



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL CISTICERCO DE *Taenia solium* RELACIONADOS CON SU LOCALIZACIÓN Y SU GRADO INFLAMATORIO EN LA NEUROCISTICERCOSIS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. HÉCTOR ADRIÁN PALAFOX FONSECA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:
DRA. IRIS CITLALI ESTRADA GARCÍA
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS.
DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MÉXICO, D.F. ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo se realizó con el apoyo del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Gladis del Carmen Frago González, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El trabajo se realizó con el apoyo del proyecto de investigación de DGAPA IN IN226707, y la asignación de la beca de CONACyT 207056. Otras instituciones participantes fueron el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suarez” y el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradecimientos

A la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, por su acertada dirección, por compartir sus conocimientos y por su paciencia.

A la Dra. Edda Sciutto Conde, por aceptarme en su grupo de trabajo, por todo el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Iris Estrada García, de la ENCB del IPN, por compartir sus conocimientos, por su paciencia, por su tiempo y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Daniel Piñero Dalmau, por sus conocimientos compartidos y por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Gerardo Zúñiga, de la ENCB del IPN, por los conocimientos compartidos, por su paciencia, por su tiempo y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo y del manuscrito.

Al Dr. Carlos Larralde Rangel, por sus asesorías, por el tiempo brindado, por su paciencia y por el apoyo brindado a mi familia durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Raúl J. Bobes Ruíz, por los conocimientos compartidos, por su paciencia, por su tiempo y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la bióloga Marisol García, por su tiempo, sus conocimientos, por el apoyo técnico, y por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales de examen de grado, Dr. Juan Pedro Laclette, Dr. José Iván Sánchez Betancourt, Dr. José Martín García Varela y Dra. Concepción Toriello Nájera, por la paciencia en la revisión del manuscrito de esta tesis y los acertados comentarios para mejorarlo.

A la Dra. Agnes Fleury, por sus conocimientos, por su ayuda para conseguir muestras de humanos, y por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jefferson Proaño, por su tiempo, por su ayuda para conseguir las muestras de humanos y por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Marisela Hernández González, por su ayuda técnica en la realización de este trabajo.

A la Dra. Graciela Cárdenas, por su ayuda para conseguir las muestras de humanos y por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Nelly Villalobos, por sus conocimientos, por su tiempo y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Rosas, por su tiempo, su paciencia y el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A la bióloga Beatriz Hernández, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al QFB Juan Francisco Rodríguez, por su apoyo en la revisión y corrección del manuscrito y de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Marisol García, Brenda Sáenz, Rubén Ramírez, René Segura, Jacqueline Cervantes, Lisandro Sánchez, Alfredo Figueroa y Marisela Hernández.

A mi familia, por su paciencia y por el apoyo brindado en las etapas difíciles de este trabajo.

Al Programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por el apoyo brindado durante los estudios de doctorado, el financiamiento para el Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica en 2008 y el Congreso de Parasitología en 2011.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por mantener un ambiente profesional en sus instalaciones, por la pluralidad y por permitirme crecer académicamente.

Dedicatoria

A mi familia, a Teresa Marisol García Ibarra, por la paciencia durante esta etapa tan importante en nuestras vidas, por tus consejos, por tu aliento y por recordarme una y otra vez que todo es posible, sólo necesitamos estar convencidos de ello. También por todo el apoyo brindado y trabajo realizado para la elaboración de este trabajo.

A Diana Yaretzi y Mayte Abigail Palafox García, por ser motivo de inspiración en la etapa final de este trabajo cuando todo parecía ser más difícil, por y para ustedes.

A mi madre, Victoria, y mis hermanos Jorge y Leticia y a sus respectivas familias, porque siempre me animaron a continuar.

A Germán, Dolores, Silvia y Mayra, quienes en muchas ocasiones nos brindaron su apoyo y sus consejos para superar momentos difíciles en esta época de la vida.

Índice	Página
Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
Resumen	11
Abstract	12
Glosario de abreviaturas	13
Introducción.....	14
Cisticercosis y teniasis.....	14
Complejo teniasis-cisticercosis	14
Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	14
Biología del parásito.....	15
Clínica en la neurocisticercosis.....	16
Prevalencia de la cisticercosis humana	19
Capítulo 1: Expresión diferencial de genes entre cisticercos procedentes de músculo esquelético y de diferentes regiones del sistema nervioso central del cerdo	20
Antecedentes.....	20
Expresión de genes.....	20
Expresión diferencial de genes.....	21
Justificación.....	24
Planteamiento del problema.....	24
Hipótesis	24
Objetivos	24
Objetivo general.....	24

Objetivos particulares	24
Materiales y Métodos	25
qRT-PCR de genes en cisticercos de cerdos	27
Resultados	29
Discusión.....	34
Capítulo 2: Identificación de factores genéticos del cisticerco de <i>Taenia solium</i> relacionados con su localización y su grado inflamatorio en la neurocisticercosis.....	36
Antecedentes.....	36
Aspectos evolutivos y de variabilidad genética del género <i>Taenia</i>	36
Marcadores moleculares.....	38
Filogeografía y biogeografía de <i>Taenia solium</i>	45
Justificación	47
Planteamiento del problema	47
Hipótesis	47
Objetivos.....	48
Objetivo general	48
Objetivos particulares.....	48
Materiales y métodos.....	49
Universo de Trabajo	49
Selección de muestra.....	49
Procedimientos	50
Pacientes.....	50
Extracción de DNA de cisticercos de humanos.....	50
Amplificación de genes <i>Cytb</i> de cisticercos	51

Análisis estadísticos	51
Resultados	53
Discusión	64
Conclusiones	67
Bibliografía	68
Anexos	83

Índice de figuras	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	17
Figura 2. Imágenes de resonancia magnética mostrando heterogeneidad radiológica en la neurocisticercosis.....	18
Figura 3. Expresión diferencial de genes mediante RT-PCR en tiempo real logarítmica.....	31
Figura 4. Expresión diferencial de genes mediante RT-PCR en tiempo real	32
Figura 5. Imágenes de inmuno-localización de proteína Sec14 Tsol	33
Figura 6. Estructura del producto de PCR secuenciado del gen <i>Ag2</i> de <i>T. solium</i>	44
Figura 7. Imagen representativa de los productos de PCR del gen <i>Cytb</i> de 25 cisticercos de humanos	53
Figura 8. Cambios nucleotídicos observados en el gen amplificado <i>Cytb</i> de los 28 parásitos de los 12 pacientes con neurocisticercosis.....	55
Figura 9. Red de haplotipos en el gene <i>Cytb</i>	57
Figura 10. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud	58
Figura 11. Árbol consenso de la prueba Neighbor Joining (NJ) del gen <i>Cytb</i> de <i>T. solium</i>	59

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Genes amplificados en RT-PCR en tiempo real.....	28
Tabla 2. Relación de cisticercos colectados de pacientes diagnosticados con neurocisticercosis.....	54
Tabla 3. Dicotomización de datos demográficos, clínicos y radiológicos de los pacientes con neurocisticercosis.....	62
Tabla 4. Valor de <i>R</i> y <i>P</i> de las pruebas de asociación entre la variabilidad genética y los datos demográficos, clínicos y radiológicos de los pacientes con la prueba de Mantel	63

Resumen

La neurocisticercosis (NC) es una enfermedad provocada por el estado larvario de *Taenia solium* (cisticerco) cuando se aloja en el sistema nervioso central (SNC). La NC es una parasitosis clínica y radiológicamente heterogénea, que puede ser de forma asintomática o generar sintomatología, de leve a severa. Factores genéticos de los parásitos así como del hospedero podrían participar en esta heterogeneidad.

Se han encontrado algunas diferencias genéticas del hospedero asociadas con esta heterogeneidad. En contraste, no se ha explorado la posible participación de diferencias genéticas del parásito relacionadas con la heterogeneidad de la enfermedad.

En este trabajo de tesis se estudió si seis genes expresados diferencialmente en cisticercos de *T. solium* localizados en dos distintos tejidos de un mismo cerdo, identificados por Differential Display, podrían ser confirmados por otras técnicas como RT-PCR en tiempo real o inmunolocalización, y que a su vez, al identificarlos o caracterizarlos, estos genes fueran posibles candidatos para el control de la parasitosis en su etapa larvaria.

En segundo lugar, se evaluaron las variaciones genéticas en cisticercos obtenidos quirúrgicamente de pacientes con neurocisticercosis y se exploró si estas diferencias genéticas se asocian con factores demográficos, clínicos y radiológicos de los pacientes. Un total de 28 cisticercos recuperados de 12 pacientes con NC presentaron diferencias genéticas en el gene mitocondrial *Cytb* que permitieron detectar nueve haplotipos y cuatro haplogrupos. Las variantes parasitarias (haplogrupos) encontradas en pacientes con características clínicas o radiológicas similares fueron genéticamente más cercanas entre sí con respecto a las variantes genéticas parasitarias de pacientes con un diferente perfil de NC, resultado que señala la posible participación del parásito en la heterogeneidad clínica de la enfermedad. No se encontró asociación entre los distintos haplotipos identificados y la heterogeneidad de la NC.

Abstract

Neurocysticercosis (NC) is caused by the larval stage of *Taenia solium* (cysticercus) lodging into the Central Nervous System (CNS). Clinically and radiologically, NC is a heterogeneous disease that may either be asymptomatic or show symptoms ranging from mild to severe. Genetic factors from the parasite and the host could partake in this heterogeneity.

While a number of genetic differences in the host have been found associated to this heterogeneity, the possible role of genetic differences in the parasite in the heterogeneous picture of the disease have not been explored yet.

This work was aimed to study whether six differentially expressed genes in *T. solium* cysticerci from two different anatomic locations from a same pig, identified by Differential Display, could be confirmed by techniques such as RT-PCR or immunolocalization, and whether these genes could eventually be used to control the parasitosis in its larval stage.

Then, the genetic variation in cysticerci surgically excised from NC patients was evaluated, and it was explored whether these genetic differences are associated to the patients' demographic, clinical, and radiological traits. In total, 28 cysticerci recovered from 12 NC patients showed differences in the mitochondrial gene *Cytb*. These differences allowed us to found 9 haplotypes and 4 haplogroups. The parasitic variants (haplogroups) found in patients with similar clinical and/or radiological traits were genetically closer with respect to those variants found in patients with differing NC profile. This result points to the possible role of the parasite in the clinical heterogeneity of the disease. However, no clear association was found between the identified haplotypes and NC heterogeneity.

Glosario de abreviaturas

CC: Cisticercosis

cm: Centímetro

DD RT-PCR: Expresión diferencial de genes mediante RT-PCR

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

DNA: Ácido desoxirribonucleico

IFN-g: Interferón gama

IL: Interleucina

ITS1: Región espaciadora transcrita 1 de los genes ribosomales

ME: Músculo esquelético

mm: Milímetro

mM: Milimolar

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

mtDNA: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

mtRNA: Ácido ribonucleico mitocondrial

NC: Neurocisticercosis

nDNA: Ácido desoxirribonucleico nuclear

pb: pares de bases

RAPDs: Polimorfismos de DNA amplificados al azar

RFLPs: Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción

RNA: Ácido ribonucleico

rDNA: Ácido desoxirribonucleico que codifica para genes ribosomales

RT-PCR: Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa

SAGE: Análisis seriado de la expresión genética

SNC: Sistema nervioso central

TC: Tomografía computarizada

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

μM: Micromolar

Introducción

Cisticercosis y teniasis

La cisticercosis (CC) humana es una enfermedad causada por el estado larvario de *Taenia solium*, el cisticerco, mientras que la infección causada por el estado adulto se conoce como teniasis (Sciutto et al., 2000). La neurocisticercosis es una enfermedad causada por el establecimiento del metacéstodo de *T. solium* en el sistema nervioso central (SNC). La infección se adquiere al ingerir huevos de *T. solium* que después eclosionan en el intestino. Los embriones liberados (oncosferas) penetran en la mucosa intestinal, pasan al sistema circulatorio y se establecen en tejidos sólidos, donde se desarrollan hasta metacéstodos (Fleury et al., 2006 en Larralde y Aluja, 2006).

Complejo teniasis-cisticercosis

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria que afecta al cerdo y al ser humano. La gran mayoría de los casos de cisticercosis ocurren en países en vías de desarrollo en Latinoamérica, Asia y África (Sciutto et al., 2000; Rodríguez-Canul et al., 1999). Los países de Europa occidental progresivamente la controlaron y a principios del siglo XX la erradicaron por medio del desarrollo social y la puesta en marcha de programas de inspección y confiscación de la carne de cerdo contaminada. Sin embargo, esta parasitosis aún está ampliamente distribuida en países no-desarrollados, en donde prevalecen las condiciones que favorecen el ciclo de vida del parásito (Sciutto et al., 2000). La cisticercosis, además de afectar principalmente a clases económicamente desfavorecidas, también amenaza a los sectores sociales privilegiados de países endémicos, y recientemente incluso a los países desarrollados debido a los fenómenos de migración (Sciutto et al., 2000).

Ciclo de vida de *Taenia solium*

En su estadio adulto, *T. solium* es un gusano plano hermafrodita que se adhiere a la mucosa del intestino delgado del ser humano (hospedero definitivo). Al alcanzar la madurez sexual, el parásito intestinal se reproduce por autofecundación, produciendo una gran cantidad de huevos, los cuales son liberados con las heces, contaminando así el ambiente cuando tiene lugar el fecalismo al ras del suelo y al aire libre. El cerdo,

hospedero intermediario, ingiere los huevos al consumir heces portadoras. En los cerdos, los huevos eclosionan al ser parcialmente digeridos en el estómago, liberando las oncosferas, las cuales atraviesan la pared intestinal y se desarrollan en cisticercos en diversos tejidos, incluyendo el músculo esquelético (ME) y el sistema nervioso central (SNC). El ciclo de vida se completa cuando el humano ingiere carne de cerdo mal cocida e infectada con cisticercos, los cuales evaginan y se establecen en el intestino delgado, desarrollándose el estado adulto (Figura 1). El humano también puede adquirir la cisticercosis cuando ingiere huevos en alimentos contaminados con materia fecal de un individuo teniásico, o bien el propio teniásico por autoinfección mediante prácticas higiénicas inadecuadas. En los humanos, el cisticerco puede alojarse en diversos tejidos; cuando el cisticerco se localiza en el SNC causa la enfermedad conocida como neurocisticercosis (NC, Figura 1).

