



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ADN  
COMPLEMENTARIO (cDNA) DE LA LACTATO  
DESHIDROGENASA DE *Taenia solium***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**VIRIDIANA SENG IGLESIAS**

**T U T O R A :**

**DRA. LUCÍA JIMÉNEZ GARCÍA**



FACULTAD DE CIENCIAS

UNAM

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### DATOS DEL ALUMNO:

APELLIDO PATERNO: Seng  
APELLIDO MATERNO: Iglesias  
NOMBRE: Viridiana  
TELÉFONO: 56567983  
UNIVERSIDAD: Universidad Nacional Autónoma de México  
FACULTAD: Facultad de Ciencias  
CARRERA: Biología  
NO. DE CUENTA: 30074470-9

### ASESORA:

Dra. Lucía Jiménez García

### JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dr.	<u>Guillermo Salgado Maldonado</u>
VOCAL:	Dr.	<u>Luis Felipe Jiménez García</u>
SECRETARIO:	Dra.	<u>Lucía Jiménez García</u>
1er. SUPLENTE:	M. en C.	<u>José Luis Silencio Barrita</u>
2DO. SUPLENTE:	Biol.	<u>Alejandro Ruíz Martínez</u>

### DATOS DEL TRABAJO ESCRITO:

TÍTULO: Clonación y caracterización del ADN complementario (cDNA) de la Lactato deshidrogenasa de *Taenia solium*

NO. DE PÁGINAS 56p

AÑO: 2009

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio de  
Biología Molecular de *Taenia solium*, Facultad de Medicina, UNAM

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lucía Jiménez García.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 80134 que corresponde al proyecto “Desarrollo de fármacos biológicos contra la *Taenia solium*” y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN206708-3 “Utilización de enzimas glicolíticas en el control de cisticercosis”.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Lucía Jiménez García y al Dr. Abraham Landa Piedra por brindarme sus conocimientos, por las asesorías, supervisión y enseñanzas que contribuyeron a mi formación académica y al desarrollo de este proyecto.

A mis profesores por haberme inculcado el amor a la ciencia y al conocimiento, por enseñarme a dudar, a investigar y a desarrollar el inherente deseo de seguir aprendiendo.

A los miembros del jurado:

Dr. Guillermo Salgado Maldonado  
Dr. Luis Felipe Jiménez García  
M. en C. José Luis Silencio Barrita  
M. en C. Alejandro Ruíz Martínez

...gracias por sus palabras de ánimo, por sus valiosas correcciones y consejos.

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias por proveerme de un lugar para estudiar, convivir, descansar y recrearme; por convertirse en mi segundo hogar.

## DEDICATORIAS

A mis padres por haber sido mis guías, mis mentores, mis amigos, y porque gracias a ellos he podido llegar a donde estoy; es a ellos a quien les debo y les dedico todos mis logros; no tengo palabras suficientes para expresar cuan agradecida estoy por sus palabras, por sus regaños, por brindarme todo lo que necesito y más, pero sobre todo por su amor y su paciencia. A mi hermanito porque siempre has estado a mi lado, tanto para bien como para mal, gracias por todos esos momentos y recuerdos, y sobre todo por ser alguien tan especial en mi vida.

A mi tía, gracias por tu apoyo, tu cariño y por ayudarme a lograr mis metas.  
A mi abuela quien siempre me ha brindado tanto amor y cariño, gracias.

A Aramis, mi amigo, mi confidente, mi ángel guardián, gracias y mil veces gracias, porque sin ti no podría haber llegado hasta donde estoy, gracias por todos esos momentos y memorias vividas, por haber estado conmigo compartiendo mis alegrías y mis tristezas, por tus consejos, por tus regaños y por esos oportunos zapes cuando los he requerido, por las locuras y por las experiencias que nos faltan por vivir.

A Helga, PasQ, Serapii, Ari, Tona, Nemo, Gal, Meny, D, Guermer, Wally, Alfredo, Chisus, Nayivi, Lalo, Ray, Marina, Zac... y todas las demás personas que forman parte importante de mi vida, porque a pesar de todo este tiempo, ¡siguen aquí a mi lado! Gracias por los valiosos recuerdos y experiencias acumuladas, las fiestas, las risas, los consejos, las críticas y las buenas charlas, por soportarme en mis loqueras y tonterías, pero sobre todo: por su paciencia, cariño y apoyo.

A Roberto, gracias por haber estado a mi lado, por tantos recuerdos, tantas vivencias y experiencias, por haber hecho más sencillo y agradable mi camino, siempre te estaré agradecida por todo el apoyo y el amor brindado.

A mis compañeros y ahora amigos en el laboratorio: Alice, Anayetzin, Chimis, Daniel, Felipe, José, Oscar, Omar, Richie y Vic, por sus consejos y por hacer de este lugar un espacio ameno y agradable para trabajar.

Y por supuesto al Dr. Abraham Landa y a la Dra. Lucía Jiménez por haberme apoyado a lo largo de lo que fue el desarrollo de este trabajo y por proporcionar un ambiente de amistad, respeto y tolerancia en el laboratorio.

...y todos aquellos que de una u otra forma hicieron posible la confección y elaboración de este trabajo.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>2</b>
1.1. <i>Taenia solium</i> .....	2
1.2. Ciclo de vida .....	3
1.3. Epidemiología .....	4
1.4. Cuadro clínico y diagnóstico .....	5
1.4.1. Taeniosis .....	5
1.4.2. Cisticercosis humana .....	5
1.4.3. Neurocisticercosis humana .....	6
1.5. Tratamiento / Fármacos antihelmínticos .....	7
1.6. Conclusiones sobre la taeniosis y la cisticercosis .....	8
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>10</b>
2.1. Metabolismo energético de helmintos .....	10
2.1.1. Glucólisis .....	10
2.1.2. Dismutación del malato .....	11
2.2. Metabolismo de <i>T. solium</i> .....	12
2.3. Lactato deshidrogenasa .....	14
2.3.1. Catálisis .....	16
<b>III. Justificación</b> .....	<b>18</b>
<b>IV. Objetivos</b> .....	<b>19</b>
4.1. Objetivo general .....	19
4.2. Objetivos particulares .....	19
<b>V. Materiales y métodos</b> .....	<b>20</b>
5.1. Materiales .....	20
5.1.1 Material biológico .....	20
5.1.2 Reactivos .....	20
5.2. Métodos .....	21
5.2.1. Extracción de ARN total .....	21

5.2.2. Obtención de la sonda .....	21
5.2.3. Preparación pequeña de ADN plasmídico (miniprep) .	22
5.2.4. Marcaje radioactivo .....	23
5.2.5. Aislamiento de clonas (tamizajes) .....	23
5.2.6. Transformación fago a plásmido .....	24
5.2.7. Preparación grande de ADN plasmídico (largeprep) .	25
5.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	25
5.2.9. Análisis de restricción .....	25
5.2.10. Secuenciación .....	26
5.2.11. Análisis tipo Southern Blot .....	26
<b>VI. Resultados</b> .....	<b>28</b>
<b>VII. Discusión</b> .....	<b>35</b>
<b>VIII. Conclusiones</b> .....	<b>39</b>
<b>IX. Anexo</b> .....	<b>40</b>
<b>X. Literatura citada</b> .....	<b>41</b>

## Abreviaturas

2X	Dos veces la concentración
10X	Diez veces la concentración
20X	Veinte veces la concentración
°C	Grados Celsius
A	Adenina
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
C	Citosina
cm	Centímetros
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
G	Guanina
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
hr	Horas
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Molar
MDH	Malato deshidrogenasa
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotido
NC	Neuricisticercosis
ng	Nanogramos

Pb	Pares de bases
PEP	Fosfoenolpiruvato
pl	Punto isoeléctrico
RA	Resistencia a antihelmínticos
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Timina
uCi	Micro Curies
uL	Microlitros
uM	Micromolar
um	Micrometros

## RESUMEN

La taeniosis y cisticercosis por *Taenia solium* son un problema de salud pública tanto en México como en otros países en vías de desarrollo. La cisticercosis provocada por el estadio larval de este parásito es una enfermedad que provoca severos problemas de salud, en especial cuando el cisticerco se aloja en el sistema nervioso central (SNC); además la neurocisticercosis también se relaciona con problemas de tipo económico y social. Por otro lado, a pesar que la taeniosis no es considerada un padecimiento grave debido a la sintomatología leve con que se presenta la enfermedad, los individuos portadores del parásito constituyen un riesgo para la adquisición de la cisticercosis y la culminación del ciclo del parásito. A pesar de los esfuerzos que se han hecho en cuestiones de educación, vacunación e investigación, la enfermedad aun prevalece, por lo que se siguen buscando formas de romper el ciclo de vida del parásito y así erradicar la enfermedad y los problemas que conlleva.

La lactato deshidrogenasa es una enzima que participa en el metabolismo energético del parásito, encargada de la conversión del piruvato proveniente de la glucólisis a lactato, así como de la reacción inversa. Dado que el céstodo depende principalmente de esta vía para la obtención de su energía, la inhibición de la misma llevaría a la muerte del parásito.

En el presente trabajo se logró aislar y caracterizar el ADNc que codifica para la lactato deshidrogenasa de *T. solium*. La secuencia muestra un marco de lectura de 1189pb que codifica para una proteína de 355 aminoácidos. Se identificaron los sitios clásicos de inicio y término de la secuencia, así como el sitio clásico de poliadenilación. Asimismo se identificaron varios residuos relacionados con el sitio de unión al sustrato, del sitio de unión a la coenzima y de la interfase del tetrámero. Al comparar la secuencia con aquellas de otros organismos se encontraron altos porcentajes de identidad con las mismas.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Taenia solium*

La taeniosis y la cisticercosis humana, son enfermedades causadas por los distintos estadios del helminto *Taenia solium*. La taeniosis es la infección producida por el estadio adulto del parásito y se da cuando el ser humano ingiere carne de cerdo infectada con cisticercos; no es considerada una parasitosis grave ya que suele ser asintomática o de síntomas leves. En contraste, el estadio larvario de éste organismo es el causante de la cisticercosis en humanos y cerdos, cuya infección se da por la ingestión accidental de los huevos del parásito en alimentos contaminados (frutas, verduras o agua), o bien, vía ano-mano-boca (autoinfección), siendo un problema de salud pública en México y otros países en vías de desarrollo. El cisticerco suele alojarse en el sistema nervioso central (SNC) y puede desarrollar una sintomatología más severa: dolores de cabeza, convulsiones, cuadros de epilepsia, hidrocefalia, demencia y hasta la muerte (Carpio, 2002; Meza-Lucas *et al.*, 2002; Flisser, 2004; Willms *et al.*, 2006).



Figura 1- Micrografía electrónica del escólex del parásito adulto *Taenia solium*. Se observa la doble hilera de ganchos, así como sus ventosas con las que se adhiere a la mucosa intestinal. Tomada de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/cyt/img/02.jpg>

## 1.2. Ciclo de vida de *Taenia solium* (Linnaeus, 1758)

*Taenia solium* en su estadio adulto es un gusano plano de color blanquecino, que mide de dos a cuatro metros, vive anclado en el intestino delgado del hombre, su hospedero definitivo, por medio de un escólex formado por cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos (Fig. 1). El estróbilo o cuerpo del gusano crece a partir del cuello del parásito y está conformado por una serie de segmentos llamados proglótidos, los proglótidos inmaduros son los más cercanos al cuello, le siguen los proglótidos maduros que presentan órganos sexuales diferenciados y luego los grávidos que se encuentran hacia la parte distal del organismo. Cada proglótido grávido contiene alrededor de 50,000 huevos; estos proglótidos generalmente se desprenden en cadenas cortas y son eliminadas en las heces del portador.

Los huevos son esféricos y miden de 30-45um, están conformados por una serie de membranas que cubren al embrióforo (cubierta que protege a la oncósfera o embrión). Este embrión presenta tres pares de ganchos por lo que es denominado embrión hexacanto. Estos huevos son generalmente ingeridos por el cerdo, que debido a sus hábitos coprófagos actúa como hospedero intermediario natural; una vez en el tubo digestivo el embrióforo se disgrega y los embriones son activados por acción de las enzimas y sales biliares del hospedero, se fijan en el intestino para liberar enzimas proteolíticas que les ayudan a atravesar la pared intestinal, para así, por medio de los capilares sanguíneos y linfáticos lograr distribuirse a músculos y distintos órganos, donde continúan su desarrollo hasta convertirse en cisticercos. Los cisticercos son vesículas semitransparentes llenas de líquido que miden de 1-2cm con un escólex invaginado.

El ciclo se completa cuando el humano ingiere cisticercos viables a partir de carne de cerdo cruda o mal cocida, entonces el escólex por acción enzimática y biliar evagina y se ancla a la pared intestinal con sus ganchos y ventosas, donde empieza a desarrollarse a parásito adulto. El humano también puede infectarse por la ingestión de huevos del parásito provenientes de un individuo con taeniosis,

dando lugar a la cisticercosis/neurocisticercosis humana (NC) (Carpio, 2002; Meza-Lucas *et al.*, 2002; García *et al.*, 2003; Flisser *et al.*, 2006a; Willms *et al.*, 2006) (Fig. 2).

