gen. 5:3

Liang, P., y Pardee, A.B.(1992). Differential Display of eukariotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. Science; 257:967-971

Liu, D., Liu, J., Zhang, L., y Wang, X. (2004). Stage-specific expression genes of the *Spirometria erinaceieuropaei* plerocercoid scened by mRNA differential display technique. Chinese Medical Journal, vol 117 ,(3) : 366-370 pp.

López-Marín, L.M., Montrozier, H., Lemassu, A., García, E., Segura, E., y Daffe, M.(2002). Structure and antigenicity of the major glycolipid from *Taenia solium* cysticerci. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 119(1):33-42

Lovegrove, F.E., Peña-Castillo L., Mohammad, N., Conrad, W.L., Hughes, T. R., y Kain, K.C.(2006). Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria. *BMC Genomics*, 7:295.

Maravilla, P., Souza, V., Valera, A., Romero-Valdovinos, M., López-Vidal, Y., Domínguez-Aambrosio, S., y Flisser, A. (2003). Detection of Genetic variation in *Taenia solium*. *J. Parasitology*. 89(6): 1250-1254.

Masocha, W., Robertson, B., Rottenberg, M.E., Mhlanga, J., Sorokin, L., Kristensson, K.(2004). Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei* brucei penetration of the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.*; 114(5):689-694 pp.

McManus, D.P. (2006). Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitology International*, vol. 55 ; 31- 37 pp.

Medina, M.T., Rosas, E., Rubio-Donnadieu, F., y Sotelo, J.(1990). Neurocysticercosis as the main cause of late – onset epilepsy in Mexico. *Archives of Internal Medicine*; 150(2):325-327.

Miranda, R., Costa – Junior, L., Campos, A.K., Santos, H.A., y Rabelo, E. M. L. (2004). Identification of an Expressed Gene in *Dipylidium caninum*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* vol. 1026 : 195 – 198 pp.

Molinari, J.L., Mejia, H., White, A.C.Jr., Garrido, E., Borgonio, V.M., Baig, S., Tato, P. (2000). *Taenia solium* : a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp. Parasitol.* ; 94(3):133-42

Muller, R., Lillywhite-Bending, J.J. y Catford, J.C. 1987. Human cysticercosis and intestinal parasitism amongst the Ekari people of Irian Jaya. *J Trop Med Hyg*, 90:291-296.
En Cruz *et al.*, 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.

Nakao, M., Okamoto, M., Sako, Y., Yamasaki, H., Kakaya, K., e Ito, A. (2002). A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology*, Jun.; 124(6):657-662.

Okamoto, M., Nakao, M., Sako, Y., e Ito, A.(2001). Molecular variation of *Taenia solium* in the world. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 32(2):90-93 pp

Plancarte, A., Fexas, M., y Flisser, A.(1994). Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *International Journal of Parasitology*; 24(5):733-738

Pawlowski, Z., Allan, J., y Sarti, E. (2005). Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. *International Journal for Parasitology*. Vol 35, 1221-1232 pp.

Prabhakaran, V., Rajshekar, V., Murrell, K.D. y Oommen, A.(2004). *Taenia solium* metacestode glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* ; 98(8):478-484

Rabiela, M.T., Lombardo, L., y Flores, F.(1972).Cysticercosis cerebral. Estudio de 68 casos de autopsia. *Patología (Mex)*; 10:27-40

Rangel, R., Torres, B., Del Brutto, O.,y Sotelo, J.(1987).Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. *Am j. Trop. Med. Hyg. Mar*; 36(2): 387-392 pp.

Reed, M.B., Spithill, W.T., Strugnell, R.A. y Panaccio, M. (1998). *Fasciola hepatica*: Stage-Specific Expression of novel gene sequence as identified by Differential Display. *Experimental Parasitology*, vol. 89: 169 – 179 pp.

Restrepo, B.I., Aguilar, M.I., Melby, P.C., Teale, J.M.(2001). Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis : evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; Oct; 65(4):366-370 pp.

Restrepo, B.I., Llaguno, P., Sandoval, M.A., Enciso, J.A., y Teale, J.M.(1998). Análisis of immune lesions in neurocysticercosis patients : central nervous system response to helminth appears TH1-like instead of TH2. *J. Neuroimmunol.*, Aug 14; 89(1-2):64-72 pp.