Biología del parásito

Taenia solium pertenece al phylum Platyhelminthes, a la clase Cestoda, al orden Cyclophillidae y familia Taeniidae. El parásito adulto es un gusano plano que habita de forma exclusiva en los seres humanos y mide entre 2 y 7 m de largo. El parásito adulto o tenia se desarrolla después de ingerir cisticercos en carne cruda o poco cocida de cerdo. La cabeza o escólex evagina y se adhiere a la mucosa del intestino delgado por su doble corona de ganchos y las cuatro ventosas. El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173 μm . El cuello se continúa del escólex, y a partir del cuello se forman de manera continua los segmentos o proglótidos que conforman el estróbilo. Los segmentos pueden ser inmaduros o maduros, que son hermafroditas. Al final del estróbilo, los proglótidos son grávidos y contienen cientos de miles de huevos, los cuales se expulsan con la materia fecal. Los huevos son microscópicos; miden alrededor de 30 μm y contienen un embrión hexacanto rodeado por una membrana oncosferal y un embrióforo que resiste las condiciones del ambiente. Cuando los seres humanos o los cerdos ingieren los huevos, los jugos gástricos e intestinales disgregan los bloques embriofóricos y digieren la membrana oncosferal. Los embriones se activan, atraviesan la mucosa del intestino delgado,

circulan y se transforman en cisticercos visibles en alrededor de 2 a 4 meses (Flisser, 2006 en Larralde y Aluja, 2006).

El cisticerco de *T. solium* está formado por una vesícula ovalada y traslúcida, que mide entre 0.5 a 2.5 cm de diámetro. Esta vesícula está llena de un líquido conocido como fluido vesicular; la vesícula además contiene un pequeño escólex invaginado (Slais, 1970 en Larralde y Aluja, 2006). Sobre la pared vesicular se encuentra la superficie tegumentaria, que a través de proyecciones digitiformes llamadas microtricas permite el intercambio de excretas y nutrientes por medio del transportador de glucosa TGTP2 (Rodríguez-Contreras et al., 1998); dependiendo de las condiciones externas, puede utilizar tanto el metabolismo anaeróbico como el aeróbico.

Tanto el material de autopsia como el de biopsia ofrecen la oportunidad de identificar cuatro etapas de involución en el cisticerco: vesicular, coloidal, nodular-granular y nodular-calcificada. En la etapa vesicular, la larva o embrión hexacanto contiene líquido transparente y un escólex invaginado de 4 a 5 mm, envueltos por una membrana delgada y traslúcida. En la etapa coloidal, la pared se hialiniza y el líquido pierde fluidez, adquiere un aspecto lechoso gelatinoide en consistencia, la larva se fragmenta fácilmente y al tacto la estructura es áspero. En la etapa nodular-granular ya no es posible identificar el escólex por el depósito de colágena alrededor de la pared, producto de la reacción inflamatoria; en el microscopio óptico con la técnica tricrómica de Masson, los remanentes de membrana y el escólex se visualizan en rojo brillante y azul, respectivamente. La etapa final, llamada nodular-calcificada, consiste en la total involución y calcificación del quiste, reduciéndose su tamaño a la mitad, con mínima reacción inflamatoria a su alrededor (Fleury et al., 2006 en Larralde y Aluja, 2006).

Clínica en la neurocisticercosis

La NC es una enfermedad pleomórfica que puede cursar en forma asintomática (Fleury et al., 2004; 2006) o presentarse con distintas sintomatologías como cefalea, déficit focal, crisis convulsivas, demencia e incluso puede causar la muerte del paciente. Esta enfermedad es heterogénea con respecto al número de parásitos (pacientes con un

solo parásito o con múltiples parásitos), a la localización del parásito en el SNC (parénquima cerebral, espacio subaracnoideo de la base o en los surcos, en el sistema ventricular, canal espinal e incluso puede presentarse como cisticercosis ocular), (Salgado et al., 1997; García y Del Brutto, 2003). La heterogeneidad también depende del grado de inflamación asociada con la presencia del parásito (Figura 2).

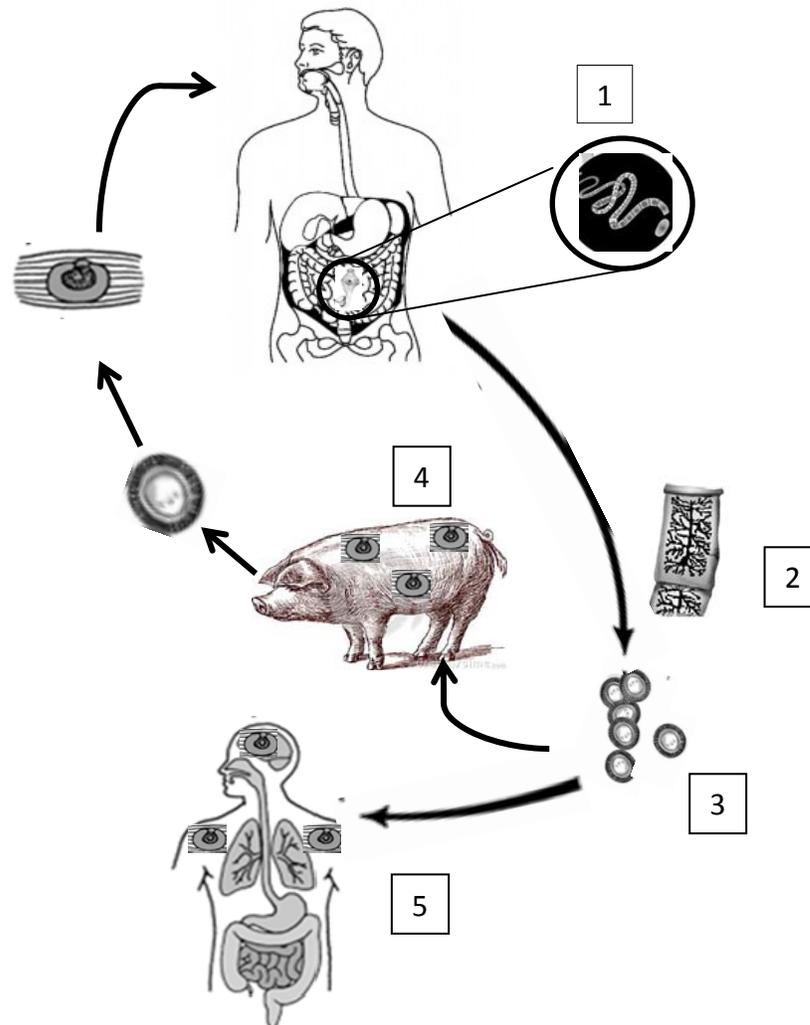


Figura 1 Ciclo de vida de *Taenia solium*. Estado adulto (1). La taenia o solitaria produce miles de huevos, que se expulsan en la materia fecal. El cerdo se infecta al ingerir heces portadoras con segmentos (proglótidos) (2) o huevos (3) del parásito adulto. Cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco, ocasionando la cisticercosis porcina (4). El ciclo se completa cuando el humano consume carne de cerdo insuficientemente cocida e infectada con cisticercos y cada cisticerco tiene el potencial de convertirse en un parásito adulto (1). La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto pueden ocasionar la ingestión de huevos por parte del humano, produciéndose la cisticercosis humana, incluyendo la neurocisticercosis (5).

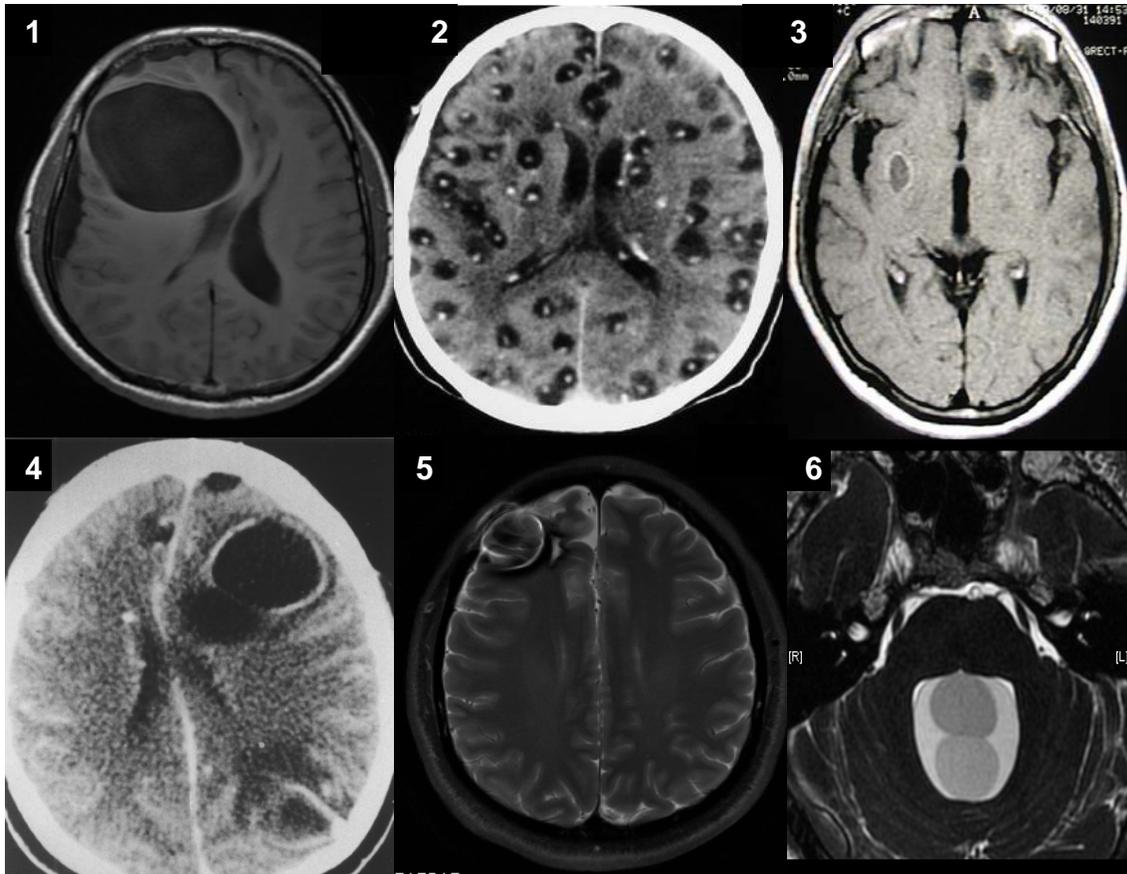


Figura 2. Imágenes de resonancia magnética mostrando heterogeneidad radiológica en la neurocisticercosis. 1) Paciente con un solo parásito; 2) paciente con múltiples parásitos; 3) paciente con parásitos y poca inflamación; 4) paciente con inflamación exacerbada; 5) paciente con un parásito en el parénquima, y 6) paciente con parásitos en los ventrículos (imágenes donadas por las Dras. Agnes Fleury y Graciela Cárdenas del INNN).

En la heterogeneidad de la NC pueden participar diferencias en la intensidad de la exposición al parásito (factores de exposición), así como diferencias en las características biológicas del hospedero y del parásito. Con respecto al hospedero, evidencias clínico-radiológicas señalan la relevancia de factores etarios y sexuales (Saenz et al., 2006; Fleury et al., 2004), mientras que diversas evidencias epidemiológicas sugieren la participación de factores genéticos del hospedero (Del Brutto et al., 1991; Fleury et al., 2006; Verma et al., 2010).

Con respecto a la participación de factores del parásito implicados en la heterogeneidad de la NC, las variaciones genéticas encontradas entre cisticercos recuperados de cerdos procedentes de distintas regiones geográficas señalan su posible participación (Vega et al., 2003; Maravilla et al., 2003). El conocimiento de la variabilidad genética y expresión diferencial de genes de *T. solium* en cisticercos recuperados del SNC de humanos (con distintas presentaciones de la enfermedad) podría permitirnos identificar factores del parásito relacionados con la heterogeneidad clínica y radiológica de la NC.

Prevalencia de cisticercosis humana

Las tasas de prevalencia varían entre países endémicos, pero se estima en menos de 1:1000 para la teniasis humana, 1-10% para la cisticercosis humana (García et al., 1998). En México se detectó NC humana en 1-5% de extensas series de autopsias (Villagran y Olvera, 1988; Rabiela, 1972), en 9 y 9.5% de población abierta de comunidades rurales del Estado de Morelos y Puebla, respectivamente, en estudios epidemiológicos utilizando como criterio diagnóstico los resultados de tomografía computarizada (TC) (Fleury et al., 2003; Fleury et al., 2006; Quet et al., 2011). La NC es la causa más frecuente de epilepsia en pacientes neurológicos (Del Brutto, Sotelo y Román, 1998), y representa la primera causa de epilepsia de inicio tardío (Suástegui-Román et al., 1996; Medina et al., 1990). La NC aún es una enfermedad frecuente en México. En la principal institución hospitalaria del país que asiste a pacientes con patologías neurológicas, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se demostró que su prevalencia se ha mantenido estable en 2-3% durante los últimos 15 años (Fleury et al., 2010), y es la causa de 2.4 a 4.3% de las consultas neurológicas en instituciones especializadas (Jiménez-Marcial y Velásquez-Pérez, 2004).

Capítulo 1

Trabajo de investigación realizado paralelamente

Expresión diferencial de genes entre cisticercos procedentes de músculo esquelético y de diferentes regiones del sistema nervioso central del cerdo

ANTECEDENTES

Expresión de genes

La oportunidad de estudiar la expresión de genes en parásitos y otros patógenos durante un proceso infeccioso es particularmente importante, porque se puede aprovechar el conocimiento molecular de rutas patogénicas para ahondar en el estudio de su función en la supervivencia o proliferación del agente infeccioso en el tejido del hospedero y en la búsqueda de nuevas vacunas o fármacos (Kronstad, 2006).