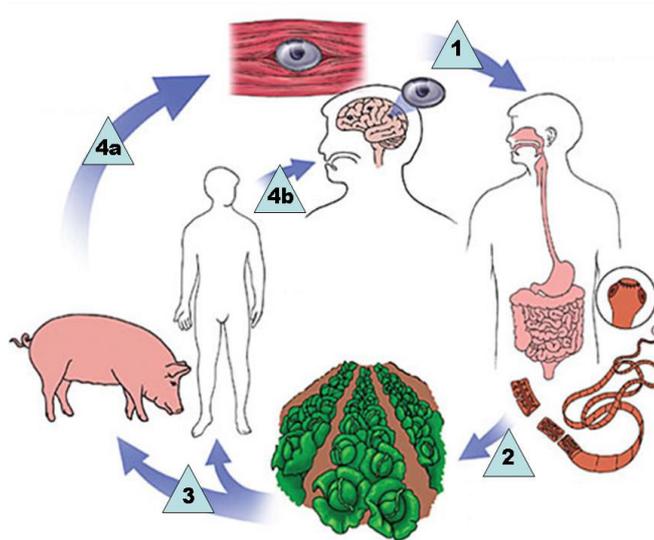


Figura 2- Ciclo de vida de *Taenia solium*. (1) Al ingerir carne contaminada mal cocida con cisticercos, el ser humano se infecta y desarrolla el gusano adulto. (2) Los proglótidos o huevos pasan al entorno por medio de las heces del portador. (3) Los cerdos o humanos ingieren los huevos en agua o alimentos contaminados, o bien por autoinfección. Los cisticercos se desarrollan en tejido muscular del cerdo (4a), o en distintos tejidos del ser humano, tales como el cerebro (4b), ojo o músculo esquelético. Tomada y modificada de:

<http://www.aafp.org/afp/20070701/afp20070701p92-f1.jpg>

### 1.3. Epidemiología

Este parásito se encuentra distribuido en Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú, India, China, Nueva Guinea, África del Sur, África Occidental, Madagascar y Zimbabwe, y por la inmigración y el turismo se ha dispersado a Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Kuwait, Portugal, España y Australia. En aquellos países donde la enfermedad prevalece, el 70% de los pacientes presentan epilepsia, síntoma asociado a la NC (Flisser *et al.*, 2006b). Tanto en México como en otros países se carece de datos estadísticos reales para la

población humana y porcina afectada, ya que a pesar que existen los métodos para realizar un diagnóstico adecuado, otros factores tales como la infraestructura, factores sociales y económicos impiden un censo completo y fiable para toda la población, de manera que solo existen valores estimados que provienen de estudios epidemiológicos, hospitalarios y necropsias documentadas en algunas zonas del país (Sarti, 1997).

#### 1.4. Cuadro clínico y diagnóstico

##### 1.4.1. Taeniosis

La taeniosis es una enfermedad básicamente asintomática y, en caso de presentarse síntomas, estos consisten principalmente en malestar abdominal, flatulencia, pérdida de peso y otras afecciones gastrointestinales poco severas, por lo mismo, las personas infectadas no suelen buscar asistencia médica, sin embargo la identificación del adulto de *Taenia solium* es importante debido al riesgo que existe de que los portadores propaguen la infección **causando la** cisticercosis a humanos y cerdos. El principal método de identificación de la taeniosis es la coproparasitoscopia, que consiste en el análisis de las heces del paciente por observación directa o con ayuda de un microscopio en busca de huevos o proglótidos del parásito; son técnicas baratas y simples, sin embargo carecen de sensibilidad y especificidad y se necesita de personas con experiencia. Por lo mismo, se ha desarrollado un ensayo en el que se detectan por ELISA coproantígenos del gusano adulto, éste es un método más preciso y sensible que detecta antígenos de la tenia en muestras fecales, demostrando así la presencia del parásito sin especificar la especie. Recientemente se han descrito distintos ensayos basados en ADN para poder distinguir entre las infecciones causadas por *T. solium* y por *T. saginata* (Sarti, 1997; Carpio, 2002; García, 2003; Flisser *et al.*, 2006a; Flisser *et al.*, 2006b; García *et al.*, 2007).

##### 1.4.2. Cisticercosis humana

En la cisticercosis humana las manifestaciones clínicas dependen del órgano afectado y de la localización del parásito. Fuera del sistema nervioso central los

cisticercos no provocan síntomas importantes, la cisticercosis subcutánea se presenta como pequeños nódulos indoloros y móviles que se encuentran con frecuencia en los brazos o en el pecho, que tras unos meses presentan hinchazón, e inflamación y luego desaparecen gradualmente. El diagnóstico se realiza por medio de una biopsia o con citología de aguja. Por otro lado, la cisticercosis muscular generalmente se encuentra más bien por casualidad al realizar radiografías en donde se observan calcificaciones con forma elipsoidal o de punto, sin embargo cuando hay muchos parásitos puede haber aumento de la masa muscular (pseudohipertrofia muscular). La cisticercosis oftálmica es mucho menos común que la NC, es el parásito intraorbital más común y puede generar daños a la vista. Para diagnosticarlo se utiliza una ultrasonografía orbital, que es un método inocuo de diagnóstico (Sarti, 1997; García, 2003). En el caso de la cisticercosis en corazón, se trata de un padecimiento extremadamente raro que puede aparecer en casos de infección masiva, suele ser asintomático por lo que es difícil realizar un diagnóstico, su importancia reside en el riesgo que existe que el parásito bloquee el flujo sanguíneo. Para obtener un diagnóstico patológico se requeriría una biopsia de corazón o un ecocardiograma, que es recomendable en pacientes con cisticercosis diseminada (Cutrone, 1995; García, 2003; Bhalla *et al.*, 2008).

#### 1.4.3. Neurocisticercosis humana (NC)

La NC se da cuando el parásito infecta el sistema nervioso central; tras entrar a este los cisticercos producen pocos cambios inflamatorios en los tejidos cercanos por lo que el cisticerco se queda allí alojado por largos periodos de tiempo para después degenerarse, lo cual está asociado a inflamación mediada por el sistema inmune. Los síntomas y manifestaciones clínicas no son específicos, dependen del número, tamaño y localización de los parásitos, siendo los ataques epilépticos y crisis convulsivas los síntomas más comunes. También pueden presentarse dolores de cabeza, hipertensión intracraneal, problemas motrices, hidrocefalia o bien ser asintomática. Cuando los cisticercos bloquean la circulación del líquido cefalorraquídeo o cuando se desarrollan en posición subaracnoidea basal y

generan una reacción inflamatoria que atrapa vasos y nervios, puede ser una enfermedad fatal. Cabe resaltar que los cisticercos alojados en el parénquima cerebral generan crisis convulsivas en el 70% de los casos (Carpio, 2002, García, 2003; Flisser, 2004; Fleury *et al.*, 2006; Flisser *et al.*, 2006b; García *et al.*, 2007). Para su diagnóstico se realizan estudios de neuroimagen (tomografía computarizada y resonancia magnética), histopatologías (búsqueda de eosinófilos en el fluido cerebroespinal), ensayos serológicos, inmunoelectrotransferencia (IET) y ELISA; estos dos últimos son ensayos inmunoenzimáticos que detectan anticuerpos contra el parásito o antígenos parasitarios en suero y líquido cefalorraquídeo. Uno de los métodos más utilizados por su gran especificidad y sensibilidad es el desarrollado por Tsang *et al.* (1989, 1991), en el que se detecta en una fracción glicoproteica del parásito varios antígenos específicos del cisticerco (Carpio, 2002, García, 2003; Flisser, 2004; Fleury *et al.*, 2006; Flisser *et al.*, 2006b; García *et al.*, 2007).

#### 1.5. Tratamiento / Fármacos antihelmínticos

Los principales fármacos que se utilizan para el tratamiento de estas enfermedades son el praziquantel o el albendazol. El tratamiento de la NC es muy variable, debido a que hay que tomar en cuenta la viabilidad, número, localización y tamaño de los parásitos, así como la intensidad de la reacción inflamatoria y el estado clínico del paciente, pues el tratamiento puede ser con antiparasitarios, sintomático o quirúrgico. En el caso del tratamiento con antiparasitarios, los fármacos más utilizados son el albendazol y el praziquantel; el primero actúa inhibiendo la polimerización de microtúbulos e inhibiendo la captación de glucosa por la membrana parasitaria provocando en el parásito un agotamiento energético, no presenta efectos secundarios graves y no tiene metabolismo hepático. Por otro lado, el praziquantel parece actuar dañando el tegumento del parásito con lo que ocasiona una parálisis espástica del escólex, su metabolismo es hepático. El principal problema con el uso de estos fármacos es el incremento en la reacción de inflamación en el SNC debido a la destrucción de los cisticercos, por lo que estos tratamientos van acompañados por corticosteroides para disminuir esta

reacción. Para el tratamiento sintomático se pueden utilizar antiepilépticos, analgésicos, corticoesteroides, dependiendo de la localización del parásito y la sintomatología del paciente. Finalmente, el tratamiento quirúrgico casi no se utiliza en la actualidad debido a la eficacia de los fármacos, sin embargo se puede recurrir a una cirugía en casos muy particulares que la requieran (Sarti, 1997; Sciutto, 2000; Carpio, 2002; García, 2003; Fleury *et al.*, 2006).

Recientemente ha surgido una creciente preocupación por el potencial problema de la resistencia a antihelmínticos (RA) y, aunque no se ha reportado claramente en helmintos humanos, existen muchos ejemplos de RA en ganado, de hecho, actualmente la RA es el principal problema para el tratamiento de enfermedades por helmintos en la crianza de ganado bovino en Australia, Sudáfrica y Sudamérica. Se han reportado ya algunos posibles casos de RA en nemátodos que afectan humanos (van Wyk *et al.*, 1997; Waller, 1997; Geerts *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000).

#### 1.6. Conclusiones sobre la taeniosis y la cisticercosis

*Taenia solium* se encuentra ampliamente distribuida en Latinoamérica, Asia y África y es un problema tanto de salud pública como económico. La prevalencia y transmisión de estas dos enfermedades depende del vínculo entre el ser humano y el cerdo. Se asocia principalmente a medidas higiénicas y sanitarias deficientes, ignorancia, pobreza, métodos primitivos de crianza, falta de inspección y control de calidad de la carne (Sarti, 1997; Flisser *et al.*, 2006a; Willms *et al.*, 2006). El hecho de que el ser humano es el hospedero definitivo de *T. solium*, el que su hospedero accidental (el cerdo) puede ser controlado, aunado a que no se conocen reservorios silvestres y, tomando en cuenta la actual eficacia de los tratamientos antiparasitarios contra la taeniosis, nos hace ver que son muchas las ventajas que facilitan el control o eliminación de las infecciones provocadas por este parásito (Sarti, 1997). Se han evaluado los tratamientos masivos para eliminar a los posibles portadores del parásito adulto con praziquantel o niclosamidas (Cruz *et al.*, 1989; Sarti *et al.*, 2000). Se ha intentado mejorar las

condiciones para la crianza de los cerdos y la infraestructura (Vázquez-Flores *et al.*, 2001), se han implementado estándares de inspección y una adecuada eliminación de la carne de cerdo infectada y se ha intentado educar sobre el tema (Sarti, 1997). Otra opción es la vacunación del hospedero intermediario de *T. solium*: el cerdo, para remover la fuente de infección al ser humano y a la vez evitar nuevos casos de cisticercosis; se ha visto en otras especies que son infectadas por tenias que se puede adquirir protección contra la cisticercosis por medio de la vacunación. Para esto se han desarrollado vacunas a partir de extractos de cisticercos, vacunas que utilizan proteínas recombinantes de antígenos de *T. solium*, como la de la paramiosina, el antígeno KETc7 (Manoutcharian *et al.*, 1996; Flisser *et al.*, 2006a y b; Lightowers, 2006,) que han mostrado tener altos niveles de protección contra la cisticercosis en cerdos (Cruz-Revilla *et al.*, 2000). Asimismo KETc7 ha sido clonado en el plásmido para desarrollar vacunas de ADN, concluyendo que las vacunas de ADN intrahepáticas pueden inducir altos niveles de protección en ausencia de una respuesta inmune específica (Cruz-Revilla *et al.*, 2006).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Metabolismo energético de helmintos

Una de las características más sobresalientes del metabolismo energético de helmintos es la coexistencia de la fermentación y de la respiración aeróbica durante las distintas etapas del ciclo de vida del parásito, durante las cuales se tiene que adaptar a las distintas condiciones de su entorno. En general, los parásitos con estadios de vida libre presentan un metabolismo aerobio, mientras que los de estadios parasitarios tienen un metabolismo anaerobio, sin embargo, a diferencia de la anaerobiosis temporal que presentan otros parásitos, los helmintos parásitos pueden presentar un metabolismo prácticamente anaerobio. La principal fuente de energía de los helmintos parásitos es la glucosa, aunque pueden metabolizar algunos otros carbohidratos o aminoácidos; estos organismos incorporan grandes cantidades de glucosa que almacenan en forma de glicógeno citoplasmático (Tielens, 1994; Willms *et al.*, 2005).

En el caso de la degradación de sustratos en helmintos parásitos adultos, la glucosa y el glicógeno son degradados a fosfoenolpiruvato por vía de la glucólisis, tras lo cual, bajo condiciones de anaerobiosis, se pueden seguir dos caminos para el subsecuente catabolismo del fosfoenolpiruvato: (a) es transformado a piruvato finalizando el ciclo glicolítico, que es posteriormente reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa, o bien, (b) es reducido a malato por la vía de la dismutación del malato (Tielens *et al.*, 1993; Tielens, 1994) (Fig. 3).