Rodrigues v Jr., de Mello, F.A. Magalhaes, E.P., Ribeiro, S.B., Marquez, J.D.(2000). Interleukins-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* ; 33(9):1059-63

Rodríguez-Canul, R., Fraser, A., Allan, J.C., Domínguez-Alpizar, J.L., Argaez-Rodríguez, F., y Craig, P.S.(1999). Epidemiological study of *Taenia solium* tiasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* Vol. 93 : 57-67 pp.

Saenz, B., Ruíz – García, M., Jiménez, E., Hernández – Aguilar, J., Suastegui, R., Larralde, C., Sciutto, E., y Fleury, A.(2006). Neurocysticercosis : clinical, radiologic, and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr. Infect. Dis. J.* Sep; 25(9):801-803 pp.

Sanchez, A.L., Ljungstrom, I., Medina, M.T.(1999). Diagnosis of human neurocysticercosis in endemic countries: a clinical study in Honduras. *Parasitol. Int.*; 48(1):81-9

Schantz, P.M., E. Sarti, A. Plancarte, M. Wilson, J.L. Criales, J. Roberts y A. Flisser.(1994). Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium* : comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clinical Infectious Diseases*. 18(6):879-885 pp.

Sciutto, E., Fragoso, G., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Rosas-Salgado, G., Hernández-González, M., Herrera-Estrella, L., Cabrera-ponce, J., López-Casillas, F., González-Bonilla, C., Santiago-Machuca, a., Ruíz-Pérez, F., Sánchez, J., Goldbaum, F., Aluja, A., y Larralde, C.(2002). New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Med. Res.*; 33(4):371-378 pp.

Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L y Larralde, C.(2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of a global dimensions. *Microbes and infection* : 1875-1890 pp.

Singh, G.(1997). Neurocysticercosis in South-Central America and the Indian subcontinent, a comparative evaluation. *arq Neuropsiquiatr*,55(3-A):349-356.

Sotelo, J., y Jung, H.(1998). Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin. Pharmacokinet.*, Jun.;34(6):503-515.

Sotelo, J., y Del Bruto, O.H.(2000). Brain cisticercosis. *Arch. Med. Res.* Jan-Feb; 31(1):3-14 pp.

Thompson, R.C.A. y McManus, D.P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology*, vol. 18, No. 10, Oct. : 452-457 pp.

Thompson, Rc: Lymbery, A.J.(1996). Genetic variability in parasites and host – parasite interactions. *Parasitology*; 112 Suppl:s 7-22.Review.

Thompson, R.C.A. y Meloni, B.P. (1993). Molecular variation in *Giardia* and its implications. *Acta Tropica* 53, 167- 84 pp.

Vega, R. (2002). Variabilidad genética entre cisticercos de *Taenia solium* de México y Madagascar por medio de Random Amplified Polymorphic DNA. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, D.F., 1-104 pp.

Vega, R., Piñero, D., Ramanankandrasana, B., Dumas, M., Bouteille, B., Fleury, A., Sciutto, E., Larralde, C., y fragoso, G.(2003). Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int. J. Parasitol.*:Nov:33(13):1479-1485 pp.

Villagrán, J., y Olvera, J.E.(1988). Cisticercosis humana: Estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia. *Patología*; 26:149-156

Welsh, J. y McClelland. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18(24):7213-7218.

Williams, J.G.K. , Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.

Wynants, H., Van den Ende, J., Randaria, J., Van Gompel, A., Van den Enden, E., Brands, C.(1995). Diagnosis of amoebic infection of the liver: report of 36 cases. *Ann Soc Belg Med Trop*. 75: 297-303

Yamasaki, H., Matsunaga, S., Yamamura, K., Chang, C., Kawamura, S., Yako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., y Ito, A. (2004). Solitary Neurocysticercosis Case Caused by Asian Genotype of *Taenia solium* Confirmed by Mitochondrial DNA Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, (8) : 3891 – 3893 pp.

Yinkun, F., Shan, O., Xiuzhen, Z., y, Shilian, Y. 1979. Clinicoelectroencephalographic studies of cerebral cysticercosis, 158 cases. Chin Med J, 92:770-786. En Cruz *et al.*, 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. Am J Trop Med Hyg, 51(4):405-407.

Zhang, W., Li, J., You, H., Zhang, Z., Turosn, G., Loukas, A., y Mcmanus, D. P. (2003). A gene family from *Echinococcus granulosus* differentially expressed in mature adult worms. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol. 126 : 25-33 pp

Zimmerman, C.R., Orr, W.C., Leclerc, R.F., Barnard, E.C., y Timberlake, W.E.(1980).Cell; 21:709-715