A pesar de la importancia de *T. solium* en la salud pública, la sanidad alimentaria, la salud humana y la animal, es poco el conocimiento que se tiene sobre su biología molecular, especialmente en la expresión o regulación de genes.

La evaluación de la expresión diferencial de genes podría contribuir críticamente al desarrollo de medidas terapéuticas para enfermedades multifactoriales. En este sentido, estudios similares han permitido identificar que niveles incrementados de ciertas proteínas se correlacionan con la supervivencia del parásito en su hospedero; por ejemplo, la acetilcolinesterasa en *Nippostrongylus braziliensis* (Hussein et al., 2002), una proteína similar a la mucina en *Toxocara canis* (Werner, 1782) y una glicoproteína que contiene fosforicolina en *Acanthocheilonema viteae* (Harnett y Harnett, 2001). Parece que el cisticerco de *T. solium* usa estrategias similares para manipular la respuesta inmune del hospedero, como la producción de una proteasa de cisteína que depleta linfocitos CD4 (Molinari et al., 2000) y el factor metacestoide, que inhibe la producción de IL-2, IFN-g e IL-4. Posibles variaciones en estas proteínas podrían estar involucradas en una diferente capacidad patogénica de los cisticercos.

Adicionalmente, los tejidos de diferentes mamíferos difieren fisiológicamente en términos de pH, grado metabólico y respuesta inmune efectora, entre otros factores. Así, diferentes combinaciones de estos factores podrían determinar ambientes diferenciales en los que el parásito podría instalarse y desarrollarse. Como resultado de estas diferencias, la expresión génica entre cisticercos que requieran diferentes estrategias y mecanismos para lidiar con las diferentes circunstancias que presentan los diferentes tejidos y hospederos pudiera ser diferente; así, diferencias en la expresión génica podrían reflejar e informarnos sobre las diferentes estrategias que utiliza el parásito en diferentes circunstancias ambientales. Por ejemplo, es factible que las estrategias del parásito varíen en grado importante de acuerdo con los factores inmunológicos que enfrente localmente, y que los genes que se expresen con mayor intensidad en diferentes circunstancias reflejen estrategias comunes involucradas en la infección.

Otro aspecto cuyas bases aún se desconocen es el mecanismo que determina la amplia localización del cisticerco en los diferentes tejidos del cerdo y la restringida al sistema nervioso central en humanos (al menos en el continente americano). Esta clara diferencia podría deberse a diferentes variantes genéticas que afecten al humano y al cerdo, o bien a una localización preferencial de las oncosferas en el sistema nervioso central en el ser humano o a una amplia distribución similar en el humano y en el cerdo, pero a una supervivencia de los parásitos limitada al SNC. También podría deberse a una diferente capacidad de expresión de proteínas del cisticerco en ambos hospederos que impliquen diferentes destinos de los parásitos.

Expresión diferencial de genes

Durante un proceso infeccioso ocurre una serie de modificaciones transcripcionales tanto en el parásito como en el hospedero. El resultado de estas modificaciones puede establecer reglas particulares en la relación hospedero-parásito, capaz de determinar el curso de la infección. Así, las diferencias en la presentación de una enfermedad

infecciosa no sólo dependen de variaciones genéticas del agente infeccioso y del hospedero, sino del repertorio de proteínas que cada uno de ellos expresa.

Algunas técnicas para estudiar la expresión genética de los organismos son la hibridación sustractiva (Hedrick, 1984), la transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Saiki et al., 1985; Kawasaki et al., 1988), la secuenciación de extremos de clonas tomadas al azar de una genoteca de expresión (Expressed Sequence Tag, EST) (Adams et al., 1991), la expresión diferencial (Differential Display) (Liang and Pardee, 1992), los microarreglos de DNA (Gene Arrays) (Schena et al., 1995), el análisis seriado de la expresión genética (SAGE) (Velculeascu et al., 1995) y la técnica cuantitativa de RT-PCR en tiempo real (Higuchi et al., 1993).

La identificación de genes del cisticerco de *T. solium* (procedentes de distintas localizaciones) expresados diferencialmente en el hospedero podría también estar asociada con un fenómeno inflamatorio diferencial, como se observa entre los cisticercos localizados en el SNC y en el músculo esquelético. La expresión diferencial de genes puede abordarse a través de la proteómica, o bien mediante el DD-RT-PCR (Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

El DD RT-PCR, basado en una reacción de PCR (Liang and Pardee, 1992; Stein and Liang, 2002) a partir de cDNA, ha resultado de utilidad para la identificación de genes críticos en el desarrollo de organismos (Bryant et al., 1999; Dubrovski et al., 2000), en la modulación de la respuesta inmune (Gao et al., 1999; Kang et al., 1996) y en el estudio de la relevancia de factores químicos o ambientales asociados con la expresión de un gen (Ma et al., 1999; Van Beneden et al., 1999). Este procedimiento también ha sido de utilidad para identificar diferencias específicas en la expresión de genes entre poblaciones de organismos muy relacionados, como en *Echinococcus granulosus* (Zhang et al., 2003), así como diferencias asociadas con la virulencia de parásitos de *Entamoeba histolytica*, "Schaudinn, 1903" (Bruchhaus et al., 2002) y *Leishmania major*, "Rusell, 1927" (Achour et al., 2002).

Utilizando el DD RT-PCR se han logrado identificar en *E. histolytica* (Bruchhaus et al., 2002) y en *T. canis* y *A. viteae* (Harnett and Harnett, 2001) genes asociados con la patogenicidad.

Con el fin de identificar genes del cisticerco de *T. solium* involucrados en el establecimiento del parásito en diferentes compartimentos anatómicos del hospedero intermediario, se evaluó la expresión diferencial de genes de cisticercos de diferentes regiones anatómicas de un cerdo mediante DD RT-PCR.

En dicho trabajo se utilizó un primer de anclaje 5'-T₁₂C-3' para la obtención de cDNA de la subpoblación de mRNA que en su extremo 3' previo a la cola de poliA termina con una G (guanina), así como cuatro primers de amplificación los cuales son decámeros de secuencia aleatoria. Se realizó el DD-RT-PCR en nueve cisticercos de cerdo (tres de músculo esquelético, tres de parénquima cerebral y tres del espacio subaracnoideo). En las reacciones de PCR para cada subpoblación de cDNA se utilizaron cuatro primers de amplificación. Se identificaron un total de 21 bandas expresadas diferencialmente (González, 2007). Cabe mencionar que las 21 bandas tuvieron distinta expresión en los tres cisticercos de cada localización anatómica; por ejemplo, de los cuatro primers de amplificación, con el primer 1 se obtuvieron 9 bandas expresadas diferencialmente, las cuales se expresaron en los tres cisticercos de espacio subaracnoideo, en los tres del parénquima y en ninguno del músculo esquelético; con el primer 2 se obtuvo una sola banda expresada diferencialmente, la cual estuvo presente en los seis cisticercos del SNC y no en los de ME. Finalmente, del primer 4 obtuvieron diez bandas expresadas diferencialmente, de las cuales una se expresa en seis cisticercos del SNC y otras dos bandas se expresan exclusivamente en los cisticercos de ME. Este trabajo señaló la relevancia de variaciones en la expresión de genes dependiendo de la localización del cisticerco, variaciones que podrían asociarse con diferencias en la respuesta inflamatoria que ocurre alrededor de los cisticercos en distintos compartimentos del hospedero.

JUSTIFICACIÓN

Durante el establecimiento y el desarrollo de un parásito en el hospedero, es factible que aquél pueda modular el entorno para favorecer su desarrollo a través de la expresión de un conjunto de moléculas idóneas para tal fin.

La identificación de las moléculas que modulan diferencialmente el ambiente en que el parásito se desarrolla permitiría identificar posibles blancos de interés para el control de la parasitosis.

Considerando estas posibilidades y los avances alcanzados en la obtención de fragmentos génicos que se expresan diferencialmente entre cisticercos procedentes de distintas regiones anatómicas del cerdo, se completará esta fase del trabajo a través de la identificación y caracterización de los genes que se expresaron diferenciadamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Evaluar las moléculas que el cisticerco expresa diferencialmente según el ambiente en el que se instala y desarrolla.

HIPÓTESIS

El cisticerco de *Taenia solium* expresa un repertorio de RNA mensajeros relevantes para su establecimiento, que difiere según se localice en el en el músculo esquelético o en el sistema nervioso central.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar los genes que se expresan diferencialmente por cisticercos localizados en el sistema nervioso central con respecto a los localizados en el músculo esquelético.

Objetivos particulares

Confirmar la expresión diferencial de genes en cisticercos de distintas regiones anatómicas de un cerdo.

Identificar los genes a los que corresponden los RNA transcritos, diferencialmente expresados.

Evaluar si al nivel de las proteínas se conservan las diferencias en la expresión de los RNAs encontrados entre los cisticercos procedentes de músculo esquelético y cerebro de cerdos infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Expresión diferencial de genes de cisticercos en cerdos infectados naturalmente

En el trabajo de maestría en ciencias realizado por Antonio Ernesto González González (2007) se identificaron 22 bandas expresadas diferencialmente en cisticercos de diferentes regiones anatómicas de cerdo (ME vs. SNC) mediante el método de Diferencial Display (DD RT-PCR) reportado por Liang y Pardee (1992).

De las 22 bandas identificadas como expresadas diferencialmente reportadas en 2007 (González, 2007) se aislaron seis que cumplían la condición de estar expresadas en los duplicados de cada cisticerco y en tres cisticercos de cada región anatómica estudiada, y estar subexpresadas en la región anatómica opuesta. Así, se eligieron cuatro bandas del SNC y 2 de ME. Los productos de amplificación se enviaron a secuenciar, y con ayuda de la base de datos disponible en el NCBI y del genoma de *Taenia solium* se identificaron los genes a los que corresponden algunas secuencias. Los genes se re-amplificaron con los primers correspondientes de anclaje (5'- AAG CTT TTT TTT TTT C -3') y los primers de amplificación decámeros L1 (5'- TCG ATA CAG G -3') y L4 (5'- CTG ATC CAT G -3'). Las condiciones de PCR fueron similares a las usadas en la sección de RT-PCR en el punto final de este análisis.

Los productos de PCR se ligaron en el vector pCR2.1 de Invitrogen y se clonaron en células de *E. coli* de acuerdo con el protocolo del Anexo 3. Se aislaron cinco colonias blancas independientes y se pusieron a crecer toda la noche en medio LB líquido con antibiótico para hacer extracción de DNA plasmídico. La presencia de los insertos de cada ligación se confirmó y se mandaron a secuenciar dos colonias independientes en

el secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems. Este secuenciador se basa en un sistema automatizado de electroforesis capilar. Tiene capacidad de lectura para 400-600 bases por corrida y está disponible en el IIB de la UNAM, con los primers universales T7 forward y M13 rev.

Los electroferogramas de las secuencias de cada inserto de interés se limitaron en un extremo por la secuencia del primer de anclaje y por el otro extremo por el primer de amplificación.

Se realizó un Blastn (alineamiento de secuencias de nucleótidos) a las secuencias obtenidas de la secuenciación en el servidor de NCBI; cinco de las secuencias no mostraron homología con otros genes en el gene-bank, y se buscó en las bases de datos del proyecto de secuenciación del genoma de *T. solium*, en donde se logró identificar en la base de ESTs dos de los genes secuenciados. Las secuencias identificadas correspondieron a la proteína Organic Anion Transporter Protein, de 300 pb, a la proteína Sec14Tsol, de 200 pb, previamente estudiada por Montero et al., 2007, y a la Importin 7, de 450 pb. Todos los RNAm se expresaron en cisticercos procedentes del SNC y no de ME.

Para confirmar la expresión diferencial de estas proteínas (Sec14TSol, Importina 7 y Proteína Transportadora de Aniones Orgánicos) en cisticercos de músculo esquelético contra los cisticercos de SNC de cerdos se diseñaron los primers para realizar ensayos de RT-PCR punto final y de RT-PCR en tiempo real.

Obtención de cisticercos recuperados de cerdos cisticercosos naturalmente infectados para los estudios de RT-PCR en punto final y RT-PCR en tiempo real

De seis cerdos naturalmente infectados se colectaron cisticercos de las dos regiones anatómicas: tres de ME y tres de SNC, se lavaron en PBS 1X, se secaron con papel filtro y se guardaron individualmente en tubos de 0.6 mL en nitrógeno líquido. Los cisticercos se almacenaron a -80° C hasta su utilización para la extracción de RNA total. Se extrajo RNA total (Anexo 2). Se realizó RT-PCR en punto final (Anexo 3) y RT-

PCR en tiempo real a tres cisticercos de ME y tres de SNC, para confirmar la expresión diferencial de los tres genes identificados en los parásitos de cada condición, de acuerdo con los protocolos que a continuación se mencionan para cada una de las técnicas.

qRT PCR de genes en cisticercos de cerdos

Amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la realización de la PCR en tiempo real se empleó el termociclador LightCycler 1.5 (Roche); el sistema de detección fue el fluorocromo SYBR® Green I.

La reacción se realizó de la siguiente manera, tomando en cuenta que el volumen de agua y MgCl₂ varió de acuerdo con el gen que se amplificó. Se llevó a un volumen final de 10 µL, colocando 3.8 µL de agua desionizada estéril, 1.2 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de la mezcla de los iniciadores correspondientes (20 µM), 1 µL de la mezcla DNA master SYBER Green I de Roche y 3 µL de cDNA diluido 1:10 de cada una de las muestras a utilizar.