#### 2.1.1. Glucólisis

(a) La glucólisis consiste en la degradación de una molécula de glucosa de seis carbonos, la cual es convertida en dos moléculas de piruvato, ATP y NADH como producto a partir de una serie de diez reacciones enzimáticas: las cinco primeras reacciones son de preparación, se invierten dos ATP y la glucosa es convertida en dos moléculas de tres carbonos (gliceraldehído 3-fosfato): En primer lugar (1) la glucosa se fosforila en el grupo hidroxilo del C6, (2) luego la D-glucosa 6-fosfato

se convierte en D-fructuosa 6-fosfato, (3) que es nuevamente fosforilada esta vez en el C1 para dar lugar a la D-fructuosa 1,6-bifosfato, en ambas fosforilaciones el donante del grupo fosfato es el ATP. (4) Posteriormente la fructosa 1,6-bifosfato es dividida en dos moléculas de tres C: dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, (5) finalmente la dihidroxiacetona fosfato es isomerizada en otra molécula de gliceraldehído 3-fosfato. La siguiente fase es la de recuperación de los dos ATP invertidos en la primera fase de la vía, además se generan dos ATP de ganancia y las dos moléculas de tres carbonos se convierten en piruvato. (6) Ambas moléculas de gliceraldehído 3-fosfato se oxidan y fosforilan por un fosfato inorgánico para formar 1,3-bifosfoglicerato, (7) que es transformado en 3-fosfoglicerato, (8) luego en 2-fosfoglicerato, después en (9) fosfoenolpiruvato, y finalmente (10) a piruvato. En esta última fase se generan cuatro ATP (dos para reponer los utilizados en la primera fase de la vía, y dos más de ganancia energética). El piruvato producto de esta vía se convierte a lactato en el proceso de fermentación láctica (Lehninger, 2004) (Fig. 3).

#### 2.1.2. Dismutación del malato

(b) En esta vía, los carbohidratos son degradados a fosfoenolpiruvato (PEP) siguiendo la misma vía de la glucólisis, para posteriormente ser carboxilado por la PEPCK para formar oxalacetato, que es subsecuentemente reducido a malato por la malato deshidrogenasa citosólica. Esta parte ocurre en el citosol y también genera dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. Posteriormente, el malato es transportado al interior de la mitocondria para seguir siendo degradado. Parte del malato se oxida a acetato y otra parte se reduce a succinato, que es excretado por el organismo; muchos otros helmintos metabolizan el succinato hasta propionato, el cual es excretado. Esta vía de la dismutación del malato se encuentra en equilibrio cuando se produce el doble de propionato que de acetato. En esta vía se generan otras tres moléculas de ATP, que sumadas a las dos generadas durante los pasos de la glucólisis, nos da un total de cinco ATP por molécula de glucosa. De igual manera, gracias a la oxidación del malato se obtienen también dos moléculas más de NADH, mientras que cuando se reduce,

se obtiene solo una de  $\text{NAD}^+$  (Tielens *et al.*, 1993; Tielens, 1994; Öztop *et al.*, 1999) (Fig. 3).

## 2.2. Metabolismo de *T. solium*

*Taenia solium* carece de un tubo digestivo, de manera que la absorción de nutrientes y el desecho de sustancias lleva a cabo a través del tegumento del parásito. El gusano cuenta también con unos grandes sacos citoplasmáticos con glicógeno en el tejido del cuello y el escólex que van disminuyendo en tamaño y número conforme el estróbilo se desarrolla. Dado que el parásito adulto habita en el intestino delgado en un ambiente con poco oxígeno disponible, éste utiliza principalmente la vía de la glucólisis para degradar sustratos, sin embargo, también puede realizar la catálisis por vía de la dismutación del malato. El cisticerco a su vez, se encuentra cubierto por un tegumento y obtiene sus nutrientes y los excreta por difusión facilitada a través de la pared vesicular; tiene un metabolismo energético similar al de otros helmintos, incluyendo la glucólisis anaeróbica, glucólisis aeróbica, así como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos parcialmente invertido. Conforme la larva va madurando, se incrementa gradualmente el metabolismo energético, mientras que la producción de lactato declina (Gao *et al.*, 2004; Willms, 2005).

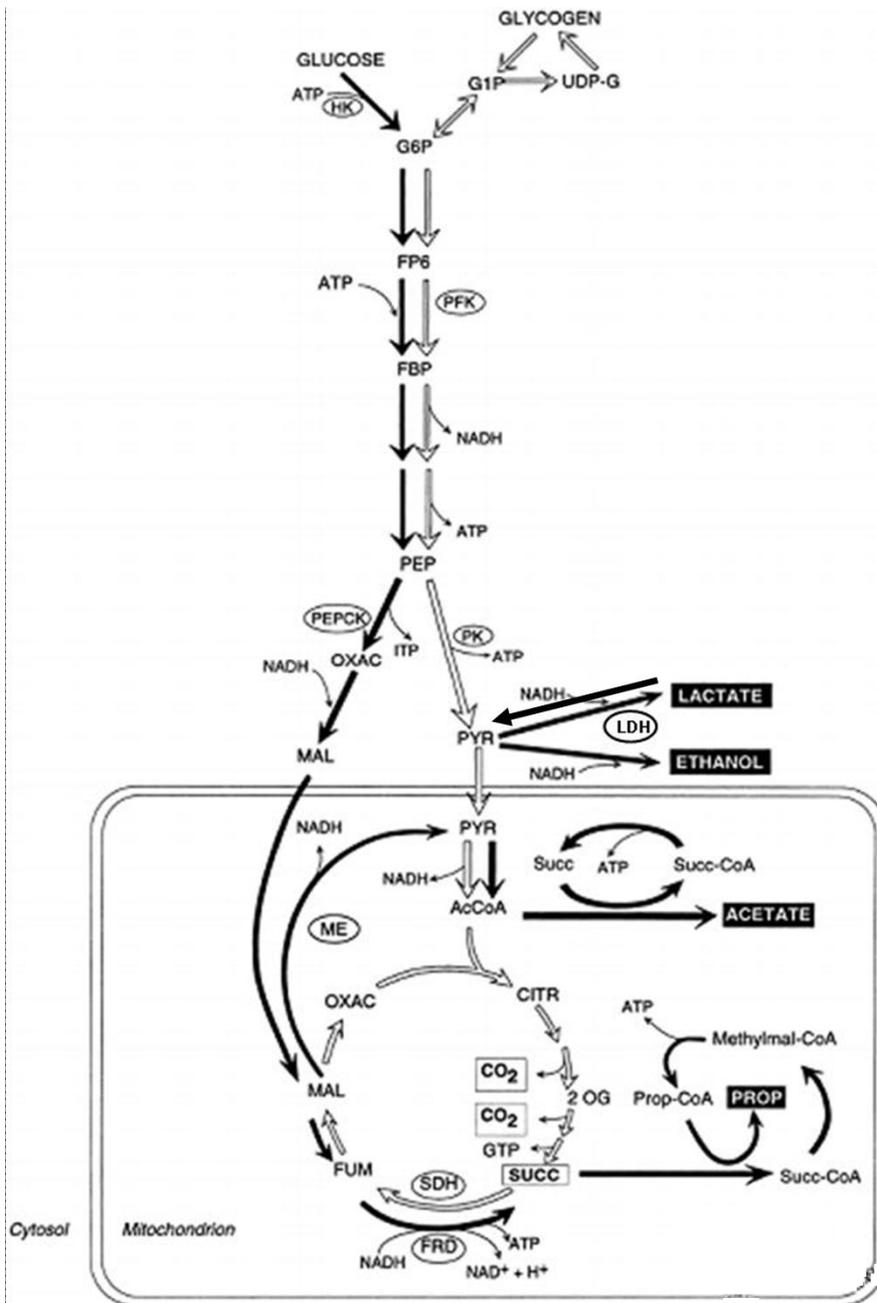


Figura 3- Muestran las dos vías de degradación de carbohidratos en helmintos, las flechas blancas señalan la vía glicolítica, mientras que las flechas negras señalan la vía de la dismutación del malato. Abreviaciones: AcCoA, Acetil-CoA; CITR, citrato; FBP, fructosa-1,6-bisfosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FRD, fumarato reductasa; FUM, fumarato; G6P, glucosa 6-fosfato, HK, hexokinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MAL, malato; Methylmal-CoA, metilmalonil-CoA; ME, enzima málica; 2OG, 2-oxoglutarato; OXAC, oxalacetato; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxinasa; PFK, fosfofructokinasa; PK, piruvato kinasa; PROP, propionato; Prop-CoA, propionil-CoA; PYR, piruvato; SDH, succinato deshidrogenasa; SUCC, succinato; Succ-CoA, succinil-CoA. Tomada de Springer (<http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/b/me12008.png.php>)

### 2.3. Lactato Deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) es una enzima que pertenece a la categoría de las oxidorreductasas, las cuales se hallan ampliamente distribuidas en bacterias y eucariotas en el citosol y/o mitocondrias. La LDH de los Apicomplexa es similar a su malato deshidrogenasa (MDH), ambas enzimas se complementan y están involucradas en el metabolismo energético anaerobio, lo cual indica que si las dos enzimas se inhiben resultaría en la muerte del parásito por agotamiento energético (Choi *et al.*, 2007). La LDH se encuentra involucrada en el último paso del ciclo glicolítico: bajo condiciones anaeróbicas el piruvato producto de la glucólisis es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH (producido en la reacción del gliceraldehído-3-fosfato de la glucólisis) a NAD<sup>+</sup>. Esta reacción es llevada a cabo por la LDH y es necesaria para reestablecer el NAD<sup>+</sup> pues es el sustrato necesario para que la G3PDH lleve a cabo su reacción, y sin el cual la glucólisis se detendría. La reacción se da de la siguiente manera: el hidrógeno del C4 del NADH es transferido al C2 del piruvato para formar lactato, regenerando NAD<sup>+</sup>, el ion hidronio se transfiere también al C2 del piruvato. Esta enzima también cataliza la reacción inversa, convirtiendo el lactato a piruvato por transferencia directa de un ion hidronio del C2 del lactato al C4 del anillo nicotinamida del NAD<sup>+</sup> (Garret, *et al.*, 1999; Voet, 1995; King, 2008) (Fig. 4).

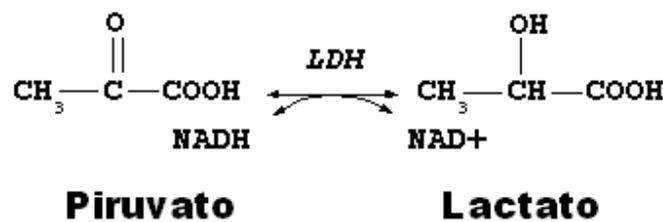


Figura 4- Reacción que cataliza la LDH.

La LDH es un tetrámero de alrededor de 140kDa formado por subunidades de igual peso molecular (36kDa). En vertebrados se ha visto que estas subunidades o cadenas polipeptídicas existen en tres variedades electroforéticas distintas que han sido designadas como subunidades A y B, adicionalmente se ha descrito una tercera subunidad C que se encuentran bajo control genético independiente. Estas tres formas moleculares distintas (isoenzimas) se encuentran distribuidas en diferentes tejidos y en distintas proporciones dentro del organismo; a partir de la combinación de las subunidades A y B se forman cinco tetrámeros por todas las posibles asociaciones de estas dos subunidades, dando lugar a dos homotetrámeros inmunológicamente distintos y tres heterotetrámeros: LDH-1 = BBBB, LDH-2 = BBBA, LDH-3 = BBAA, LDH-4 = BAAA y LDH-5 = AAAA (Shaw *et al.*, 1963; Tsuji, 1994; Urich, 1994). La LDH A es la más capacitada para realizar la reducción del piruvato en tejidos anaeróbicos (músculo), mientras que la LDH B es capaz de oxidar el lactato en tejidos aeróbicos (corazón). En el caso de la LDH C, su distribución en los tejidos varía entre organismos (general, hígado, ojo, testículos). Se cree que las distintas isoenzimas de la LDH surgieron a partir de un solo *locus* de LDH-A en Agnatha, ya que se ha visto las lampreas tienen una sola isoenzima de la LDH (Tsuji, 1994). En el caso de los invertebrados, la mayor parte de estos parece poseer una sola copia de LDH (Urich, 1994; Critescu *et al.*, 2008), aunque se han reportado algunos eventos de duplicación del gen principalmente en algunos crustáceos como en el krill del norte *Meganyctiphanes norvegica* (Mulkiewicz, 2001), en la langosta *Homarus americanus* (Kaloustian, 1968) y en la pulga de agua *Daphnia magna* (Hebert, 1973), entre otros.

Además de su papel en la glucólisis se han realizado diversos estudios que parecen indicar la posible participación de la LDH A en otros procesos, tales como la transcripción y replicación del ADN (Cattaneo *et al.*, 1985; Grosse *et al.*, 1986, Williams *et al.*, 1985; Short *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2005).