Los capilares se colocaron en el termociclador Light Cycler® 1.5 (Roche) y se sometieron al siguiente programa de amplificación: 1 ciclo a 95 °C durante 5 min, 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 10 s, 56 °C durante 10 s y 72 °C durante 10 s (en este punto se realizó la medición de la fluorescencia); posteriormente se incrementó la temperatura de 60 °C hasta 95 °C a una velocidad de 0.1 °C/s, y durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de disociación de los productos. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Los genes y los iniciadores utilizados se muestran en la Tabla 1.

Para analizar la eficiencia de la reacción se realizaron curvas de concentración de cDNA, utilizando un cDNA previamente obtenido con tres concentraciones distintas (concentrado, diluido 1:10 y diluido 1:100).

Tabla 1. Genes amplificados en RT-PCR en tiempo real.

Nombre del gen	Secuencia de iniciadores (5'-3')	Tamaño del amplicón
β -Actina	F: CAACGCTATCATGAAGTGCG R: TCTCCTTCTGCATACGGTCTG	113 pb
Sec14Tsol	F: GGTGGATGAATCGAAGAGGC R: CGACAGCCAGTTTGACGTATG	110 pb
Importina7	F: TCAAGGATGCATACGCCG R: CAGTGTGCTATCAACCGCTA	117 pb
Proteína transportadora de aniones	F: AGTGGACACCCTCTGGCAT R: GCTGTGCCTTGCATAGCTTT	108 pb

Se obtuvieron los valores del ciclo umbral (CT) de cada una de las muestras y, utilizando al gen de la β -actina como control, se calcularon los valores de Δ CT de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\text{CT}(\text{gen control} - \text{problema})} \text{ (Pfaffi, 2001)}$$

Inmunolocalización de la proteína Sec14Tsol

Para el caso de la secuencia que presentó un 100% de identidad con el gen Sec14Tsol reportado por Montero et al. (2007), se realizó un estudio de inmunolocalización para confirmar los resultados obtenidos, utilizando cortes histológicos de cisticercos de cerdos de las regiones anatómicas ME y SNC, siguiendo la metodología utilizada por Rosas et al. (1998).

RESULTADOS

Expresión diferencial de genes de cisticercos de cerdo

En estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación se encontraron 21 amplificadores de cDNA que se expresaron diferencialmente entre cisticercos procedentes de músculo esquelético y procedentes del cerebro de un cerdo infectado naturalmente con cisticercos de *T. solium*. Las bandas se extrajeron y sólo las secuencias de seis bandas pudieron ser reamplificadas, ligadas y clonadas exitosamente. Los productos de amplificación se secuenciaron por duplicado.

Al hacer blast en el servidor del "Gene Bank" de las seis secuencias, sólo una de las seis mostró homología con una secuencia previamente reportada. Esta secuencia corresponde a la proteína de unión a lípidos (Sec14Tsol), que se expresó en cisticercos del SNC y no cisticercos de músculo esquelético. La proteína Sec14Tsol puede tener funciones en el tráfico de lípidos en la membrana del cisticerco (Montero et al., 2007).

Las otras cinco secuencias, al no mostrar homología con moléculas reportadas en Gene Bank, se analizaron utilizando las bases de datos del proyecto del genoma de *T. solium*; sólo se identificaron dos secuencias: la proteína de transporte aniónico (TAO) y la Importina 7.

En los ensayos de RT-PCR punto final no se encontró que la expresión de los genes fuera diferencial en los dos distintos tejidos, mientras que a través de los ensayos de RT-PCR en tiempo real se encontró que el gen Sec14Tsol se encuentra sobreexpresado en cisticercos de SNC y del ME, mientras que los genes de Importina 7 y Proteína Transportadora de Aniones se encuentran subexpresados en cisticercos procedentes de ambos tejidos, aunque para el gene TAO se observó una mayor expresión en cisticercos procedentes de ME con respecto a los procedentes del SNC (Figuras 3 y 4).

Al hacer el análisis de expresión de los tres genes de parásitos del SNC con respecto a los de ME, encontramos que al gen Sec14Tsol está sobreexpresado hasta 8 veces más que los otros dos genes (Figura 4).

Considerando que de los tres genes considerados sólo uno había sido previamente estudiado, por el grupo de la Dra. Teresa Gárate, en España (Sec14Tsol), para ahondar en el estudio de la expresión diferencial se estableció una colaboración con la Dra. Gárate, quien nos proporcionó el anticuerpo policlonal anti-Sec14 Tsol. Se realizó la inmunolocalización de la proteína Sec14 Tsol en cisticercos de músculo esquelético y SNC de cinco cerdos naturalmente infectados usando el anticuerpo policlonal a una dilución de 1:5000, de acuerdo con el protocolo reportado por Rosas et al. (1998), encontrando un resultado contrario a lo obtenido en el DD RT-PCR, ya que el transcrito se encontró sobreexpresado en cisticercos de SNC y subexpresado en cisticercos de músculo esquelético, y en la inmunolocalización se observó poca o nula señal de la proteína en cisticercos de SNC y con una buena señal en cisticercos de músculo esquelético (Figura 5).

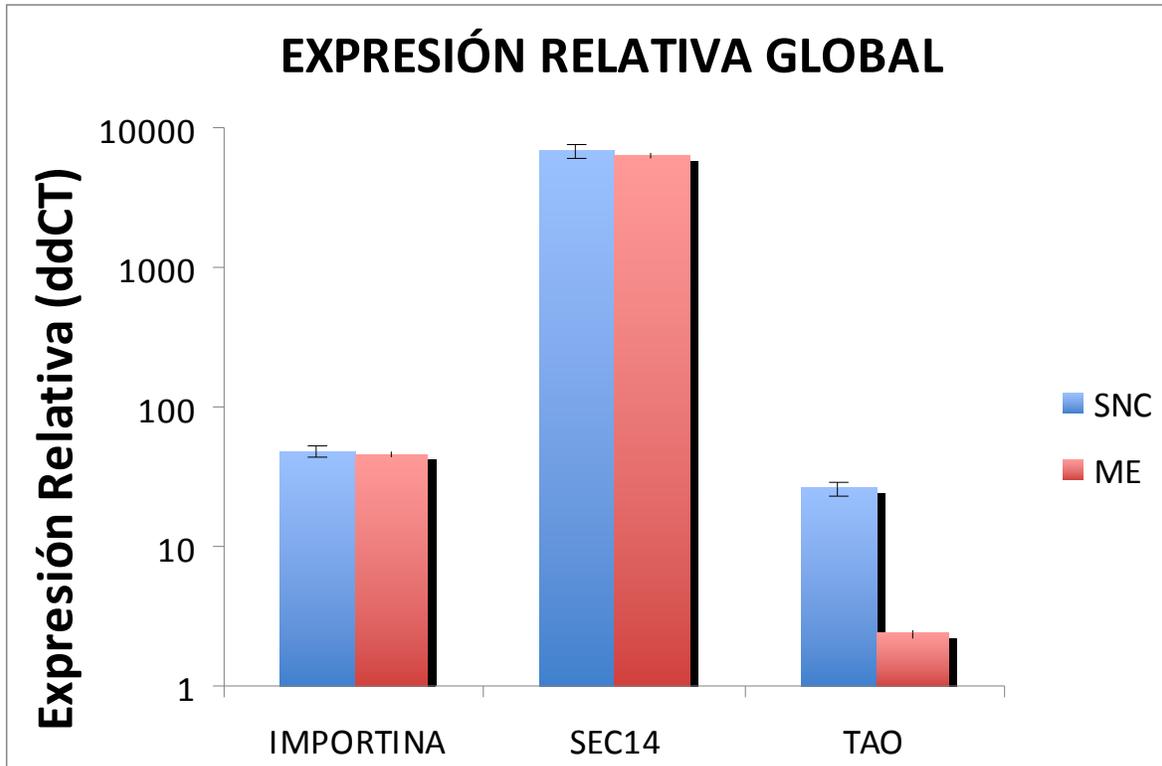


Figura 3. Expresión diferencial de genes mediante RT-PCR en tiempo real logarítmica. Gráfica del nivel de expresión diferencial de los genes Importina 7, Sec14Tsol y Proteína Transportadora de Aniones Orgánicos. Se muestra el nivel de expresión de cada gen en parásitos de las dos localizaciones anatómicas de los cerdos. Se observan de forma logarítmica, por lo que el gen Sec14Tsol se expresa en mayor proporción que los genes Importina 7 y Transportadora de Aniones Orgánicos. Los tres genes muestran menor expresión en los parásitos de ME.

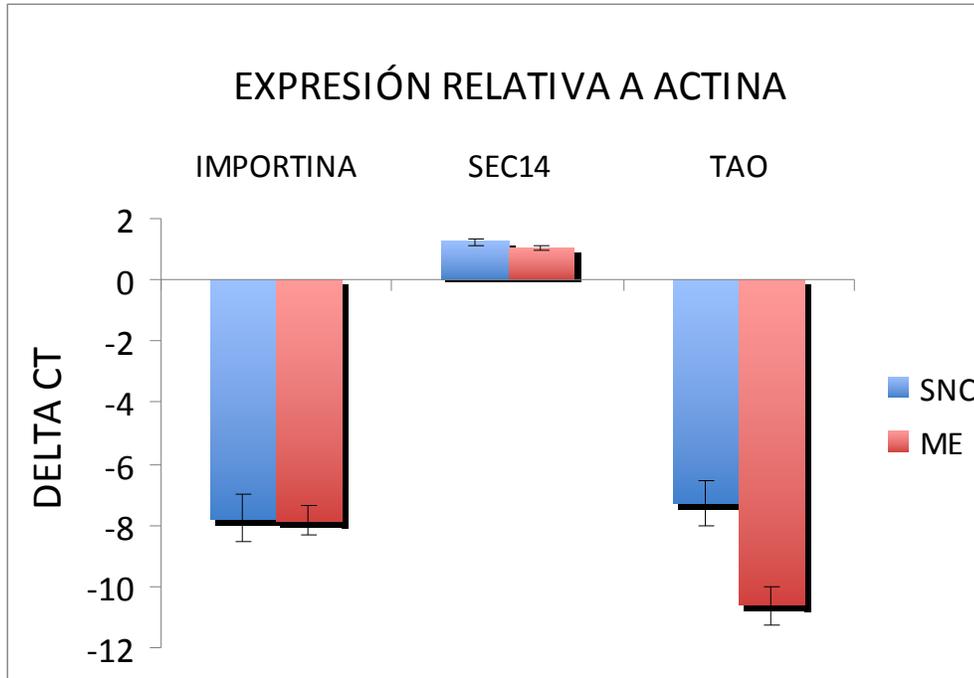


Figura 4. Expresión diferencial de genes mediante RT-PCR en tiempo real. Gráfica del nivel de expresión diferencial de los genes Importina 7, Sec14Tsol y Proteína Transportadora de Aniones Orgánicos con referencia al gen de expresión constitutiva β -actina.

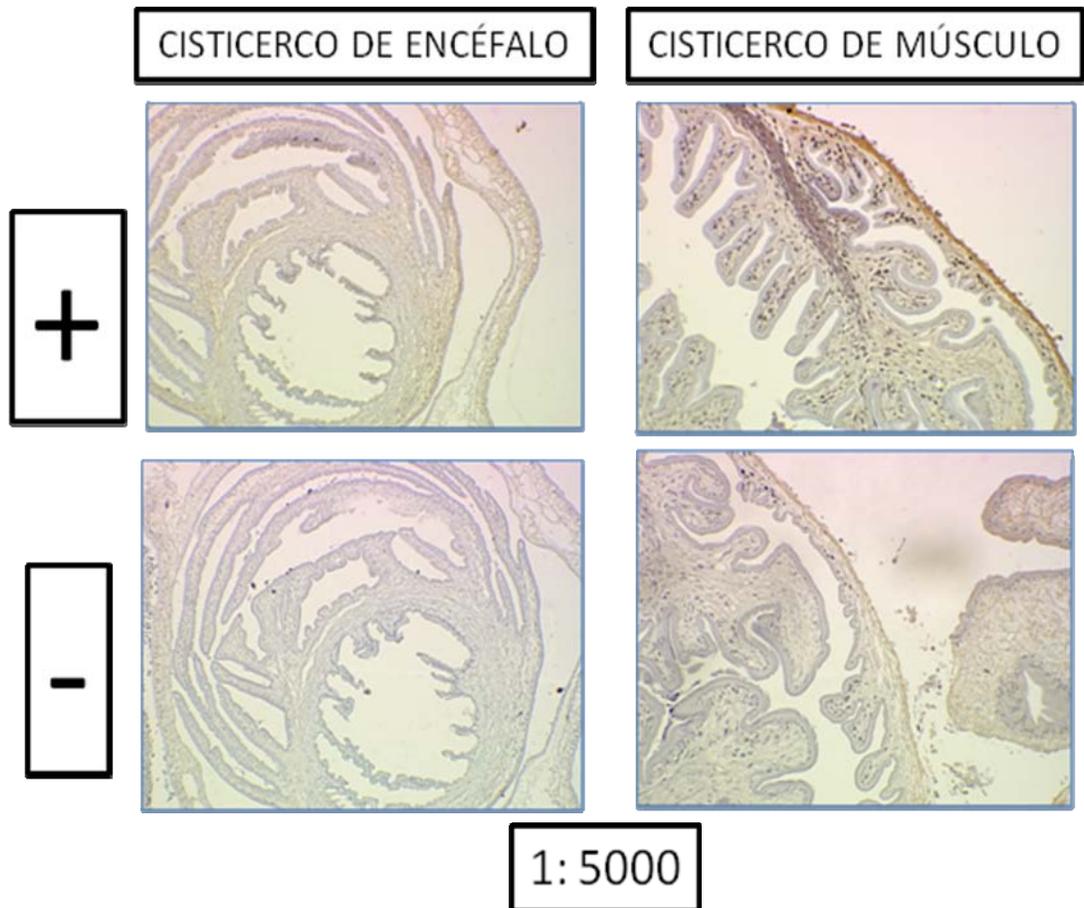


Figura 5. Imágenes de inmunlocalización de proteína Sec14 Tsol. Se muestran las imágenes representativas de ensayos de inmunolocalización con el anticuerpo policlonal hecho en conejo antiproteína Sec14 Tsol. La proteína se localizó en cisticercos de músculo (+) al nivel del tegumento del cisticerco, en cisticercos de encéfalo (+). No se detectó la proteína utilizando un suero de conejo no inmunizado (control negativo) para ambos casos.

DISCUSIÓN

El objetivo de esta parte del trabajo de investigación consistió en evaluar y confirmar la expresión diferencial de genes de cisticercos procedentes del SNC y del ME. Se sabe que la expresión de genes depende no sólo de variaciones genéticas, sino también de modificaciones postranscripcionales. Considerando las variaciones en la manifestación de la respuesta inflamatoria en cisticercos localizados en el SNC con respecto al ME, nos preguntamos si estas variaciones en la respuesta podrían asociarse con variaciones en la expresión de proteínas del parásito que promovieran una respuesta inflamatoria diferente. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación mostraron a través de DD RT-PCR que los cisticercos de *T. solium* procedentes del cerebro de cerdos infectados mostraban un patrón de transcripción de genes diferente de aquellos recuperados del ME. Estas diferencias se centraron en la expresión de 21 bandas, de las cuales sólo en seis (cuatro en cisticercos del SNC y dos en los de ME) pudo recuperarse, reamplificarse, clonarse y secuenciarse el material genético. De las seis bandas sólo pudo identificarse la proteína de tres de ellas, que corresponden a la proteína Sec14Tsol, la Importina 7 y la Proteína Transportadora de Aniones Orgánicos. De las tres proteínas mencionadas concentramos el estudio en la proteína Sec14Tsol, considerando que es una proteína importante en la unión de lípidos y podría participar en el tráfico de este tipo de moléculas a la membrana.

Los cisticercos recuperados del SNC del cerdo mostraron una expresión diferencial del transcrito de esta proteína, mientras que los cisticercos recuperados de ME no la presentaron. Estos datos se confirmaron mediante PCR en tiempo real. Para evaluar la expresión diferencial al nivel de la proteína se realizó un ensayo inmunohistoquímico en cortes de cisticercos recuperados de ambos tejidos. Los estudios por inmunohistoquímica no confirmaron los hallazgos del DD RT-PCR y RT-PCR en tiempo real. Esta discrepancia entre la expresión del transcrito y de la proteína podría deberse a que el transcrito tiene mecanismos de regulación, como modificaciones postraduccionales, o a que en el encéfalo hay mayor cantidad de lípidos que en el músculo esquelético y que por interacciones lípidos-proteína (Sec14 Tsol) los sitios que

son blanco del anticuerpo policlonal para la proteína no sean reconocidos por éste y no se detecte la proteína en los cisticercos del encéfalo de los cinco cerdos, por lo cual hay que confirmar la expresión diferencial de este gen mediante RT-PCR al nivel del transcrito o al nivel de la proteína con una inmunolocalización con microscopía de transmisión de electrones como la reportada por Gobert et al. (1996).

La expresión diferencial del transcrito de Sec14Tsol pueden deberse al microambiente de cada cisticerco, ya que entre los hospederos existe heterogeneidad nutricional, distinta carga genética, dimorfismo sexual, respuesta inmune e incluso que los parásitos son de diferente estirpe, por lo que estas variables podrían influir en la expresión de genes de cada individuo evaluado. En otros parásitos se ha encontrado que la variabilidad genética puede definir factores como la virulencia, el ciclo de vida, el hospedero y la resistencia a fármacos (Thompson et al., 1996), pero en este caso, al ser los parásitos genéticamente iguales, variaciones en su expresión de proteínas, capacidad patogénica o resistencia a fármacos pudiera deberse a factores microambientales propios del tejido más que a diferencias genéticas del parásito.

Capítulo 2. Identificación de factores genéticos del cisticerco de *Taenia solium* relacionados con su localización y su grado inflamatorio en la neurocisticercosis

ANTECEDENTES

Aspectos evolutivos y de variabilidad genética del género *Taenia*

Taenia solium pertenece al grupo de los eucéstodos, que se caracterizan por requerir dos mamíferos en su ciclo de vida como hospederos obligatorios: un herbívoro u omnívoro como hospedero intermediario, y un carnívoro como hospedero definitivo. Evidencias filogenéticas indican que el género *Taenia* afectó a homínidos africanos antes de que ocurriera la domesticación y el desarrollo de la agricultura. Se ha propuesto que el ancestro común del género *Taenia* pudo haber surgido desde hace un millón de años en herbívoros de África como antílopes, pudiendo haber sido los hospederos intermediarios leones y hienas que se alimentaban de estos herbívoros (Hoberg et al., 2001). Desde África el parásito fue llevado por sus hospederos a otros continentes, como Europa y Asia y posteriormente a América. A la fecha se han reportado 42 especies y tres subespecies en el género, clasificadas con base en los hospederos a los que infectan en el estado larvario, en la fase adulta del parásito y en sus características morfológicas. De estas 42 especies, las más estudiadas son las que afectan al hombre en su fase adulta (*Taenia solium*, Linnaeus 1758; *Taenia asiática*, Eom and Rim, 1993, y *Taenia saginata*, Goeze, 1782), siendo el hospedero intermediario obligatorio el cerdo para las dos primeras y los bovinos para *Taenia saginata*. Esto debido a su impacto en la salud pública, la sanidad alimentaria, la salud humana y animal.

La distribución actual, la biología y la relación hospedero-parásito de *T. solium*, *T. saginata*, *T. asiática* y otras especies del género *Taenia* pueden deberse a las historias de asociación con sus respectivos hospederos y a la historia de distribución geográfica de éstos, ya que se ha descrito una relación monofilética entre las especies del género cuando se compararon con la especie más antigua *Taenia mustelae* (Gmelin, 1790).

La hipótesis más aceptada acerca de la parasitosis en humanos por especies del género *Taenia* dice que se estableció en forma definitiva con la domesticación del hospedero intermediario, en especial el cerdo, inicialmente en Asia y luego en el resto del mundo (Larralde & Aluja, 2006; Hoberg et al, 2001). Las 42 especies de tenia (con tres subespecies) han realizado diferentes saltos interespecie para llegar a su hospedero definitivo, pasando por mustélidos, felinos, armadillos, cánidos y hienas (Hoberg, 2006).

Algunos resultados de inferencias filogenéticas sugieren que *T. solium* emergió de ancestros adquiridos en relaciones hospedero-parásito entre cerdos-hienas, mientras que *T. saginata* emergió de ancestros adquiridos de las relaciones hospedero-parásito existentes entre bovinos-felinos. Así mismo, se sabe que *T. saginata* y *T. asiatica* son especies hermanas que divergieron aproximadamente hace un millón de años (Hoberg, 2001; Michelet and Dauga 2012), mientras que los genotipos mitocondriales africano/americano y asiático de *T. solium* divergieron hace 359 000 años.

En México sólo se ha reportado la presencia de dos especies del género *Taenia*: *T. solium* y *T. saginata*. Se ha documentado que *T. solium* llegó al Nuevo Mundo hace al menos 500 años, traída por los conquistadores europeos (Crosby, 1972), consolidando su presencia biológica en México a través de la explosión numérica de sus hospederos intermediarios (cerdo) y definitivos (humano).

Un caso particular lo constituye *T. asiatica*, una especie que al igual que *T. solium* afecta al ser humano produciendo NC con manifestaciones clínicas muy similares, aunque se caracteriza por invadir preferentemente el tejido subcutáneo de los humanos afectados. *Taenia asiatica* fue descrita con base en la morfología del estadio larvario y adulto, y apenas en 1994 se reconoció como una nueva especie con base en los estudios de la secuencia del dominio (D1) del gen que codifica para la subunidad mayor del RNA ribosomal 28S, del gen mitocondrial citocromo C oxidasa 1 (*Cox 1*) y de la evaluación mediante RFLPs PCR de la región espaciadora transcrita 1 (*ITS1*) de los genes ribosomales (McManus and Bowles, 1994; Bowles and McManus, 1994).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta necesaria en muchos campos de la biología, como el estudio de la evolución, la ecología, la biomedicina, las ciencias forenses y la diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer de manera indirecta las proporciones de genes en las poblaciones naturales, como los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de DNA. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad para detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples, y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

DNA mitocondrial (mtDNA)

El genoma mitocondrial (mtDNA) codifica para 12 o 13 subunidades de enzimas mitocondriales de la cadena de fosforilación oxidativa, dos RNAr y 22 RNAt (Nakao et al., 2000). El mtRNA de animales carece de intrones y se transcribe como RNA policistrónico, que se parte en RNA monocistrónico antes de la traducción (Stansfield, 1992). El DNA de la mitocondria es especialmente importante para trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional genética, estrechamente relacionada con el linaje, porque es de herencia uniparental y no se recombina. También nos permite inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies (Dirienzo and Wilson, 1991). Los ejemplos usados en taénidos son la NADH deshidrogenasa subunidad 1 (*ND1*), citocromo oxidasa subunidad 1 (*CO1*) y el citocromo B (*Cytb*) (Gasser et al., 1999).

DNA nuclear (nDNA)

En eucariontes, la mayor parte de la información genética se encuentra contenida en el núcleo de la célula. El nDNA se encuentra empaquetado y asociado a proteínas denominadas histonas, conformando los cromosomas. El nDNA contiene regiones únicas de una sola copia y no únicas duplicadas o regiones repetitivas (Stansfield, 1992). Se considera que los organismos diploides tienen dos copias de cada región genética (locus) en los pares homólogos de los cromosomas, llamadas alelos, sin tener

en cuenta si contienen regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones o regiones intergénicas). En los taénidos se ha reportado el uso de los marcadores nucleares como el *ITS1*, el *HDP2* y recientemente del gen *Ag2* (Bowles and McManus, 1994; Harison et al., 1990; Sato et al., 2011).

DNA ribosomal (rDNA)

El rDNA puede encontrarse en mitocondrias, cloroplastos y núcleos. Contiene la información para el RNA que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El rDNA se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rDNA, 5.8 rDNA y 28 rDNA), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (*ITS1* e *ITS2*). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica. Bowles and McManus (1994) utilizaron el *ITS1* por primera vez en taénidos.

RAPDs

Los polimorfismos de DNA amplificados al azar (RAPDs, de las siglas en inglés Random Amplification of Polymorphic DNA) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de DNA en una gran variedad de especies. Los RAPDs se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido, y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios (Williams *et al.*, 1990).

Los RAPDs son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar el tamaño efectivo, el aislamiento reproductivo y los niveles de fecundación cruzada (Otero *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1998). Una aplicación paralela es la detección de

uniformidad genética con un marcador eficiente y rápido, lo cual puede ser útil en la determinación de estabilidad en programas de reforestación (Otero *et al.*, 1997).

RFLPs

El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, de las siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) fue el primer marcador de DNA utilizado por biólogos poblacionales (Parker *et al.*, 1998). Este método expresa diferencias específicas del DNA que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas (de origen bacteriano) reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el DNA, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente, cualquier DNA que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez and Kahl, 2000).

RFLP-PCR

Los RFLPs son causados por rearrreglos del DNA, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que genera una ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto se detecta a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del DNA genómico. Con el producto amplificado de PCR se realiza una digestión con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes de la digestión se separan por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, o de acrilamida teñidos con nitrato de plata (Karl *et al.*, 1992); este método es más barato y rápido que el anterior.

Secuenciación de DNA

Los análisis más detallados para el estudio de DNA pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos; actualmente, el uso de secuencias es muy común. Un área donde se ha utilizado ampliamente la secuenciación del DNA es el análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos. Este método incluye

cuatro pasos: i) identificar secuencias que tengan la variación necesaria; ii) aislar y purificar un número elevado de copias de la secuencia (ya sea por clonación o amplificación); iii) secuenciar, y iv) alinear la secuencia.

De los marcadores moleculares mencionados anteriormente se han utilizado diferentes secuencias para evaluar relaciones filogenéticas, epidemiología molecular y la variación genética en céstodos de los géneros *Echinococcus* y *Taenia*, tanto en parásitos de muestras clínicas como en huevos de taénidos (McManus, 2006).

Para el diagnóstico diferencial de *T. solium* y *T. saginata* se mencionan a continuación diferentes estudios en los que se han utilizado técnicas de biología molecular, tales como sondas de DNA (ácido desoxirribonucleico) y PCR. En 1990, Harrison *et al.* clonaron dos sondas de DNA no codificante, HDP1 y HDP2, a partir de una genoteca genómica de *T. saginata* que permitieron, mediante hibridación, la identificación diferencial de los dos taénidos que infectan al hombre. Igualmente, Chapman *et al.* (1995) clonaron a partir de genotecas genómicas de *T. solium* y *T. saginata* dos sondas, pTsol-9 y pTsag-16, específicas de *T. solium* y *T. saginata*, respectivamente, logrando distinguir entre las dos especies.

La primera PCR aplicada para diferenciar especies de *Taenia* fue desarrollada por Gottstein *et al.*, en 1991, la que identificaba específicamente a *T. saginata*. Posteriormente otros grupos optimizaron PCRs que diferenciaban *T. saginata* de *T. saginata asiatica* (Zarlenga *et al.*, 1991; Bowles and McManus, 1994). En cuanto a *T. solium*, a partir de la secuencia de la sonda de HDP2 (Harrison *et al.*, 1990) se diseñó una “multiplex PCR” que permitió la realización de un diagnóstico diferencial especie específico de *T. solium* y *T. saginata*. (González *et al.*, 2000; González *et al.*, 2002a).