En cuanto a los efectos que tiene la enzima en el organismo, Prestch *et al* (1993) reporta que en casos de deficiencia de LDH en ratones se desencadena la

inhibición de la glucólisis, mientras que el piruvato se difunde fuera de la célula sin producir efectos deletéreos. Las concentraciones elevadas de gliceraldehído-3-fosfato y fructuosa 1-6 difosfato indican un bloqueo del flujo metabólico en el paso de la GAPDH; las altas concentraciones de lactato en el plasma señalan una conversión deficiente de lactato a piruvato. En el ser humano ocurren reacciones similares ante una deficiencia de la enzima, se ha observado el flujo retardado de la glucólisis, así como una reducida producción de ATP en el músculo, elevadas concentraciones de piruvato y la concentración alterada de lactato en el plasma que después del trabajo isquémico llevan a la difusión del lactato fuera de la célula dando como resultado la muerte celular de los eritrocitos. Sin embargo, la gran pérdida de eritrocitos es compensada por el incremento de la eritropoyesis principalmente en el bazo y junto con el secuestro de eritrocitos provocan una esplenomegalia; ésto podría sugerir que la elevada eritropoyesis y el secuestro de eritrocitos también es responsable de la hepatomegalia encontrada en ratones homocigotos deficientes de LDH. Asimismo se ha observado un incremento en la actividad cardiopulmonar, que se denota en un aumento en el tamaño de estos órganos, lo cual sugiere que la reducida capacidad de transportar oxígeno en la sangre se ve compensada por un incremento en la función cardíaca y respiratoria. En el ser humano se pueden observar altos niveles de LDH en casos de ataque cardíaco, anemia hemolítica, hipotensión, mononucleosis infecciosa, isquemia intestinal, enfermedades hepáticas, lesiones musculares, distrofia muscular, pancreatitis, infarto pulmonar, apoplejía, cardiomiopatía isquémica, así como en enfermedades neuromusculares y distintos tipos de cáncer, por lo que es una enzima importante para el diagnóstico y monitorización de distintas enfermedades y padecimientos (Amador *et al.*, 1963; Lab Tests Online *et al.*, 2007).

### 2.3.1. Catálisis

Las subunidades cuentan con dos sitios dominios importantes: El sitio de unión a la coenzima (NAD<sup>+</sup>) que está altamente conservado en esta familia de enzimas, y un dominio catalítico que puede ser muy variable. Las principales diferencias en la estructura terciaria de la LDH no se dan entre especies ni entre isoenzimas, sino a

nivel de los cambios conformacionales que se dan durante la catálisis. Las distintas propiedades catalíticas de la LDH A y B surgen debido a las diferencias en los aminoácidos de las cadenas laterales que flanquean la estructura altamente conservada de la cadena principal del polipéptido (Steven, 1985; Eventoff, 1977). Cuando la enzima adquiere su estructura terciaria, se forma un “bolsillo” donde la LDH fija rápidamente a la coenzima antes de unir al sustrato, lo cual induce un cambio conformacional en el que el asa externa se cierra cubriendo el sitio activo, “atrapando” tanto al sustrato como a la coenzima en el sitio activo y así llevar a cabo la reacción de reducción (Fersht, 1980; Steven, 1985; Mi, 2002). El proceso catalítico involucra a la arginina 106, un aminoácido esencial cargado positivamente, que estabiliza el estado de transición de la reacción y disminuye la energía de activación. La carga positiva de la arginina polariza el enlace C=O del piruvato, permitiendo que la carga negativa del H del NADH ataque el C parcialmente cargado positivamente. Dada la conformación del sustrato al momento de unirse, la conformación de la proteína cambia de manera que este residuo es expuesto a los sustratos, piruvato y NADH (Haaker, s/a) (Fig. 5).

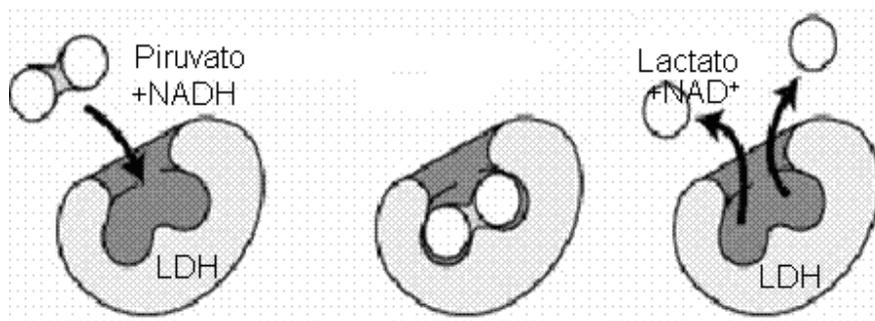


Figura 5- Mecanismo enzimático de la LDH. Tomada de: <http://etd.utmem.edu/World-Access/yml/figure1c-4page.htm>

### III. JUSTIFICACIÓN

*Taenia solium* representa un grave problema de salud pública, económico y social en muchos países, incluido México. La neurocisticercosis es la enfermedad parasitaria más frecuente del SNC del ser humano y está asociada a un importante porcentaje de ataques epilépticos y convulsivos. Todo esto nos conduce a la búsqueda de moléculas útiles para mejorar el diagnóstico, y para el desarrollo de vacunas y fármacos. Las enzimas relacionadas con las rutas metabólicas pueden ser un blanco para el cumplimiento de tales objetivos.

La glucosa es un requerimiento importante para los céstodos: en el caso de *Hymenolepis nana*, Smyth y McManus (1989) observaron que en ausencia de glucosa, estos gusanos son expulsados o se desprenden de la mucosa intestinal, por lo cual las enzimas glicolíticas han sido propuestas como blanco potencial para el desarrollo de vacunas o inhibidores farmacológicos para el control de diversas parasitosis, principalmente aquellas que difieren de sus equivalentes en el hospedero. Dado que éste parásito depende principalmente de la vía glicolítica para la obtención de energía, la inhibición de la misma conduciría a la muerte del parásito.

La LDH juega un papel muy importante en la glucólisis pues es una enzima clave para la generación de los sustratos que entran al ciclo de ácidos tricarbónicos o al ciclo de la dismutación del malato por lo que se esperaría que al inhibir o activar a la LDH se viera afectada la vía glicolítica, ya sea con la reducción parcial de la producción de energía del organismo debido a la falta de  $\text{NAD}^+$  que se requiere para la glucólisis, o bien por la acumulación de piruvato (provocando la expulsión del parásito del organismo).

Dado que aún no se conoce el genoma de *Taenia solium* éste trabajo es importante pues la clonación del ADNc que codifica para la LDH no ha sido reportada anteriormente para este organismo.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general:

- Aislar y caracterizar el ADN complementario (ADNc) que codifica para la Lactato deshidrogenasa de *Taenia solium*

### 4.2. Objetivos particulares:

- Producir una sonda de ADN que sirva para aislar el ADNc que codifique para la LDH.
- Aislar el ADNc que codifique para la LDH de *T. solium* de una biblioteca de ADNc de larva
- Caracterizar parcialmente el ADNc

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales:

#### 5.1.1. Material Biológico:

Cisticercos de *T. solium*, se obtuvieron por disección del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente, adquiridos en comunidades rurales donde existe el parásito. La biblioteca de ADNc de adulto de *T. solium* construida en el vector  $\lambda$ UNIZAP utilizando los sitios *Eco* RI - *Xho* I del vector, fue preparada con antelación en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM. Asimismo, las células químico-competentes TOP 10: [F<sup>-</sup>mcrA  $\Delta$ (mrr-hdsRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 dROS recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG] y XL1-Blue [supE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$  M15 Tn10 (tet<sup>r</sup>)] de la casa InvitroGen.

#### 5.1.2. Reactivos:

Los oligonucleótidos LD1 (VTNPVDI) y LD2 (KGYTSWA) diseñados a partir de secuencias internas altamente conservadas de la enzima LDH de diferentes organismos, los oligonucleótidos T3 y T7, M13F y M13R que flanquean las regiones de clonación de los vectores  $\lambda$ UNIZAP y PCRII respectivamente sintetizados por InvitroGen. Los estuches utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue comprado a Biotecnologías Universitarias UNAM para la reacción de PCR y transcripción reversa (RT-PCR, Superscript One-Step), el estuche de ligación TOPO-TA (pCRII) Cloning System de la casa Invitrogen, para la secuenciación se utilizó el ABI prism big dye terminador; las membranas de nylon son marca Hybond-N, las endonucleasas *Eco* RI, *Bam* HI, *Nhe* I, *Hind* III, *Xho* I, *Bgl* II de la casa GIBCO BRL, la marca radioactiva <sup>32</sup>P-dCTP (250uCi/mmol) y el estuche para el marcaje radioactivo RedPrime ADN Labeling System de la casa Amersham Bioscience, las placas de rayos X fueron de la marca Kodak. Las sales las soluciones para la preparaciones alcalinas grandes y pequeñas del ADN plásmidico, las de electroforesis en geles de agarosa, los medios de cultivo,

antibióticos, soluciones para la hibridación de los tamizajes fueron preparadas con los reactivos de la mas alta calidad disponibles en el laboratorio.

## 5.2. Métodos:

### 5.2.1. Extracción de RNA total

Se homogenizaron cisticercos de *T. solium* (250mg) en 1mL de TRIZOL con un Polytron (Brinkman Instruments mod.VC130PB) a máxima frecuencia durante un minuto, tres veces. La mezcla se centrifugó 3min a 10,000rpm (Heraeus Biofuge, Kendro Laboratory Products) para permitir la formación de la fase acuosa y orgánica. La fase orgánica (ácidos nucleicos) se extrae con 200uL de cloroformo, agitando vigorosamente y centrifugando a 10,000rpm, a 4°C, por 15min para separar las fases, se recuperó la fase acuosa y se repitió este paso. Después se adicionaron 500mL de isopropanol, se centrifugó como antes, se desechó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó agregando el mismo volumen de etanol al 70%, resuspendiendo en un vórtex y centrifugando por 5min a 7,500rpm; posteriormente se desechó el sobrenadante, el precipitado se seco a temperatura ambiente y resuspendió en agua libre de RNAsas. El RNA se cuantificó mediante OD<sub>260nm</sub> en un espectrofotómetro Ultrospec 3100pro (Amersham Biosciences).

### 5.2.2. Obtención de la sonda

La sonda se obtuvo mediante una RT-PCR con los oligonucleótidos específicos (LD1 y LD2) y 1ug del RNA total de cisticercos. La reacción se realizó en un volumen de 50uL y se utilizaron 25uL de 2x reaction mix, 10uM de cada oligonucleótido, 2uL de templado, 1uL de enzima RT/Taq mix y H<sub>2</sub>O MilliQ para completar el volumen. La muestra se colocó en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystem) y se utilizó el siguiente programa: un ciclo de 30min a 50°C, 1min a 94°C, 30 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 55°C y 1min a 72°C, seguido de una extensión final de 15min a 72°C. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La banda correspondiente al fragmento de 348pb se cortó del gel y purificó por el método de perlas de vidrio (Sambrook *et al.*, 2001). La agarosa con la banda que

contenía el producto de PCR (0,5 g) se disolvió en 500uL de NaI 6M a 37°C por 10min. Entonces se agregaron 3uL de perlas de vidrio, se agitó e incubó en hielo durante 2hr, transcurridas las cuales se centrifugó a 13,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C, Brinkman), a 4°C durante 30s y se desechó el sobrenadante. Se lavaron las perlas agregando 500uL de NaI y se centrifugó como antes y se desechó el sobrenadante, de la misma forma se realizaron tres lavados con solución de lavado (Anexo). Las perlas se secaron a 37°C y se resuspendieron en 25uL de TE (Anexo). Éste producto fue clonado en un vector pCRII (TOPO TA), las reacciones de ligación se realizaron siguiendo el protocolo del estuche TOPO-TA Cloning System de Invitrogen, utilizando las siguientes cantidades: 0.5uL de vector pCRII, 1uL amortiguador salino, 50ng del fragmento, 1.5uL H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 1hr, posteriormente se realizó la transformación a partir de la ligación, donde se agregaron 2uL de ligación a 50uL de células químicamente competentes TOP10 y la mezcla se dejó en hielo por 30min para después dar un choque térmico de 42°C por 30s. Se adicionaron 200uL de medio SOC y se incubó en agitación por 30min a 37°C. Transcurrido ese tiempo las bacterias se sembraron en medio sólido SBOM con ampicilina (100ug/mL) y se incubaron a 37°C toda la noche.

### 5.2.3. Preparación pequeña de ADN plasmídico

Las bacterias transformadas con el inserto de interés se inocularon en 1.5mL de medio LB + ampicilina (100ug/mL) y se dejaron crecer toda la noche en agitación a 37°C. El ADN fue aislado mediante la técnica de lisis alcalina. Las células se centrifugaron a 3,000rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 10min, se desechó el sobrenadante, se agregaron 200uL de solución 1 (Anexo), se resuspendieron las células en vórtex e incubaron 5min a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 400uL de solución 2 recién preparada (Anexo), se mezcló suavemente invirtiendo los tubos un par de veces y se incubó en hielo por 5min; posteriormente se añadieron 300uL de solución 3 (Anexo), se mezcló suavemente, se incubó en hielo por 5min y se centrifugó a 3,000rpm por 10min, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se añadieron 2mL de isopropanol, se agitó en el vórtex y se

incubó en hielo 5min. La mezcla se centrifugó a 3,000rpm durante 10min, se desechó el sobrenadante y se agregaron 100uL de etanol al 70% frío, se centrifugó rápidamente y se desechó el sobrenadante, se dejó secar el botón invirtiendo el tubo sobre papel absorbente y este se resuspendió en 50uL de TE.

#### 5.2.4. Marcaje Radioactivo

Para realizar el marcaje radioactivo se tomaron 25ng de la sonda de ADN y se colocaron en 45uL de TE, se calentó la mezcla a 100°C por 5min e inmediatamente se enfrió en hielo por 5min, se centrifugó la mezcla rápidamente y el sobrenadante se colocó en el tubo de reacción del estuche de marcaje RedPrime ADN Labeling System de Gibco BRL. Se adicionaron también (30uCi) de la marca radioactiva  $^{32}\text{P}$ -dCTP y se incubó 10min a 37°C, tras lo cual se agregaron 5uL de EDTA 0.2 M para detener la reacción. Finalmente, antes de utilizar la sonda para los tamizajes o el Southern, esta se desnaturalizó a 100°C por 3min y luego se enfrió en hielo por 2min más.

#### 5.2.5. Aislamiento de clonas (tamizaje)

Se inocularon colonias de la bacterias XL1-B en medio líquido LB y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente fueron infectados 350uL de cultivo con 45mil fagos de la biblioteca *T. solium* adulto construida en UNIZAP, y se incubaron a 37°C por 15min, para ser sembradas combinándolas con 3mL de top-agar licuado a 55°C y se vertieron en cajas petri previamente con medio SBOM. Una vez solidificado el medio se incubaron las cajas a 37°C toda la noche. Posteriormente se colocaron membranas de nylon Hybond-N en cada una de las cajas por 1min para transferir los fagos, se hicieron marcas asimétricas con tinta china para orientación de la membrana en la caja, se retiraron las membranas y se colocó otra membrana para realizar una replica de la anterior. Las membranas se colocaron sobre la solución desnaturalizante (Anexo) por 2min y posteriormente en la solución neutralizante (Anexo) por 2min, finalizado este tiempo se lavaron con agitación suave en una solución salina de citratos (SSC 2X. Anexo). Finalmente, las membranas se colocaron en un UV Stratalinker 2400 de Stratagene

(exposición de 120,000 microjoules/cm<sup>2</sup> por ~25 segundos) para fijar el ADN del fago.

Las membranas de nylon se colocaron en la solución de hibridación en agitación a 50°C por una hora, posteriormente se agregaron 15uL de la sonda marcada con <sup>32</sup>P y se dejaron agitando a 55°C toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados con solución de lavado (Anexo), con agitación por 25min cada vez. Las membranas se secaron sobre papel absorbente, se montaron en cassetes con placas fotográficas y se dejaron a -70°C toda la noche. Las placas fueron reveladas utilizando solución reveladora y solución fijadora en un cuarto oscuro. Las placas fotográficas reveladas fueron comparadas con sus cajas correspondientes, se seleccionaron los fagos que hibridaron positivamente con la sonda y se colocaron en una solución de SM (Anexo). Las placas seleccionadas fueron sometidas a dos tamizajes más.

#### 5.2.6. Transformación fago a plásmido

Los fagos ( $1 \times 10^6$ ) de las clonas positivas de UNIZAP provenientes de los tamizajes, se inocularon en 350uL de cultivo de bacterias XL1-Blue, se incubó la mezcla a 37°C por 15min y se sembraron en medio SOBm a 37°C toda la noche. Los fagos crecidos en la caja se recuperaron agregando 4mL de medio LB con agitación lenta por una hora, transcurrida esta se recuperó el medio, se le adicionó 1mL de cloroformo, se agitó y se centrifugó a 3,400rpm (Centra CL2, IEC) por 15min. El sobrenadante conteniendo los fagos ("plate stock") fue recuperado en un tubo Falcon nuevo. La transformación a plásmido se llevó a cabo colocando en un tubo Falcon 200uL de cultivo de bacterias XL1-Blue con 100uL del "plate stock" y 50uL del fago ayudador ExAssit y se incubó 5min a 37°C, luego se añadieron 3mL de medio 2XYT y se incubó 2h a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo la mezcla se incubó a -70 °C por 20min, se centrifugó por 15min a 3,400rpm (Centra CL2, IEC) y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Finalmente se infectaron con 10uL de este a 200uL de bacterias Xsolar, incubando por 15min a

37°C y sembrando la mezcla en cajas de LB + ampicilina (100ug/mL) e incubando a 37°C toda la noche.

#### 5.2.7. Preparación grande de ADN plasmídico

Las colonias de bacterias transformadas con el inserto de interés se inocularon en 50mL de medio LB + ampicilina (100ug/mL) e incubadas toda la noche en agitación, a 37°C. El ADN fue aislado mediante la técnica de lisis alcalina, como se describió previamente, aumentando cinco veces el volumen de cada solución. Al final del procedimiento la pastilla obtenida se resuspendió en 200uL de TE. Se le adicionaron 2uL de RNAsa (10mg/mL) y se incubó 30min a 37°C. A la mezcla anterior se le realizó una extracción con fenol y cloroformo y la fase acuosa obtenida fue pasada por una columna de sefarosa con TE, finalmente las fracciones colectadas fueron corridas en un gel de agarosa con bromuro de etidio y las fracciones que contenían el plásmido fueron recuperadas. La concentración del ADN colectado se determinó a  $DO_{260nm}$ .

#### 5.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones se realizaron en un volumen de 15uL y para cada reacción se utilizaron las siguientes cantidades: 1.5uL de amortiguador de la reacción 10x, 1.5uL de dNTPs 2mM, 0.75uL de  $MgCl_2$  20X, 10uM de cada oligonucleótido, 1uL de templado, 0.5uL de enzima y  $H_2O$  MilliQ para completar el volumen. Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystem) y el programa utilizado fue: un primer ciclo de 3min a 95°C, 1min a 50-54°C y 2min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 50-54°C y 1min a 72°C y finalmente un ciclo de 1min a 50-54°C, 5min a 72°C.

#### 5.2.9. Análisis de restricción

Se llevó a cabo un análisis de restricción utilizando el ADN plasmídico de las clonas purificado con anterioridad y las siguientes enzimas: *Bam* HI, *Hind* III, *Nhe* I y *Eco* RI. En cada mezcla de la reacción se utilizaron 10ug de ADN plasmídico, 10uL de amortiguador para la enzima correspondiente (10x), 2uL de la enzima y

agua MilliQ para completar el volumen. Las muestras se dejaron incubando por 3hrs a 37°C, tras lo cual se corrió todo el volumen en un gel de agarosa al 2%, a 100V junto con un marcador de peso molecular.

#### 5.2.10. Secuenciación

Se llevó a cabo mediante el método de Sanger en la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, se utilizó como templado el ADN plasmídico purificado con anterioridad. La secuenciación se llevó a cabo automáticamente por PCR utilizando el kit ABI prism big dye terminador; se necesita una cantidad mínima de 500ng de ADN que se llevó a un volumen de 12uL con agua desionizada. Se agrega 1uL de oligonucleótidos marcados fluorescentemente (2-5uM) y se agita suavemente (mezcla maestra). Para las reacciones de terminación se necesitan 3uL de dideoxinucleótidos del estuche (un tubo de Adenina, uno de Citocina, uno de Guanina y uno de Timina) a los que se les añade 3uL de la mezcla maestra, se agitan los tubos y se someten a PCR. Finalmente la muestra se pasó por una columna de sefarosa G-50 para eliminar los excesos de dideoxinucleótidos y cebadores marcados que no se incorporaron durante el proceso. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador SEQ4x4 de Amersham Pharmacia Biotech. Los análisis de la secuencia nucleotídica se realizaron en el programa PCGENE. Las comparaciones y alineamientos de las secuencias se utilizó el programa BLASTx del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

#### 5.2.11. Análisis tipo Southern Blot

Para la digestión del ADN plasmídico se utilizaron las siguientes endonucleasas:  $\lambda$ Hind III, Hind III, Bgl II, Eco RI y Bam HI. En cada mezcla de la reacción se usaron 10ug de ADN genómico de cisticerco, 10uL de amortiguador para la enzima correspondiente (10x), 2uL de la enzima y agua MilliQ para completar el volumen. Las muestras se dejaron incubando por 3-5hrs a 37°C. Transcurrido ese tiempo se corrió todo el volumen en un gel de agarosa al 2%, a 100V junto con un marcador de peso molecular. El ADN separado se transfirió a una membrana de

nylon, para ser hibridado con el ADNc completo que codifica para la LDH de *T. solium* obtenida. Se siguió el protocolo de hibridación utilizado en el tamizaje mencionado anteriormente.

## VI. RESULTADOS

Con los oligonucleótidos LD1 y LD2 diseñados a partir de secuencias altamente conservadas de la LDH de distintos organismos y el ARN total extraído de cisticercos, se obtuvo un fragmento de ADN de 348pb mediante RT-PCR. El fragmento fue purificado y clonado en el vector pCRII. La traducción de la secuencia nucleotídica del fragmento y los análisis de comparación contra LDHs de varios organismos depositadas en bancos de proteínas, mostraron que el fragmento presenta una alta identidad con varias de estas. En la Figura 6, se observa la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del fragmento de ADN amplificado mediante PCR, a los extremos de la secuencia se muestran los oligonucleótidos LD1 y LD2, así como también se observan algunos de los aminoácidos conservados de los sitios de unión al sustrato y a la coenzima que se mencionan más adelante.

```
1 GTGTCCAATCCCCTAGACATCATGAGCTATGTGTCTGGAAGTTGAGTGGCTTCACTCAG
  V S N P V D I M S Y V S W K L S G F T Q 20
61 CATCGCGTCCTGGGATCCGGGACCATGCTTGACACCGCTAGATTTGACACATTCTTGGC
  H R V L G S G T M L D T A R F R H I L G 40
121 CAGAAACTGAATTTGCATCCTACCGCCATTACGGTTACGTGGTCGGTGAACACGGGAGAC
  Q K L N L H P T A I H G Y V V G E H G D 60
181 TCAAGTGTCCCGGTATGGAGCAAAGTGACCGTTGGTGGAGTAAACTTGTTCGATGCTTAT
  S S V P V W S K V T V G G V K L V D A Y 80
241 CCTAAGATCGGCCAAGCCGGCGATCCCGACGATTTTCGCTTCCGTTCCACAAGGCTGTTGTC
  P K I G Q A G D P D D F A S V H K A V V 100
301 GATAGCGCCTACGAAATCATTTCGTATGAAAGGCTACACATCCTGGGGGXXXXXXXXXXXXX
  D S A Y E I I R M K G Y T S W G 116
```

Figura 6. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del fragmento de ADN amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos LD1 y LD2, que se muestran en un cuadro. En negritas se muestran algunos de los aminoácidos conservados para el sitio de unión al NAD, con un triángulo se indican algunos de los residuos conservados para el sitio de unión al sustrato, y subrayados algunos de los residuos conservados para la interfase del tetrámero.

Este fragmento fue marcado radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP y utilizado como sonda para aislar un ADNc que codifique para una LDH de *T. solium*. Para lo cual

se tamizaron 45 mil fagos provenientes de la bibliotecas de ADNc del adulto de *T. solium* construida en el  $\lambda$ UNIZAP. De los tamizajes primario, secundario y terciario se obtuvieron tres posibles clonas positivas que hibridaron a la sonda correspondiente.

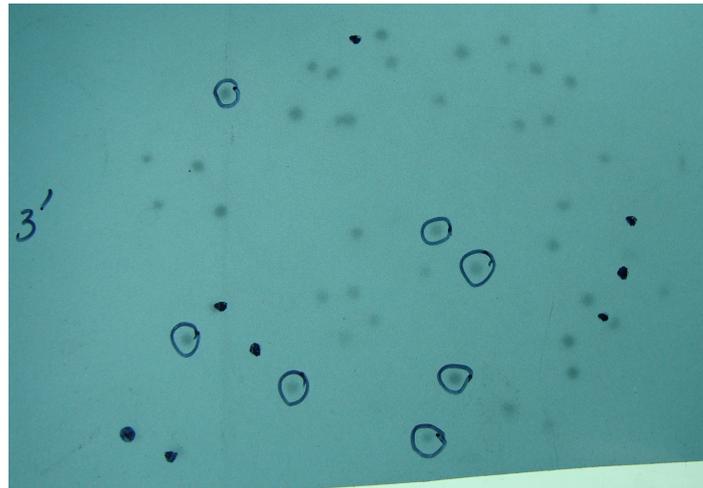


Figura 7- Autoradiografía del tamizaje secundario de la clona LD3 que dio una hibridación positiva con la sonda de ADNc de LDH marcada con  $^{32}$ P-dCTP.

La determinación de los tamaños de las clonas se realizó mediante la PCR utilizando el ADN preparado de las clonas aisladas como templado y los oligonucleotidos T7 y T3 que flanquean el sitio de clonación del vector UNIZAP. El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de la figura 8 muestra que las tres clonas aisladas tenían un tamaño similar de ~1kb, tamaño que podía contener un ADNc que codificará para la LDH del parásito. Asimismo, los 3 fragmentos de las clonas amplificadas mostraron tener el mismo patrón de restricción cuando se digieren con las endonucleasas *Bam* HI, *Hind* III, *Nhe* I y *Eco* RI (dato no mostrado). Las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI cortaron los fragmentos una vez, mientras *Hind* III y *Nhe* I no lo cortaron. Por este motivo, solo se escogió la clona LDH 3 para llevar a cabo su secuencia nucleotídica.