Esta PCR se utilizó para la identificación de aislados de tenias procedentes de distintas zonas geográficas (González *et al.*, 2002b). Paralelamente, Mayta *et al.* (2000) propusieron la detección diferencial de *T. solium* y *T. saginata* mediante una PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), basada en la amplificación del gen

5.8S ribosomal, además de los espaciadores intergénicos *ITS1* e *ITS2*, y la digestión posterior con las enzimas *Alu I*, *Dde I* y *Mbo I*. En ese periodo se desarrolló una PCR-RFLP que amplifica la secuencia 12S ribosomal del DNA mitocondrial, seguido por digestión con la enzima *Dde I*, que distingue a *T. solium* de *T. saginata* (Rodríguez-Hidalgo *et al.*, 2002). Finalmente, en los últimos años la técnica PCR no sólo se ha empleado en la detección de infecciones producidas por *T. saginata* y *T. solium* sino también en el estudio de la variabilidad génica inter- e intraespecie en diferentes aislados geográficos de ambos parásitos. Así, Hancock *et al.* (2001) amplificaron y secuenciaron, de forma parcial, el gen *CO1*, el espaciador transcrito interno 1 (*ITS1*) y el gen que codifica el antígeno diagnóstico Ts14 (Tsang *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1999, 2000) a partir de DNAg de cisticercos extraídos de cerdos originarios de Perú, Colombia, México, India, China y Filipinas. La variación encontrada al nivel nucleotídico fue mínima entre aislados geográficos de *T. solium* cuando se emplearon marcadores moleculares *CO1* y *Ts14*; también fueron mínimas las diferencias obtenidas con el marcador *ITS1*. Además estas variaciones se establecieron entre los cisticercos de un mismo país y no entre los distintos aislados geográficos.

Por otro lado, las secuencias de DNA mitocondrial de los genes citocromo c oxidasa 1 (*Cox 1*) y NADH deshidrogenasa 1 (*Nadh1*) se han utilizado ampliamente en biología evolutiva, genética de poblaciones y filogenética en los géneros *Echinococcus* y *Taenia*. En los genes de *Cox 1* y *Nadh1* se han identificado nueve genotipos de la especie *E. granulosus*, del G1 al G9, con diferente grado de virulencia, en una misma o diferentes especies de hospederos (Bowles *et al.*, 1992, 1994; Bowles and McManus, 1993, 1994; Scott and McManus, 1994; Scott *et al.*, 1997). Utilizando los genes mitocondriales *Cox 1* y *Cytb* se definieron dos genotipos en *T. solium*, el asiático y el afroamericano (Nakao *et al.*, 2002).

Recientemente se ha confirmado la descripción de estos dos clados geográficos de *T. solium* (Nakao *et al.*, 2002) a nivel nuclear (Sato *et al.*, 2011) al identificar en el gen *Ag2*, que codifica a un antígeno de glicoproteínas usado para inmunodiagnóstico, tres sitios con sustituciones nucleotídicas en el intrón 1 del gen en las posiciones 50, 51 y

55, que se correlacionan con las diferentes localizaciones geográficas de los parásitos (Figura 6).

Si bien no se ha explorado la posible relevancia de la variabilidad genética en cisticercos de *T. solium* y la enfermedad, su existencia se ha documentado extensamente utilizando la técnica de RAPDs, mediante la cual se encontraron diferencias genéticas entre cisticercos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas, tanto entre cisticercos del Centro y el Sureste de México y de Madagascar (Vega et al., 2003), como entre cisticercos de México y Centroamérica (Maravilla et al., 2003). Estudios anteriores confirmaron la existencia de variabilidad genética aun en cisticercos de una misma región geográfica (Bobes et al., 2010). Aunque no se ha explorado si estas diferencias podrían participar en la heterogeneidad de la enfermedad, la existencia de diferentes formas de cisticercosis, en particular en el humano, en las diferentes regiones comparadas (México, Madagascar, Tanzania y Honduras) permite suponer la factibilidad de esta hipótesis.

La posibilidad de que diferentes subpoblaciones del parásito puedan infectar al cerdo o al hombre se exploró más recientemente comparando la variabilidad genética de los parásitos obtenidos de hospederos humanos con NC con la de parásitos provenientes de cerdos cisticercosos (Hinojoza-Juárez et al., 2008). Utilizando una muestra de 13 cisticercos procedentes de pacientes con NC y de 24 cisticercos procedentes de cerdos infectados, los autores concluyeron que hay similitud entre los parásitos de humanos y de cerdos mediante la evaluación de los genes *Cox1* e *ITS1*.

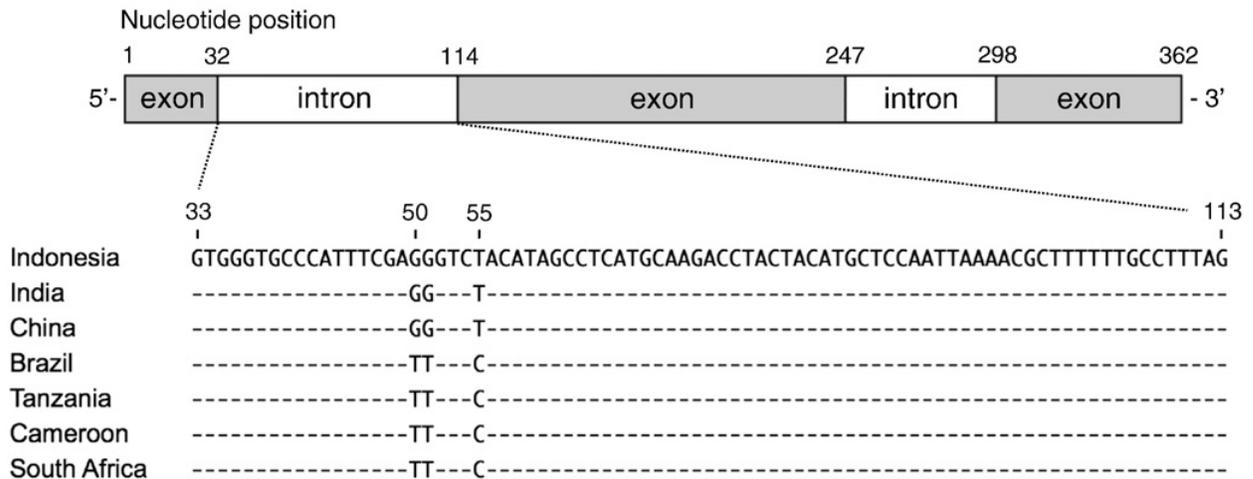


Figura 6. Estructura del producto de PCR secuenciado del gen *Ag2* de *T. solium*.

Se observan las sustituciones nucleotídicas en el intrón 1 del gen *Ag2*, identificadas en muestras de *T. solium* de diferentes regiones geográficas del mundo, que las agrupan en dos clados en concordancia con los clados de genes mitocondriales (Sato et al., 2011).

La variabilidad genética se evaluó también en un estudio pareado genético-inmunológico. Barcelos et al. (2012) evaluaron la reactividad mediante ELISA de sueros de pacientes con NC y sueros de cerdos cisticercosos en cuatro áreas de Brasil (Distrito Federal, Bahia, Minas Geris y São Paulo) y relacionaron estos datos con las diferencias genéticas de cisticercos de cerdos obtenidas mediante RAPDs. Se encontró una alta reactividad de los sueros de humanos con los parásitos del Distrito Federal de Brasil y una mayor diferencia genética entre cisticercos del Distrito Federal y cisticercos de Bahia, Minas Geris y São Paulo, información que consolidó la existencia de diferentes linajes de cisticercos de *T. solium* en diferentes regiones de Brasil. Estos resultados confirman la variabilidad genética entre cisticercos dentro de un mismo país, como fue inicialmente propuesto por Vega et al. (2003) y Maravilla et al. (2003) en México.

La variabilidad genética en algunos parásitos puede reflejarse en características como la virulencia, la tasa de crecimiento, la especificidad por el hospedero, el ciclo de vida, la sensibilidad a los fármacos y el metabolismo (Thompson and Meloni, 1993). Así, en *E. granulosus* se ha reportado que la variabilidad genética resulta en la existencia de

diferentes cepas del parásito que difieren en características fenotípicas que afectan el ciclo de vida, la especificidad del hospedero, la tasa de desarrollo, la virulencia, la antigenicidad y la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos relevantes en la dinámica de transmisión, la epidemiología y el control de la enfermedad (Thompson and McManus, 2002).

Filogeografía y biogeografía de *Taenia solium*

La filogeografía enfatiza aspectos históricos de la distribución espacial actual de linajes de genes utilizando información temporal (histórica) que ha sido posible obtener a partir del uso y análisis de la información contenida en las moléculas de DNA. Esto es, trata de interpretar la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de caracteres genéticamente basados (Avise, 2000).

Taenia solium presenta baja variabilidad genética para estudios de biogeografía (Hancock et al., 2001), aunque es una especie con polimorfismos, ya que se han reportado dos genotipos mitocondriales: el africano/americano y el asiático (Nakao et al., 2002; Michelet et al., 2010). El bajo nivel de variación genética en los marcadores moleculares utilizados no impide su uso como marcadores biogeográficos, ya que se han utilizado con este fin, identificando la presencia de los dos genotipos mitocondriales de *T. solium* en Madagascar (Michelet et al., 2010).

En este trabajo, Michelet et al. (2010) reportan que en Madagascar se colectaron 13 muestras (cisticercos), de las cuales dos presentaron genotipo mitocondrial africano/americano, y el resto genotipo asiático. Estos hallazgos pueden deberse a la historia de Madagascar, ya que se sabe que ha tenido influencia de países africanos y asiáticos desde su colonización hace 2000 años, y esta hipótesis la apoya el hecho de que la lengua hablada en Madagascar (el malgache) tiene características o fonemas de ambos continentes.

Recientemente, otro reporte ha mostrado la similitud entre las muestras colectadas en Madagascar, en las cuales se comparó la secuencia del gen *Cox1* con muestras de América Latina, encontrando que dos de tres muestras de México formaron un grupo con muestras de Camerún y Brasil, mientras que otro grupo de 36 muestras de México se agrupó con muestras de Tanzania y Ecuador. Estos resultados, sugieren los autores, muestran que en México coexisten tres poblaciones de *T. solium* y que hubo múltiples arribos de esta especie a América Latina, basándose en secuencias de los genes mitocondriales *Cox1* y *Cytb* (Michelet et al., 2011). Utilizando el marcador molecular *ITS1* también se encontró que muestras de origen mexicano se agrupan con muestras colectadas en Filipinas (Hinojosa-Juarez et al., 2008). Vega et al. (2003) reportaron resultados similares de variabilidad genética al analizar por medio de RAPDs cisticercos de *T. solium* colectados de cerdos de dos regiones de México y de Madagascar.

JUSTIFICACIÓN

Las características de una enfermedad parasitaria pueden establecerse con base en los rasgos genéticos particulares tanto del hospedero como del parásito. Si bien se ha comenzado a explorar el genoma del hospedero, la relevancia de factores genéticos del parásito para modular la expresión de la enfermedad no se ha estudiada aún.

La información generada en este proyecto contribuirá a aumentar nuestro conocimiento sobre los factores genéticos del parásito que podrían participar en la heterogeneidad de la neurocisticercosis, y nos permitirán generar hipótesis en la fisiopatología de la NC.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce si la variabilidad genética de cisticercos de *T. solium* alojados en el SNC humano podría estar asociada con la heterogeneidad demográfica, clínica y radiológica de los pacientes con NC.

HIPÓTESIS

La variabilidad genética en cisticercos de *T. solium* aislados de humanos se asocia con las diferentes formas clínico-radiológicas que presentaron los respectivos pacientes con NC.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si las variaciones genéticas de los cisticercos de *T. solium* se asocian a las variables demográficas, clínico-radiológicas de los pacientes con NC.

Objetivos particulares

- Describir la variabilidad de la secuencia del gen mitocondrial de citocromo b (*Cytb*) de cisticercos provenientes de pacientes con NC con diferentes presentaciones clínicas y radiológicas.
- Evaluar la asociación de la variabilidad genética del gen mitocondrial de citocromo b (*Cytb*) de cisticercos provenientes de pacientes NC con las variables clínico-radiológicas de los casos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este proyecto incluyó una fase de colección de las muestras de parásitos para realizar los estudios.

Universo de trabajo

Cisticercos obtenidos de pacientes NC que fueron sometidos a extracción quirúrgica de los cisticercos, siguiendo los criterios propios de cada institución médica participante.

Selección de la muestra

- a) Debido a que no se dispone de información suficiente para calcular un tamaño de muestra, y que el tipo de estudio es observacional, el presente protocolo se planteó como estudio piloto. La secuencia y el análisis de los genes mitocondriales *Cytb* se realizó en 28 cisticercos (quistes únicos o múltiples) obtenidos de 12 diferentes pacientes con diagnóstico confirmado de NC.
- b) Criterios de selección de pacientes con NC
 - a. Criterios de inclusión: Pacientes con NC con cisticercos localizados en diferentes compartimentos del SNC que de acuerdo con los criterios del servicio de neurología, neurocirugía y urgencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco (INNN MV) y del servicio de neurología, neurocirugía y la unidad de investigación médica en enfermedades neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, fueron sometidos a extracción quirúrgica de los cisticercos. Todos los cisticercos utilizados en este trabajo provinieron de pacientes que autorizaron el uso de los cisticercos para este propósito por medio de carta de consentimiento informado.
 - b. Criterios de no inclusión: Pacientes con neurocisticercosis que fueron sometidos a extracción quirúrgica de los cisticercos y que no aceptaron participar en el estudio.

- c. Criterios de exclusión: Pacientes que fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico con un diagnóstico diferente a NC, pero que durante la cirugía se les extrajo un cisticerco quirúrgicamente y que no aceptaron participar en el estudio posteriormente a la obtención de la muestra.

Procedimientos

Pacientes

Los pacientes incluidos en este estudio acudieron a la unidad de investigación médica en enfermedades neurológicas y a los servicios de neurología y neurocirugía del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI y el INNN MV. Se invitó a participar a todos los pacientes con NC confirmada y que requirieron extracción quirúrgica de los parásitos, de acuerdo con la evaluación independiente de los médicos adscritos a esos servicios, sin que se aplicara alguna indicación quirúrgica especial para este proyecto de investigación.

Aunque este estudio no requirió como parte del mismo la evaluación y el seguimiento posterior de los pacientes porque la observación se realizó en los parásitos, los pacientes continuaron recibiendo la atención habitual de los servicios participantes.