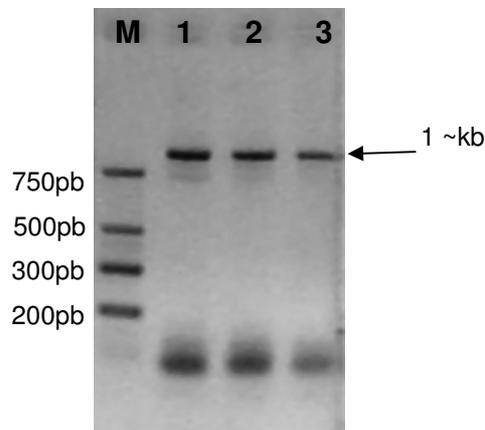


Figura 8- Gel de agarosa al 2%, donde se muestran los productos del PCR de 1 ~kb de las clonas de UNIZAP de adulto 1) LDH 1, 2) LDH 2 y 3) LDH 3. El carril con la letra M corresponde al marcador de pesos moleculares.

La Figura 9 muestra la secuencia que se obtuvo, se observa una secuencia nucleotídica de 1189pb. El análisis de la secuencia muestra un marco de lectura abierto del nucleótido 61 al nucleótido 1126, que codifica para una proteína de 355 aminoácidos con un PM estimado de 38kDa y un pI de 7.57, que presenta la siguiente composición: Asp<sup>20</sup>, Asn<sup>16</sup>, Thr<sup>27</sup>, Ser<sup>24</sup>, Glu<sup>12</sup>, Gln<sup>11</sup>, Pro<sup>14</sup>, Gly<sup>30</sup>, Ala<sup>26</sup>, Val<sup>40</sup>, Met<sup>7</sup>, Ile<sup>28</sup>, Leu<sup>30</sup>, Tyr<sup>8</sup>, Phe<sup>9</sup>, His<sup>8</sup>, Lys<sup>17</sup>, Arg<sup>16</sup>, Cys<sup>8</sup> y Trp<sup>4</sup>. Se encontró el sitio clásico de inicio de la transcripción ATG que codifica para la Metionina en la posición 61, así como la secuencia de terminación TAA en el nucleótido 1126. De igual manera se encontró el motivo clásico de señalización de poliadenilación (AATAAA) en la posición 1152 de la secuencia, seguido de 20 adeninas que conforman la cola de poliadenilación y que van del sitio 1170 al 1189.

```

1 GCACGAGAGGAGCTCTGCGACGCTTCGAATACTAGAGGTGTATCCAAGGCTCTGAACGCA

61 ATGGCACTCACAACTACTGGTATGCTTTTCATCTGTCTCCATCCTATCACACCAAACCTGT
  M A L T T T G M L S S V L H P I T P N C      20
121 TATTGTGTGAAACCTAGAGCTAAAAGTAAACAATCGTTCGGAAGTGGTTCGTTGGCATGGCA
  Y C V K P R A K V T I V G S G S V G M A      40
181 TCGCATTTCGCCATAATGATGAAGGAATGTGTTAATGAATTATGTCTTATTGATGTGGCG
  C A F A I M M K E C V N E L C L I D V A      60
241 GCTGAAAAAGTTAAAAGGCGAAGTAATGGACCTTGAACAAGGTCAGCAATTCCTTAAACAAC
  A E K V K G E V M D L E Q G Q Q F L N N      80
301 TGCAGGATACGGGGAGGTAGCGATCACGCTCTTTCTGCTGGCTCCGACATAATTGTTATT
  C R I R G G S D H A L S A G S D I I V I     100
361 ACTGCTGGTGTTAGGCAGCAACCAGGAGAATCACGCCTAAAATTTAGTCCAACGAAACACT
  T A G V R Q Q P G E S R L N L V Q R N T     120
421 GACATATATAAAGATCTTATCCCAAGTTTGGTGAAGCATAGTCCTGACGCAGTGTACTC
  D I Y K D L I P S L V K H S P D A V L L     140
481 GTTGATCGAATCCTGTTGACATTATGAGCTATGTGACCTGGAAGCTAAGTGGGTTTCT
  V V S N P V D I M T Y V T W K L S G F P     160
541 CGTAACCGCGTACTTGGTAGTGGAACTACTCTCGATTCCGCCAGATTCCGGTTCCTTCTT
  R N R V L G S G T T L D S A R F R F F L     180
601 GCTCAGAGATTTGGCATTGATCCTCAATCCGTGCATGGAATCATAATCGGTGAGCATGGT
  A Q R F G I D P Q S V H G I I I G E H G     200
661 GATTCCTCAGTCGCCGTCTGGAGTAAGGTGACAGTAGGAGGCTGTAATTTGTACTCCATT
  D S S V A V W S K V T V G G C N L Y S I     220
721 AATCCTGCCATCGGAACTGACAGGATACAGAGAATTTTGGGCAAGTCCACAAAGACACA
  N P A I G T D S D T E N F G Q V H K D T     240
781 GTAGGAGCAGCCTATGAAATAATCAACCGCAAGGGCTATACCGCCTGGGCCATTGGAGTT
  V G A A Y E I I N R K G Y T A W A I G V     260
841 ACAACCTGGAATAATCGTGGATCTTATACTGAATAATAAAAAATGCAGTCATTCCCGTAAACG
  T T W K I V D L I L N N K N A V I P V T     280
901 ACTGCAGTGAAGGGCCTGTATGGAATAACTGACGATGCATTTCTCAGCCTTCCATGCGTC
  T A V K G L Y G I T D D A F L S L P C V     300
961 GTAGGCGCCACAGGTGTTGCGAGCGTAGTCAATATCCCGCTGGACGATGCAGAAATCACC
  V G A T G V A S V V N I P L D D A E I T     320
1021 TCCTTGCAAAAAGAGTGCTCAATTACTTCGAGAAAACAACCGATGGAATCGAATTGGTAGTT
  S L Q K S A Q L L R E T T D G I E L V V     340
1081 ACTATTAAGCAGAGAAAACTGTGCCTCGTTACGTTTCGTTTACACTTAACAAAAAGCAGGAG
  T I K H R K T V P R Y V R L H -           355
1141 TAGAGGAAACAAATAAAAGCCAGTCTAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 9- Secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenida de la clona LDH3. Los números de la izquierda corresponden a los nucleótidos en pb, mientras que los números a la derecha indican los aminoácidos. En negritas se muestran los codones de inicio y termino de la secuencia, la secuencia subrayada muestra la señal de poliadenilación.

La Figura 10 muestra los análisis del alineamiento y comparación de la secuencia obtenida (LDH3-5) con otras secuencias de LDH reportadas en Gen-Bank, y cuyos códigos de acceso son los siguientes: *Homo sapiens* (NP\_005557.1), *Mus musculus* (CAA68410), *Sus scrofa* (AAA50436), *Caenorhabditis elegans* (AAA67063), *Schistosoma japonicum* (AAW25909). Al comparar estas secuencias, se encontró que la secuencia de LDH de *T. solium* tiene un 52% de identidad con la LDH-A de su hospedero definitivo, el humano; mientras que la secuencia tiene un 53% de identidad con la LDH-A de su hospedero intermediario, el cerdo, así como con las secuencias de *M. musculus*, de *C. elegans* y de *S. japonicum*.

Se observa que la secuencia obtenida para la LDH de *Taenia solium* es de mayor tamaño que las otras secuencias de LDH con las que fue comparada (355aa), se identificaron los residuos conservados para la interfase de tetrámero, así como los aminoácidos involucrados con el sitio de unión al sustrato, y aquellos involucrados con el sitio de unión al NAD; la mayor parte de estos corresponden a los reportados en Gen-Bank, se trata de residuos altamente conservados entre los organismos, asimismo se identificaron algunos otros residuos relacionados con el sitio activo de unión al NAD como son la Val<sup>27</sup>, la Gly<sup>28</sup>, una Ala, una Gly y una Val de la región 29-33, la Val<sup>52</sup> y Val<sup>54</sup>, la Met<sup>55</sup>, la Ala<sup>97</sup>, la Gly<sup>98</sup>, así como el Asp<sup>53</sup> y la Thr<sup>96</sup> (Adams *et al.*, 1973). También se identificaron los residuos correspondientes al cierre del “bolsillo” donde se une el NAD y que van del residuo 102 al 118 (en otros organismos corresponden a los residuos 98-114) y donde destacan la Arg<sup>105</sup> (en otros organismos Arg<sup>101</sup> o Arg<sup>106</sup>) que es la que dirige este proceso, y la His<sup>199</sup> (en otros organismos His<sup>195</sup>) localizada en el sitio de unión que conforma el “bolsillo” y que estabilizan el estado de transición de la reacción (Adams *et al.*, 1973; Steven S., 1985; Mi, 2002; McClendon *et al.*, 2005).

H. sapiens	MATLKD-QLI	YNLLKEEQTP	Q-----NK	ITVVGV <b>GAVG</b>	MACAISILMK	DLADEL	48
M. musculus	MATLKD-QLI	VNLLKEEQAP	Q-----NK	ITVVGV <b>GAVG</b>	MACAISILMK	DLADEL	48
S. scrofa	MATLKD-QLI	HNLLKEEHVP	H-----NK	ITVVGV <b>GAVG</b>	MACAISILMK	ELADEI	48
C. elegans	MASTIK-EVF	AEIAAPVENS	H-----GK	VTVVGV <b>GQVG</b>	MACAYSILQQ	NLANEL	48
S. japonicum	MPSSCN-MLM	KPVAPQDTEP	Q---YRS--K	VTIIGV <b>GAVG</b>	MAAAFSTM--	QIAGEI	48
T. solium	MALTTTGMLS	SVLHPITPNC	YCVKPR--AK	VTIVGS <b>GSVG</b>	MACAFAIMMK	ECVNEL	54
	*			* * * * *	****	*	
H. sapiens	ALVDVIEDKL	KGEMMDLQHG	SLFLRTPKIV	SGKDYNV TAN	SKLVII <b>TAGA</b>		98
M. musculus	ALVDVIEDKL	KGEMMDLQHG	SLFLRTPKIV	SSKDYCV TAN	SKLVII <b>TAGA</b>		98
S. scrofa	ALVDVIEDKL	KGEMMDLQHG	SLFLRTPKIV	SGKDYNV TAN	SRLVVI <b>TAGA</b>		98
C. elegans	CLVDVVADKL	KGEMMDLQHG	LAFTRHCTVK	ADTDYSITAG	SKLCVV <b>TAGA</b>		98
S. japonicum	ALIDVVADKI	KGEVLDLQHG	QQFLKCKVD	GGTDYKYSN	SDIVVI <b>TAGA</b>		98
T. solium	CLIDVAAEKV	KGEVMDLEQG	QQFLNMCRI	GGSDHALSAG	SDIIVI <b>TAGV</b>		104
	* * * *	* * * * *	*	*	* * * *		
	↓	↓			↓		
H. sapiens	RQEGESRLN	LVQRNVNIFK	FIIPNVVKYS	PNCKLLIVSN	PVDILTYVAV		148
M. musculus	RQEGESRLN	LVQRNVNIFK	FIIPNIVKYS	PHCKLLIVSN	PVDILTYVAV		148
S. scrofa	RQEGESRLN	LVQRNVNIFK	FIIPNIVKYS	PNCKLLVVSN	PVDILTYVAV		148
C. elegans	RQREGETRLS	LVQRNVEIFK	GIIPQLVKYS	PDTCILVVSN	PVDVLTIVTW		148
S. japonicum	RQNEGESRLN	LVQRNVDFIK	HIIPNVVKYS	PNCIIVVVSN	PVDILTYVAR		148
T. solium	RQPGESRLN	LVQRNTDIYK	DLIPSLVKHS	PDAVLLVVSN	PVDIMTYVTW		154
	** * * *	***** *	** * * *	*	***	*** **	
	↓	↓			↓		
H. sapiens	KISGFPKNRV	IGSGCNLDSA	RFRYLMGERL	GVHPLSCHGW	VLGEHGDSSV		198
M. musculus	KISGFPKNRV	IGSGCNLDSA	RFRYLMGERL	GVHALSCHGW	VLGEHGDSSV		198
S. scrofa	KISGFPKNRV	IGSGCNLDSA	RFRYLMGERL	GVHPLSCHGW	ILGEHGDSSV		198
C. elegans	KLSGLPRERV	FGSGTNLDSA	RFRFLLEKEL	NIAPSSCHGW	IIGEHGDSSV		198
S. japonicum	KLSGFPAHRV	IGTGTMILDSA	RFRFLLEKEL	GVSANSVHGY	VIGEHGDSSV		198
T. solium	KLSGFPRNRV	LGSGTTLDSA	RFRFLAQRV	GIDPQSVHGI	IIGEHGDSSV		204
	* * * * *	* * * * *	***	* * *	*****		
H. sapiens	PVWSGMNVAG	VSLKTLHPDL	GTDKDKEQWK	-EVHKQVDES	AYEVIKLGKY		247
M. musculus	PVWSGMNVAG	VSLKSLNPEL	GTADADKEQWK	-EVHKQVDES	AYEVIKLGKY		247
S. scrofa	PVWSGMNVAG	VSLKNLHPDL	GTADADKEHWK	-AVHKQVDES	AYEVIKLGKY		247
C. elegans	AVWSGMNVAG	VTLHEIKPDI	GEKTDNEHWE	AEIHKQVDES	AYEVIKLGKY		248
S. japonicum	PVWSNVNVAG	VRLASMNPKI	GCKDDPENFE	-EIHKQVQDS	AYDIIRLGKY		247
T. solium	AVWSKVTVGG	CNLYSINPAI	GTDSDTENFG	-QVHKDVTGA	AYEVIIRKGY		253
	*** * *		* * *	** *	** * **		
H. sapiens	TSWAIGLSVA	DLAESIMKNL	RRVHPVSTMI	KGLYGIKDDV	FLSVPCILGQ		297
M. musculus	TSWAIGLSVA	DLAESIMKNL	RRVHPISTMI	KGLYGINEDV	FLSVPCILGQ		297
S. scrofa	TSWAIGLSVA	DLAESIMKNL	RRVHPISTMI	KGLYGIKEDV	FLSVPCILGQ		297
C. elegans	TSWAIGLSVA	KIAQGIFSNS	RNVFALSTNV	KGFHGINDDV	YLSLPVVLGS		298
S. japonicum	TSWAIGLTCQ	SLCNSILMNL	HTVYPLSVSV	KGLYGIEEDV	YLSLPCLVTS		297
T. solium	TAWAIGVTTW	KIVDLILNKK	NAVIVPVTAV	KGLYGITDDA	FLSLPCVVGA		303
	* ****	* *	*	** ** *	** *		
H. sapiens	NGISDLVKVT	LTSEEEARLK	KSADTLWGIQ	KELQF			332
M. musculus	NGISDVVKVT	LTPEEEARLK	KSADTLWGIQ	KELQF			332
S. scrofa	NGISDVVKVT	LTPEEEAHLK	KSADTLWGIQ	KELQF			332
C. elegans	AGLTHVVKQQ	LTEAEVQKLH	NSAKALLEVQ	NGIVM			333
S. japonicum	AGISHVIPQE	LSQEELVRLR	KSAATIHGVI	NGIKW			332
T. solium	TGVASVVMNIP	LDDAEITSLQ	KSAQLLRETT	DGIELVVTIK	HRKTVPRYVR	LH	355
	*	* *	**				

Figura 10- Alineamiento múltiple de la LDH. Se observa la secuencia de aminoácidos de la LDH de humano, ratón, cerdo, un nemátodo, esquistosoma y de *T. solium*, que fue secuenciada en este trabajo. En negritas se muestran los aminoácidos conservados para el sitio de unión al NAD, en rojo los residuos conservados para el sitio de unión al sustrato, y subrayados los residuos conservados para la interfase del tetrámero. Los asteriscos corresponden a los aminoácidos conservados en todas las especies comparadas.

Para determinar el número de copias del gen que codifica para la LDH en el genoma de *T. solium*, se hizo un análisis tipo Southern Blot, en el que se digirió ADN genómico con varias enzimas de restricción (*Xba* I, *Hind* III, *Eco* RI y *Bam* HI). En la figura 11 se muestra la autorradiografía obtenida después de exponer la membrana a una placa de rayos X. Se observa un patrón de bandas que varía para cada enzima: *Xba* I corta una vez, produciendo bandas de ~3kb, *Bam* H1 no produce ningún corte, *Hind* III corta tres veces y produce bandas de distintos tamaños (~3.5, 3 y 1.7kb) y la enzima *Eco* RI corta dos veces produciendo bandas de ~4.5 y 2kb.

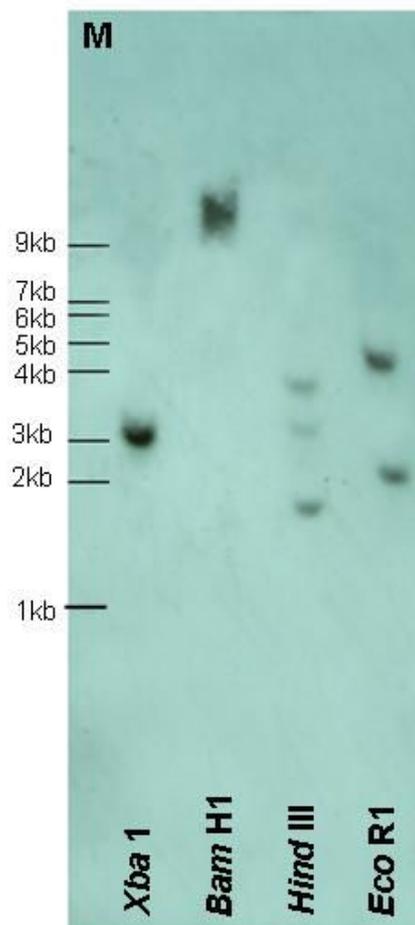


Figura 11- Autorradiografía de la hibridación del ADN genómico digerido con las enzimas de restricción. De izquierda a derecha se muestran los carriles correspondientes a cada restricción.