La información clínico-radiológica de cada paciente se colectó posteriormente, cuando el material necesario estuvo disponible en los archivos de las instituciones participantes.

Extracción de DNA de cisticercos de humanos

Se purificó DNA para evaluar la variabilidad genética de la secuencia del gen *Cytb* de los cisticercos recuperados de SNC de humanos. Los cisticercos se lavaron exhaustivamente con PBS y se secaron con una toalla de papel estéril. Se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron de forma individual, y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

El DNA se extrajo mediante el Kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen (Cat. No. 69504) como se describe en el protocolo del Anexo 4.

Amplificación de genes *Cytb* de cisticercos

La amplificación del gen *Cytb* se hizo mediante la técnica de PCR (ver el protocolo en el Anexo 5). Los oligonucleótidos utilizados fueron *cytb*-F 5'-ATAAACTGATAGATTGTGGTTC-3' y *cytb*-R 5'-CATATGACTGTCTAATGAAGAAAA-3', de acuerdo con lo reportado por Nakao et al. (2002).

Los productos de PCR del marcador *Cytb* se ligaron en el vector pCR 2.1 de Invitrogen (Anexo 6) se clonaron en células químicamente competentes de la cepa INV α F' *E. coli*. Entre las colonias que crecieron y fueron de color blanco se eligieron tres colonias independientes. Se hicieron crecer en medio LB amp+ durante toda la noche y se realizó la miniprep para extraer DNA plasmídico (Anexo 7). Los DNA plasmídicos obtenidos se trataron con la enzima de restricción EcoR1 para comprobar la presencia del inserto de interés (anexo 8). El DNA plasmídico se mandó secuenciar en el secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 disponible en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Análisis estadísticos del gen *Cytb* de cisticercos y asociación con las manifestaciones clínicas de pacientes

Ambas secuencias obtenidas de las reacciones de secuenciación, tanto la sentido como la antisentido del marcador *Cytb* se ensamblaron manualmente, y utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999) se editaron para obtener la secuencia completa de 1068 bases. El conjunto de secuencias se alineó con el software Clustal X 1.83 (Thompson et al., 1997).

Se determinó el número de haplotipos en las secuencias del gen *Cytb* mediante el programa Network (Bandelt, 1999) y se obtuvo el modelo evolutivo más apropiado para este conjunto de 28 secuencias mediante el programa Modeltest (Posada y Crandall,

2001). Se realizó el análisis filogenético usando el método de máxima verosimilitud (ML) usando como modelo evolutivo Felstenstein 81 (Felsenstein, 1981) con un bootstrap de 10000 réplicas, en la versión disponible en línea aLRT-PhyML en la siguiente dirección: <http://atgc.lirmm.fr/phyml/> (Guindon y Gascuel, 2003).

Los análisis de asociación se realizaron usando el software NTSyS (Rohlf, 1998) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versión 2.01. Setauket, New York, USA: Exeter Software) con los que se construyeron matrices de distancia de las variables demográficas, clínicas y radiológicas para confrontarlas con las matrices de distancia genética de las variables de distancia evolutiva (modelo de evolución nucleotídica) F81 y p -distance (que es la proporción de sitios nucleotídicos en los cuales dos secuencias que son comparadas resultan diferentes) (Nei and Kumar, 2000), mediante las pruebas no-paramétricas de Mantel (Mantel, 1967) después de 10 000 permutaciones.

Se realizó un análisis de la prueba exacta de Fisher, para lo cual se hicieron tablas de contingencia de 2×2 comparando un haplotipo contra los ocho restantes en cada ocasión; de la misma manera, un haplogrupo se comparó contra los tres restantes que se formaron; en los análisis se incluyeron las comparaciones de pacientes con un cisticerco contra pacientes con múltiples cisticercos; pacientes con cisticercos con un mismo haplotipo contra pacientes con más de un haplotipo en el gen de estudio, comparándolas con las variables demográficas clínicas y radiológicas. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un valor de $P \leq 0.1$.

Análisis de secuencias públicas disponibles en gene bank

Se descargaron las secuencias del gen mitocondrial *Cytb* de *T. solium* disponibles en gene bank al día 3 de noviembre de 2014. Se alinearon en el programa Clustal X, se determinó el número de haplotipos con el programa DNA SP v 5.1 (Librado and Rozas, 2009), y se obtuvo un fenograma en el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), mediante un Neighbor Joining (NJ) usando como modelo de sustitución Kimura dos-parámetros.

RESULTADOS

1. Variabilidad genética de cisticercos de humanos

Se colectaron un total de 28 cisticercos de *T. solium* de 12 pacientes, de las instituciones con las que se estableció un convenio de colaboración: el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suarez” (INNN MVS) y el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Los parásitos proceden de distintas localizaciones en el SNC, incluyendo el parénquima, el espacio subaracnoideo de la base, los ventrículos y la médula espinal (Tabla 2). Adicionalmente, se colectó la información disponible en los expedientes clínicos de los pacientes donadores de los parásitos.

Se amplificó el gen mitocondrial *Cytb* de las 28 muestras (Figura 7). Se obtuvieron las secuencias, se ensamblaron y se alinearon; se identificaron 13 sitios polimórficos, y 61.5% de ellos fueron informativos bajo el criterio de parsimonia (Figura 8).

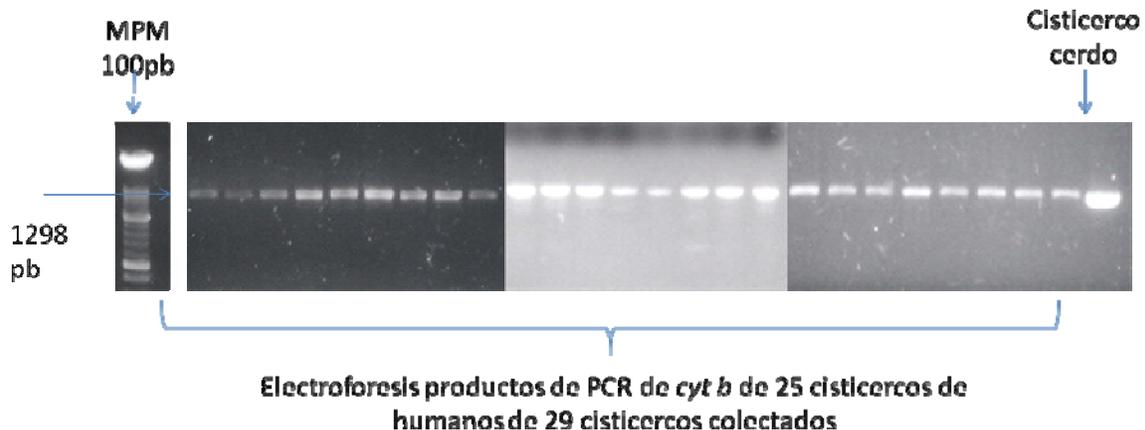


Figura 7. Imagen representativa de los productos de PCR del gen *Cytb* de 25 cisticercos de humanos. Se muestra el amplicón del gen *Cytb* con un tamaño de 1298 pb.

Tabla 2. Relación de cisticercos colectados de pacientes diagnosticados con neurocisticercosis, y características clínicas de los pacientes.

Características # Paciente	Edad	Sexo	HIC	Localización de parásitos	Número de Parásitos	Aracnoiditis y ependimitis	Estadio del Parásito	Hidrocefalea	Hallazgos Histológicos: inflamación	Celularidad en LCR (células/mm ³)	Nivel de proteínas/ dL en LCR	Haplotipos
1	59	M	Sí	Ventrículos	Múltiple	Sí	Coloidal	Sí	ND	56 céls/mm ³	263 mg/dL	6, 7
2	76	M	Sí	Ventrículos	Múltiple	No	Vesicular	Sí	Sí	106 céls/mm ³	109 mg/dL	1, 2
3	36	M	Sí	Parénquima	Único	No	Coloidal	No	Sí	ND	ND	6
4	39	M	Sí	SAS	Múltiple	No	Vesicular	Sí	Sí	ND	ND	6
5	75	F	Sí	SAS	Único	Sí	Coloidal	Sí	Sí	6 céls/mm ³	31 mg/dL	8
6	29	F	No	Médula espinal	Múltiple	Sí	Vesicular	No	No	2 céls/mm ³	15 mg/dL	6
7	27	M	Sí	Ventrículos	Múltiple	Sí	Coloidal	Sí	ND	69 céls/mm ³	94 mg/dL	5
8	48	F	Sí	Ventrículos	Múltiple	Sí	Coloidal	Sí	Sí	62 céls/mm ³	96 mg/dL	3, 4
9	42	M	Sí	Ventrículos	Múltiple	Sí	Coloidal	Sí	No	11 céls/mm ³	88 mg/dL	3, 9
10	46	F	Sí	Ventrículos	Múltiple	Sí	Coloidal	Sí	ND	32 céls/mm ³	71 mg/dL	8
11	43	F	No	SAS	Múltiple	Sí	Vesicular	No	ND	ND	ND	8
12	27	M	Sí	Ventrículos	Múltiple	Sí	Vesicular	No	ND	ND	ND	6

Se colectaron 28 cisticercos de 12 pacientes distintos. Se muestra la información recabada de expedientes clínicos-radiológicos de los pacientes. Hipertensión intracraneal (HIC), Líquido cefalorraquídeo (LCR), Espacio subaracnoideo de los surcos (SAS), No determinado (ND).

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL CISTICERCO DE *Taenia solium* RELACIONADOS CON SU LOCALIZACIÓN Y SU GRADO INFLAMATORIO EN LA NEUROCISTICERCOSIS

No. Paciente	Número de cisticerco	Posición de nucleótido													Haplotipo	Haplogrupo
		273	292	294	340	360	508	543	546	585	651	672	914	1053		
Paciente 2	5	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	1
	7	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*		
	6	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*		
	1	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*		
	4	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*		
Paciente 9	3	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	2	1
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*		
Paciente 8	1	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3	2
	2	*	*	*	C	*	*	*	*	G	*	*	*	*		
Paciente 7	1	*	*	*	C	*	T	*	*	*	*	*	*	G	4	2
Paciente 9	3	C	G	A	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5	
Paciente 4	1	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*	6	3
	2	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*		
Paciente 6	2	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*	6	3
	3	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*		
Paciente 12	1	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*	6	3
	2	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*		
Paciente 1	2	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*	7	4
Paciente 6	1	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*		
Paciente 3	1	*	*	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*	7	4
Paciente 1	1	*	G	*	*	*	*	A	G	*	*	*	*	*		
Paciente 11	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	G	*	8	4
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	G	*		
Paciente 10	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	G	*	8	4
	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	G	*		
Paciente 5	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	G	*	8	4

Figura 8. Cambios nucleotídicos observados en el gen amplificado *Cytb* de los 28 parásitos de los 12 pacientes con neurocisticercosis. Las secuencias del gen *Cytb* fueron ordenadas de acuerdo a los sitios polimórficos. Se muestran los haplotipos y haplogrupos generados.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la distancia genética de los parásitos estimada mediante los modelos F81 y p -distance y las once variables demográficas y clínico-radiológicas de los pacientes. La asociación se mantuvo aun cuando las variables fueron excluidas individualmente para evaluar su relevancia (*Mantel* = 0.327, *P* = 0.0001).

Mediante la red de haplotipos se determinó que en las 28 secuencias hay 9 haplotipos (Figura 9), y debido a la relación que mantienen en la red los nueve haplotipos fueron agrupados en 4 haplogrupos. Considerando también los sitios polimórficos que compartían las secuencias, se obtuvo el árbol de máxima verosimilitud ML (Figura 10), en el que los haplogrupos se mantuvieron con valores de bootstrap $\geq 80\%$.

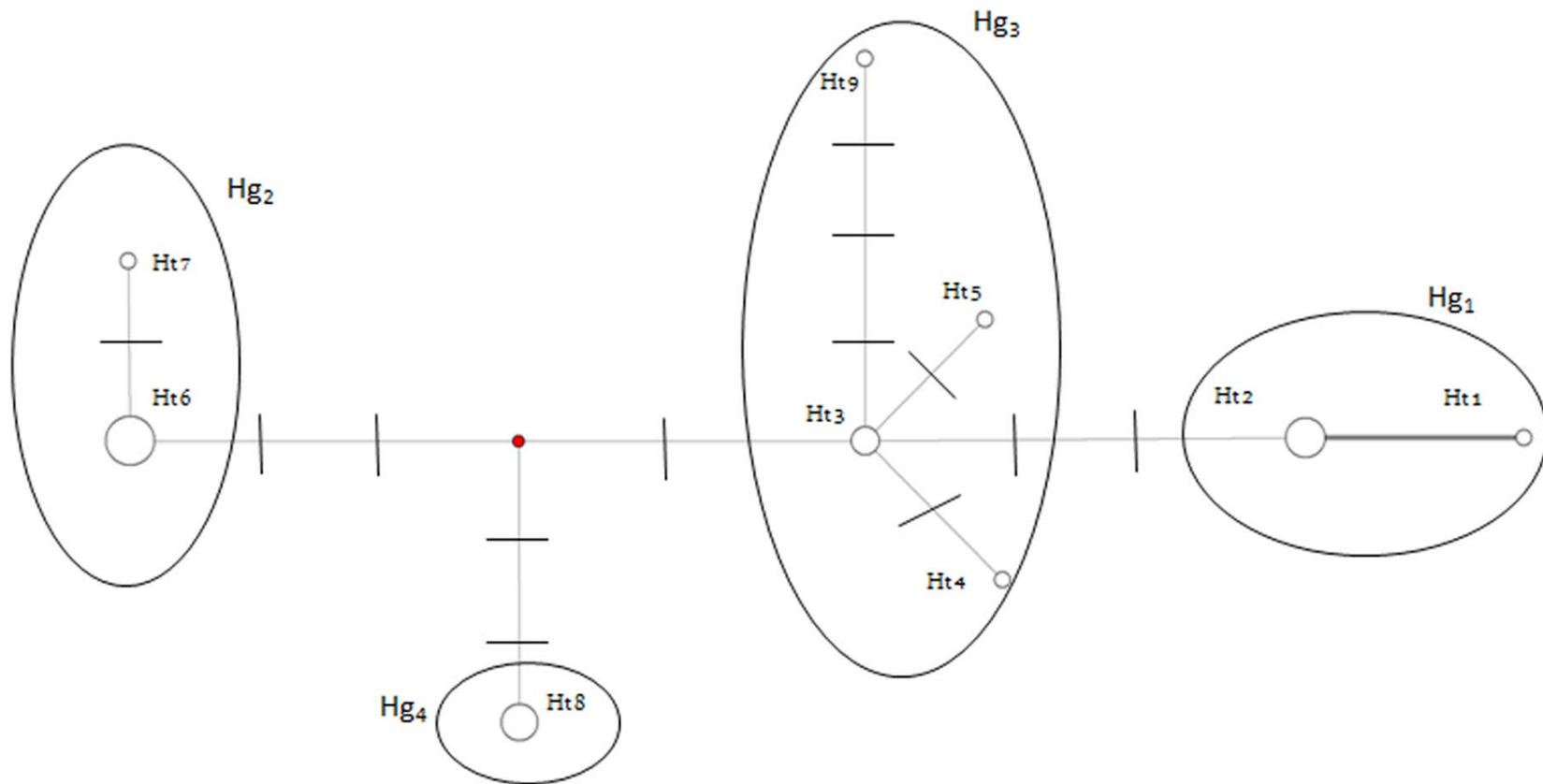


Figura 9. Red de haplotipos en el gene *Cytb*. La red se construyó con el gen mitocondrial *Cytb* de las 28 secuencias de los parásitos. El tamaño de los círculos representa la proporción de cada haplotipo; las elipses representan los haplogrupos identificados.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL CISTICERCO DE *Taenia solium* RELACIONADOS CON SU LOCALIZACIÓN Y SU GRADO INFLAMATORIO EN LA NEUROCISTICERCOSIS