## VII. DISCUSIÓN

La taeniosis y cisticercosis por *Taenia solium* son un problema de salud pública. El principal problema radica en zonas rurales donde la cría de cerdos se da a "traspatio" y donde carecen de infraestructura sanitaria adecuada, de manera que los cerdos tienen acceso a heces infectadas con proglótididos y cuya carne al ser comercializada de forma local, carece de un control de calidad adecuado, por lo que la erradicación de este parásito se vuelve difícil, puesto que se necesita cambiar no solo la infraestructura, sino la forma de pensar y de actuar de la gente que allí habita.

Por otro lado, se han realizado varios esfuerzos por erradicar al parásito, como educar a la gente en distintas comunidades (Cruz *et al.* (1989), realizar campañas de tratamiento quimioterapéutico masivo, vacunación de cerdos en distintas comunidades de México (Molinari *et al.*, 1996; Sciutto *et al.*, 2006) entre otros. Sin embargo, la parasitosis aun prevalece. Un punto que hay que tomar en cuenta, es que la taeniosis no es considerada un problema grave de salud al tratarse de un padecimiento prácticamente asintomático, sin embargo es el foco de infección para causar cisticercosis en humanos y cerdos y, al no ser diagnosticada, no es tratada adecuadamente. Por otro lado, se continua encontrando cisticercosis en varias localidades, como es el caso de un estudio reciente en 13 localidades del estado de Morelos hecho por Morales *et al.* (2008), donde se examinaron las lenguas de los cerdos que allí se crían en busca de cisticercos, encontrándose un alto porcentaje de prevalencia de cisticercosis (13%) en los cerdos de estas comunidades. Este tipo de estudios nos indican que la prevalencia del parásito es alta en algunas comunidades del país, principalmente en áreas rurales y que se requieren de buenos métodos diagnósticos y mejorar medidas preventivas a corto plazo para el control de esta enfermedad, tales como el desarrollo de nuevos fármacos y métodos de diagnóstico.

La LDH es una enzima importante no solo por la reacción que realiza en la vía glicolítica, sino también por su participación en otros procesos celulares como la replicación del ADN, ya que la LDH-A está presente en núcleo y puede estimular la actividad de la ADN polimerasa *in Vitro* (en rata), y la transcripción del ADN, debido a su capacidad de unirse a ssADN en muchos tipos celulares y organismos actuando como una proteína desestabilizadora de la hélice de ADN (Cattaneo *et al* 1985; Grosse *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 2005).

En cuanto a la relación hospedero parásito se ha observado que la inhibición de LDH, provoca la acumulación de piruvato, lo que a su vez provoca la expulsión de parásitos del hospedero (Smyth *et al.*, 1989; Prestch *et al.* (1993). Asimismo, efectos fisiopatológicos son notorios ante una deficiencia del 95% de LDH, lo que lleva a ratones mutantes (-/-) a la muerte antes de poder alcanzar un estadio adulto, mientras que en el ser humano se observa un flujo retardado de la glucólisis, una baja producción de ATP, pérdida de eritrocitos, hepatomegalia e incremento en la actividad cardiopulmonar.

Por todo lo antes mencionado, la LDH se convierte en blanco de estudio para el desarrollo de vacunas, fármacos o métodos de diagnóstico efectivos que ayuden a la erradicación de este parásito (Venkatesan, 1998; Köhler, 2001; Cioli *et al.*, 2003; Vinaud *et al.*, 2008).

Es por ello que en este trabajo como un primer paso se propuso aislar el ADNc que codifica para la LDH de *T. solium*. Para esto, mediante PCR y con oligonucleótidos específicamente diseñados a partir de secuencias conservadas de la enzima en distintos organismos, se produjo una sonda o un fragmento del ADNc de 348pb. La sonda fue posteriormente utilizada para aislar mediante tamizajes el ADNc que codifica para la LDH de este organismo. Se logró aislar una clona de ADNc (LDH 3) que codifica para la LDH de *T. solium*. Los análisis de comparación mostraron que esta LDH es similar a la LDH-A de los mamíferos, que es la mejor capacitada para realizar la reducción del piruvato en tejidos

anaeróbicos y lo cual concuerda con lo esperado, pues *T. solium* tiene un metabolismo energético prácticamente anaerobio.

La clona aislada presentó una secuencia de 1189pb, y codifica para una proteína de 355 aminoácidos con un peso molecular predicho de 38kDa, lo cual difiere ligeramente del valor encontrado comúnmente en la literatura (36kDa) y su secuencia fue de mayor tamaño que aquellas con las que fue comparada, incluyendo la secuencia reportada para *T. asiatica* (Huang *et al.*, 2008). De igual manera, se identificó el codón de inicio y de término de la transcripción, además del sitio de poliadenilación, lo que sugiere que se logró aislar una clona completa para la LDH-A de *T. solium*.

La secuencia contiene los 2 sitios catalíticos característicos de la enzima: el sitio de unión al NAD, que es un dominio conformado por dos motivos tipo plegamiento de Rossmann, cada uno de los cuales está compuesto por láminas beta paralelas alternadas con hélices alfa, que forman una estructura de sándwich alfa-beta-alfa; y el sitio catalítico, que se trata de un dominio 2, L-2-hidroxisocaproato deshidrogenasa, subunidad A, es decir, un dominio homólogo al de la hidroxisocaproato deshidrogenasa, que se trata básicamente de un complejo alfa-beta (EzCatDB).

Los aminoácidos conservados que corresponden al sitio catalítico, así como a la interfase de tetrámero, sugieren que estos procesos son similares a los de las otras LDH-A de otros organismos, sin embargo algunos de ellos difieren, tales como la Ser en posición 36, la Val en posición 104 correspondientes al sitio de unión al NAD; el Glu y la Gln en posición 72 y 73, así como la Ala y la Val en posición 243 y 260 de los aminoácidos asociados a la interfase de tetrámero de la LDH de *T. solium*, y no se sabe si estas sustituciones provocan alguna alteración a las propiedades de unión o cinéticas de la enzima.

Por otro lado, en los alineamientos, se observa que la secuencia obtenida tiene un porcentaje de identidad del 52 y 53% con sus respectivos hospederos, lo que nos

indica que a pesar que existen bloques de identidad muy alta entre estas enzimas, también existen bloques de baja homología. Lo que sugiere que estos bloques diferentes podrían ser utilizados para producir epítopes antígenicos específicos de la enzima que podrían ser utilizadas en el diagnóstico o en vacunas evitando reacciones cruzadas con la enzima del hospedero.

Asimismo, el análisis tipo Southern Blot muestra que las enzimas con que se digirió el ADN genómico de *T. solium* producen varios cortes, mientras que estas mismas enzimas no cortan o producen un solo corte en el ADNc que codifica para la LDH de *T. solium* (*Xba* I no corta, *Bam* HI no corta, *Eco* RI no corta y, *Hind* III produce un solo corte), lo cual podría deberse a que las enzimas están cortando en las secuencias correspondientes a intrones. Dado que el análisis muestra un patrón de bandeo simple, se asume que el gen que codifica la LDH-A de *T. solium* es de copia única, sin embargo no se puede descartar la posible existencia de genes que codifiquen para isoformas de la enzima.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el ADNc que codifica para una LDH de *Taenia solium*
- El ADNc obtenido tiene un tamaño de 1189pb y codifica para una proteína de 385 aminoácidos.
- La que codifica el ADNc es análoga a las LDH-A de mamíferos
- El gen que codifica para esta enzima es de copia única en el genoma de *T. solium*

Finalmente este trabajo reporta por primera vez la clonación del ADNc que codifica para una LDH de *T. solium* análoga a las LDH-A de mamíferos, lo que abre caminos para el estudio del papel que esta enzima juega en la relación hospedero-parásito, así como para la vida de *T. solium*.

## IX. ANEXO

### Soluciones:

- Agar LB: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.05% (p/v), NaCl 1% (p/v) y agar bacteriológico 1.5% (p/v).
- Agar SBOM: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 1.5% (p/v).
- Agar top SBOM: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 0.7% (p/v).
- Amortiguador de cargado (ADN): EDTA 0.2M, azul de bromofenol 0.1%, xileno cianol FF 0.25%, Ficol en H<sub>2</sub>O 15%.
- Amortiguador TAE: Tris-HCl-acético 0.04M, EDTA 0.002M.
- Amortiguado TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH: 8.0.
- Gel de agarosa 2%: agarosa 1gr., amortiguador TAE 50mL, bromuro de etidio 4ul.
- Medio LB: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.05% (p/v), NaCl 1% (p/v).
- Medio SM: NaCl 0.58 (p/v), MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.2% (p/v), Tris-HCl 0.05% (p/v) pH: 7.5, gelatina 0.01% (p/v).
- Solución 1 minipreps: 50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Tris pH 8.0.
- Solución 2 minipreps: 0.2M NaOH, 1% SDS (para 50mL: 40mL de agua, 1mL de NaOH 10N y 5mL de SDS 10%).
- Solución 3 minipreps: 7.5M NH<sub>4</sub>Ac.
- Solución de lavado: NaCl 0.2M, Tris-HCl 20mM pH: 7.2, EDTA 2mM, etanol 50% (v/v).
- Solución de hibridación: SSC 5X, formamida 50% (v/v), SDS 0.2% (p/v).
- Solución desnaturalizante: NaOH 0.5M, NaCl 1.5M.
- Solución neutralizante: Tris-HCl 1M, NaCl 1.5 pH: 8.
- Solución SSC 20X: NaCl 175.32gr., citrato de sodio 88.23gr., 800mL H<sub>2</sub>O, pH 7-8.

## X. LITERATURA CITADA

1. Adams, M.J., M. Buehner, K. Chandrasekhar, G.C. Ford, M.L. Kackert, A. Liljas, M.G. Rossman, I.E. Smiley, W.S. Allison, J. Everse, N.O. Kaplan, S.S. Taylor. Structure-function relationships in Lactate dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1973) 70/7:1968-1972.
2. Allan, J.C., M. Velasquez-Tohom, C. Fletes, R. Torres-Alvarez, G. Lopez-Virula, P. Yurrita, H. Soto de Alfaro, A. Rivera, J. Garcia-Noval. Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (1997) 91:595–598.
3. Amador, E., L.E. Dorfman, W.E.C. Wacker. Serum Lactic Dehydrogenase Activity: An Analytical Assessment of Current Assays. *Clinical Chemistry* (1963) 9/4:391-399.
4. Bhalla A., A. Sood, A. Sachdev. Heart Involvement in Disseminated Cysticercosis: A Case Report and Review of Literature. *Indian Heart J.* (2008) 60:260–262
5. Carpio, A. Neurocysticercosis: An update. *The Lancet Infectious Diseases* (2002) 2:751-762.
6. Cattaneo, A., S. Biocca, N. Corvaja, P. Calissano. Nuclear localization of a Lactic Dehydrogenase with single-stranded ADN-binding properties. *Exp. Cell Res.* (1985) 161:130-140.
7. Choi, S., A. Pradhan, N.L. Hammond, A.G. Chittiboyina, B.L. Tekwani, M.A. Avery. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase Inhibitors. *J. Med. Chem.* (2007) 50:3841-3850
8. Cioli, D., L. Pica-Mattoccia. Praziquantel. *Parasitology Research* (2003) 90:83–89.
9. Critescu, M.E., D.J. Innes, J.H. Stillman, T.J. Crease. D- and L-lactate dehydrogenases during invertebrate evolution. *BMC Evolutionary Biology* (2008) 8:268.

10. Cruz, M., A. Davis, H. Dixon, Z.S. Pawlowski, J. Proano. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Ecuador. *Bull. WHO* (1989) 67:563–566.
11. Cutrone, J.A., D. Georgiou, K. Gil-Gomez, B.H. Brundage. Myocardial cysticercosis detected by Ultrafast CT\*. *Chest* (1995) 108/6:1752-1754.
12. Eventoff, W., M.G. Rossmann, S.S. Taylor, H.J. Torff, H. Meyert, W. Keil, H.H. Kiltzt. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes (amino acid sequences/x-ray crystallography/protein structure and function). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977) 74/7:2677-2681.
13. EzCatDB. A database of Enzyme Catalytic Mechanisms, en:  
<http://mbs.cbrc.jp/EzCatDB/search/get.do?dbcode=D00005>
14. Fersht, A. (1980) Estructura y mecanismo de las enzimas. Serie de Biología Fundamental. Ed. Reverté. España.
15. Fleury, A., A. Escobar, A. Chavarría, R. Carrillo-Mezo, E. Sciutto (2006) Cisticercosis en el ser humano. En: Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud (Larralde, C., A. Aluja, ed.) pp. 41-86, Fondo de Cultura Económica, México.
16. Flisser-Steinbruch, A. (2004) Céstodos. En: Manual departamental, Facultad de Medicina, Depto. de Microbiología y Parasitología, UNAM, México.
17. Flisser-Steinbruch, A., L. Vargas-Parada, J.P. Laclette. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y ciencia* (2006b) 24-33.
18. Flisser-Steinbruch, A., R. Rodríguez-Canul, A.L. Willingham III. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments. *Veterinary Parasitology* (2006a) 139:283–292.
19. Gao, X., O. Li. Principle of variation of energy metabolism in *Taenia solium* cysticerci. *Nature and Science* (2004) 2/3:91-94.
20. García, H., A. González, C. Evans, R. Gilman; Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet* (2003) 362:547–556.
21. García, H., A. González, O. Del Brutto, V. Tsang, F. Llanos-Zavalaga, G. González, J. Romero, R. Gilman. Strategies for the elimination of

- taeniasis/cysticercosis. *Journal of the Neurological Sciences* (2007) 262:153–157.
22. Garret, R., C.M., Grisham (1999) *Biochemistry*. College Publishing. 2d ed. E.U.A.
23. Geerts, S., B. Gryseels. Drug Resistance in Human Helminths: Current Situation and Lessons from Livestock. *Clinical Microbiology Reviews* (2000) 13/2:207–222.
24. Gene-Bank. National Center for Biotechnology Information (NCBI), en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
25. Grosse, F., H. Nasheurer, S. Scholtissek, U. Schomburg. Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded ADN-binding proteins that affect the ADN-polymerase-a - primase complex. *Eur. J. Biochem.* (1986) 160:459-467.
26. Haaker, H. (s/a) The reaction catalyzed by lactate dehydrogenase, en: <http://biochemistry.wur.nl/celbiologie1/ldh/equation.html>
27. Hebert, PDN. Phenotypic variability of lactate dehydrogenase in *Daphnia magna*. *J Exp Biol.* (1973) 186:33–38.
28. Huang, J., Y. Huang, X. Wu, W. Du, X. Yu, X. Hu. Identification, expression, characterization, and immunolocalization of lactate dehydrogenase from *Taenia asiatica*. *Parasitol Res* (2008) 1190/2:s00436-008.
29. Jackson, F., L. Coop. The development of antihelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* (2000) 120:S95-S107.
30. Kaloustian, H.D., F.E. Stolzenbach, J. Everse, N. Kaplan. Lactate Dehydrogenase of Lobster (*Homarus americanus*) Tail Muscle. *Journal of Biological Chemistry* (1968) 244/11:2891-2901.
31. Keates (2000) *Biophysical Methods: Common folding patterns of protein tertiary structure*, en: <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/phy456.htm>
32. Kim, J., C.V. Dang. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *TRENDS in Biochemical Sciences* (2005) 30/3:142-150.
33. King, M.W. (2008) *The Medical Biochemistry Page*, en:

<http://themedicalbiochemistrypage.org/home.html>

34. Köhler, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology* (2001) 31:336–345.
35. Lab Tests Online (AACC), Asociación Europea de Fabricantes de Material de Diagnóstico (EDMA), Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC), FENIN (Federación Española de Empresas de Tecnología Sanitaria) (2007) Lab Tests Online, en:  
<http://www.labtestsonline.es/static/template/test.prn.aspx?idcontent=671>
36. Lightowlers, M.W. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* (2006) 133:S27-S42.
37. Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Hernandez, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L.F. Rodarte, E. Sciutto. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* (1996) 82:250–254.
38. McClendon, S., D.M. Vu, K. Clinch, R. Callender, R.B. Dyer. Structural Transformations in the Dynamics of Michaelis Complex Formation in Lactate Dehydrogenase. *Biophys J.* (2005) 89/1:L07-L09
39. Meza-Lucas, A., F. Aguilar-Rebolledo. Teniasis humana por *Taenia solium*. *Revista mexicana de parasitología clínica* (2002) 49/2:92-99.
40. Mi, Y. (2002) Protection Mechanism of Excipients on Lactate Dehydrogenase during Freezing-Thawing and Lyophilization. Tesis de doctorado, University of Tennessee, EUA.
41. Molinari, J.L., D. Rodríguez, P. Tato, R. Soto, F. Arechavaleta, S. Solano. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Veterinary Parasitology* (1997) 69:55-63
42. Morales, J., J.J. Martínez, M. Rosetti, A. Fleury, V. Maza, M. Hernandez, N. Villalobos, G. Fragoso, A.S. de Aluja, C. Larralde, E. Sciutto. Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases* (2008) 9:e284.
43. Mulkiwicz E, Ziętara MS, Strömberg J-O, Skorkowski EF: Lactate dehydrogenase from the northern krill *Meganyctiphanes norvegica*:

- comparison with LDH from the Antarctic krill *Euphausia superba*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* (2001) 128/2:233-45.
44. Nelson, D.L., M.M. Cox (2004) Lehninger. Principles of Biochemistry. 4d edition, North, New York.
  45. Öztop, A.Y., G. Saygi, H. N. Öztop. In vitro effects of some anthelmintics on the Malate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase. *Turkish Journal of Medical Sciences* (1999) 29:365-370.
  46. Pretsch, W., S. Merkle, J. Favor, T. Werner. A Mutation Affecting the Lactate Dehydrogenase Locus *L dh-1* in the Mouse. 11. Mechanism of the LDH-A Deficiency Associated With Hemolytic Anemia. *Genetics* (1993) 135:161-170.
  47. RCSB Protein Data Bank, en: <http://www.rcsb.org/>
  48. Sambrook, J., D. Russell (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3er ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
  49. Sarti, E. La taeniosis y cisticercosis por *Taenia solium* (revisión bibliográfica). *Salud pública Méx* (1997) 39:3.
  50. Sarti, E., P.M. Schantz, G. Avila, J. Ambrosio, R. Medina-Santillán, A. Flisser. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (2000) 94:85–89.
  51. Sciutto, E., G. Fragoso, A. Fleury, J.P. Lacleste, J. Sotelo, A. Aluja, L. Vargas-Parada. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* (2000) 1875-1890.
  52. Sciutto, E., J. Morales, J.J. Martínez, A. Toledo, M.N. Villalobos, C. Cruz-Revilla, G. Meneses, M. Hernández, A. Díaz, L.F. Rodarte, G. Acero, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, J. Paniagua, G. Fragoso, A. Fleury, R. Larralde, A.S. de Aluja, C. Larralde. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology* (2007) 134/129–133.

53. Shaw, C.R., E. Barto. Genetic Evidence for the Subunit Structure of Lactate Dehydrogenase Isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1963) 50/2:211-214.
54. Short, M.L., D. Huang, D.M. Milkowski, S. Short, K. Kunstman, C. Soong, K.C. Chung, R.A. Jungmann. Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. *Biochem. J.* (1994) 304:391-398.
55. Smyth, J.D., D.P. McManus (1989) The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press.
56. Steven, S., L. Li, H.F. Tiano, K.M. Fukasawa, K. Yagi, M. Shimizu, F.S. Sharief, Y. Nakashima, Y.E. Pan. Protein structure and gene organization of mouse lactate dehydrogenase-A isozyme. *Eur. J. Biochem.* (1985) 149:215-225.
57. Tielens, A.G.M. Energy generation in parasitic Helminths. *Parasitology Today* (1994) 10:345-52.
58. Tielens, A.G.M., S.G. van den Bergh (1993) Aerobic and anaerobic energy metabolism in the life cycle of parasitic helminths. En: *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation* (Hochachka, P.W., P.L. Lutz, T. Sick, M. Rosenthal, G. van den Thillart, ed.), pp. 19-40, CRC Press, Boca Raton.
59. Tsang, V.C., J.A. Brand, A.E. Boyer. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* (1989) 159/1:50-9.
60. Tsang, V.C., J.A. Pilcher, W. Zhou, A.E. Boyer, E.I. Kamango-Sollo, M.L. Rhoads, K.D. Murrell, P.M. Schantz, R.H. Gilman. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1991) 29/1-2:69-78.
61. Tsuji, S., M.A. Qureshi, E.W. Hou, W.M. Fitch, S. Li. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH ADNc sequences from *Xenopus*, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:9392-9393.

62. Urich, K. (1994) *Comparative Animal Biochemistry*. Springer.
63. Venkatesan, V. Albendazole. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1998) 41:145–147.
64. van Wyk, J.A., F.S. Malan, J.L. Randles. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics. *Vet. Parasitol.* (1997) 70:111-122.
65. Vázquez-Flores, S., G. Ballesteros-Rodea, A. Flisser, P. Schantz. Hygiene and restraint of pigs associated with absence of *Taenia solium* cysticercosis in a rural community of Mexico. *Salud Pública Mex.* (2001) 43:574–576.
66. Vinaud, M.C., C. Silva-Ferreira, R. Souza-Lino, J.C. Barreto-Bezerra. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Experimental Parasitology* (2008) 120:221–226.
67. Vincent, S.J.F., C. Zwahlen, C.B. Post, J.W. Burgner, G. Bodenhausen. The conformation of NAD bound to lactate dehydrogenase determined by nuclear magnetic resonance with suppression of spin diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997) 94:4383-4388.
68. Voet, D., J.G. Voet (1995) *Biochemistry*, 2<sup>a</sup> ed. Wiley, Nueva York.
69. Waller, P.J. Antihelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* (1997) 72:391-412.
70. Williams, K.R., S. Reddigari, G.L. Patel. Identification of a nucleic acid helix-destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase-5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1985) 82:5620-5624.
71. Willms, K., A.M. Fernández-Presas, J.A. Jiménez, A. Landa, R. Zurabián, M.E. Juárez-Ugarte, L. Robert. Taeniid tapeworm responses to in vitro glucosa. *Parasitology Research* (2005) 96:296–301.

Willms, K., L. Vargas-Parada, J.P. Laclette (2006) Biología del parásito. En: Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud (Larralde, C., A. Aluja, ed.) pp. 41-86, Fondo de Cultura Económica, México.