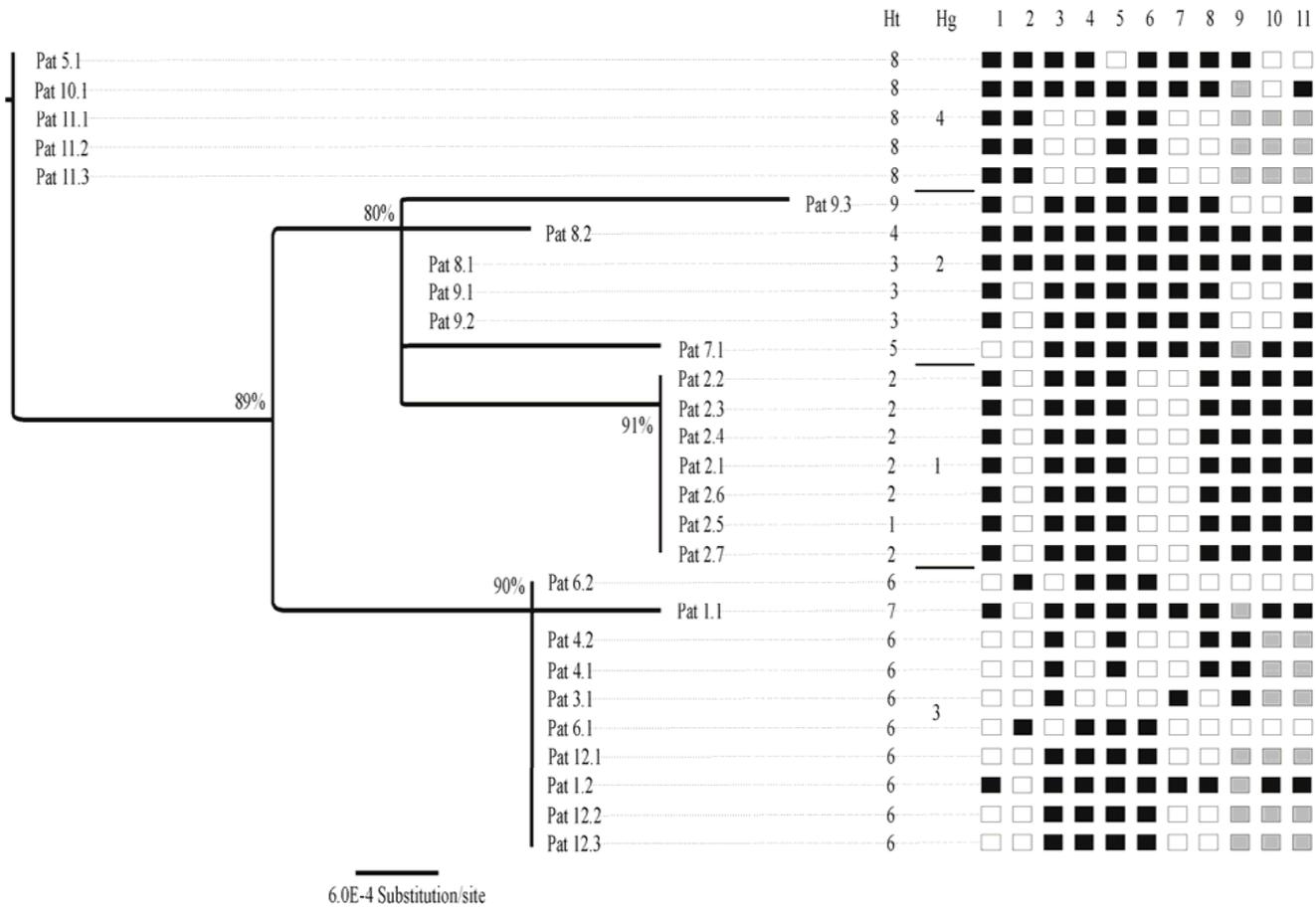


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud. Se construyó con las 28 secuencias de los parásitos de los 12 pacientes con neurocisticercosis (izquierda). Variables demográficas, clínico-radiológicas (derecha). Los números corresponden a las variables indicadas de la Tabla 3. También se muestran los haplotipos y los haplogrupos generados.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL CISTICERCO DE *Taenia solium* RELACIONADOS CON SU LOCALIZACIÓN Y SU GRADO INFLAMATORIO EN LA NEUROCISTICERCOSIS

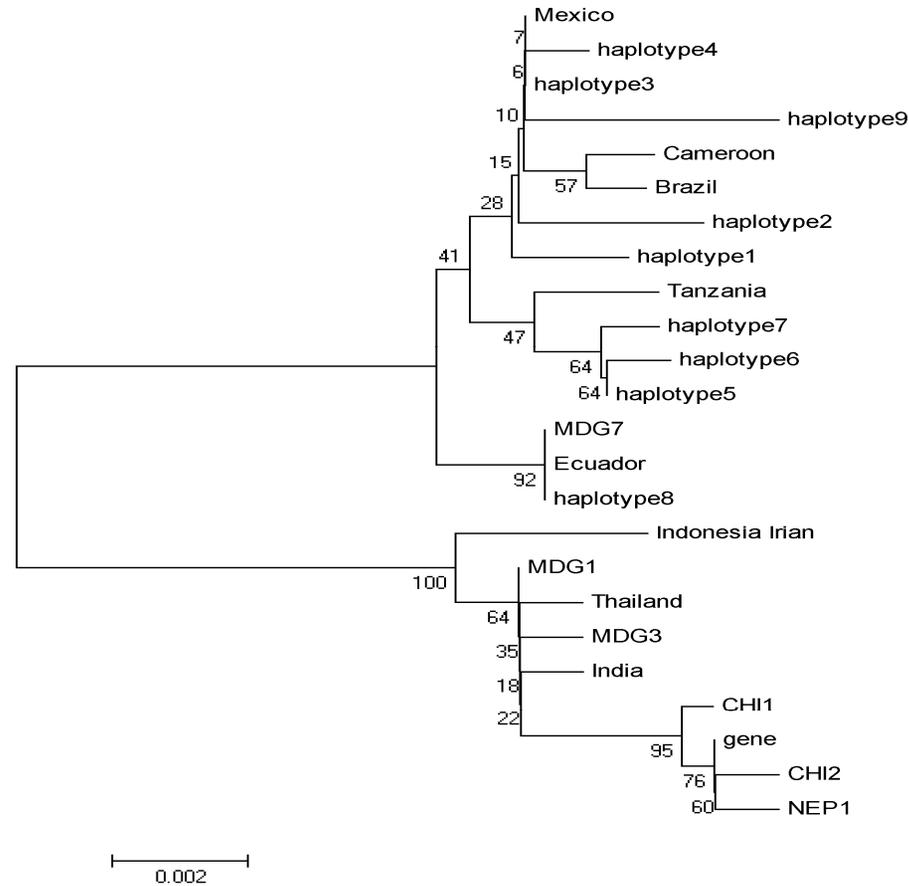


Figura 11. Árbol consenso de la prueba Neighbor Joining (NJ) del gen *Cytb* de *T. solium*. Relaciones filogenéticas de los cisticercos de *T. solium* a partir de secuencias disponibles en Gene Bank. Los números por encima de las ramas indican el valor en porcentaje para prueba de Bootstrap de 1000 réplicas. MDG1: Madagascar aislado 1; MDG3: Madagascar aislado 3; MDG7: Madagascar aislado 7; CHI1: China aislado 1; CHI2: China aislado 2; NEP1: Nepal aislado 1; gene: Primer secuencia reportada del gen *Cytb* de *T. solium*.

El primer haplogrupo se formó con siete parásitos obtenidos del mismo paciente (paciente 2, haplotipos 1 y 2); estos parásitos compartían los polimorfismos en las posiciones 340, 360 y 651, en donde una guanina (G) fue reemplazada por una citosina (C), una adenina (A) por una guanina (G) y una citosina por una timina (T), respectivamente. Cabe hacer mención que el haplotipo 1 corresponde a un parásito que además de compartir los tres sitios polimórficos antes descritos contenía un indel (delección) en la posición 761.

El segundo haplogrupo se formó con 6 cisticercos (haplotipos 3, 4, 5 y 9) recuperados de 3 pacientes (pacientes 7, 8 y 9); los cisticercos compartían un polimorfismo en la posición 340, donde una guanina (G) fue reemplazada por una citosina (C); adicionalmente, tres de esos parásitos mostraron cambios individuales (tipo singletons) en otras posiciones (Figuras 8 y 9).

En el tercer haplogrupo se ubicaron 10 parásitos recuperados de cinco pacientes (pacientes 1, 3, 4, 6 y 12). Estos parásitos correspondían a los haplotipos 6 y 7. Los parásitos del haplotipo 6 mostraron polimorfismos en las posiciones 543 y 546, donde se observaron reemplazos nucleotídicos de guanina (G) por adenina (A) y adenina (A) por guanina (G), respectivamente, y el parásito del haplotipo 7 además contenía un cambio en la posición 292.

El cuarto haplogrupo se formó con cinco parásitos recuperados de tres pacientes (pacientes 5, 10 y 11); estas muestras contenían polimorfismos en las posiciones 672 y 914, donde los cambios fueron de citosina (C) por guanina (G) y una adenina (A) por guanina (G).

Con la prueba de Mantel se encontró asociación entre las variables demográficas, clínicas y radiológicas cuando se confrontaron con la distancia genética de las variables de distancia evolutiva F81 y *p*-distance, con una $p = 0.0001$ y una $p = 0.001$ cuando se confrontaron las tres matrices simultáneamente (Tabla 4).

Una tendencia de asociación con $p = 0.07$ se observó entre el haplogrupo 3 y la edad, debido a que 4 de 5 pacientes que albergaron parásitos del haplogrupo 3 eran menores de 40 años. Por otra parte, los pacientes con parásitos de haplogrupo 4 fueron mujeres, mientras que sólo 2 de 7 pacientes infectados con cisticercos de otros haplogrupos fueron mujeres, lo que mostró un grado de relación con $p = 0.04$. Adicionalmente, se encontró la tendencia de que pacientes jóvenes albergaron cisticercos con un mismo haplotipo, ya que cuatro pacientes mayores de 40 años presentaron cisticercos con más de un haplotipo, $p = 0.07$. Cabe mencionar que no se encontraron asociaciones entre haplogrupos o haplotipos con las características clínico-radiológicas.

Con las 24 secuencias del gen *Cytb* de *T. solium* disponibles en Gene Bank se determinó que hay 21 haplotipos. De los 9 haplotipos que se encontraron en los cisticercos recuperados de humanos, dos se asociaron con parásitos recuperados de cerdos. El haplotipo 8 se asoció con uno procedente de Ecuador y otro de Madagascar, mientras que el haplotipo 3 se asoció con otro cisticerco recuperado de México (Figura 11). En el fenograma de NJ que se generó después del análisis se encontró que los cisticercos recuperados de humanos formaron un cluster con los cisticercos recuperados en cerdos de países de América Latina y de África: Brasil, Ecuador, México y Camerún, Tanzania y Madagascar, respectivamente, mientras que los cisticercos de Asia formaron otro cluster con dos cisticercos recuperados en Madagascar.

Tabla 3. Dicotomización de datos demográficos, clínicos y radiológicos de los pacientes con neurocisticercosis.

Variable	Característica	Transformación Binaria
1	Edad	> 40 (1), < 40 (0)
2	Sexo	Mujer (1), Hombre (0)
3	Severidad clínica (hipertensión intracranial)	Sí (1), No (0)
4	Localización de los parásitos	SAb o ME o Iv (1), SAs o P (0)
5	Número de parásitos	Múltiples (1), Único (0)
6	Presencia de aracnoiditis y ependimitis	Sí (1), No (0)
7	Estadio de los parásitos	Coloidal (1), Vesicular(0)
8	Hidrocefalia	Sí (1), No (0)
9	Hallazgos histológicos	Presencia de inflamación (1)*, Ausencia de inflamación (0), No Determinado (ND)
10	Número de células en LCR	>10 células (1), <10 células (0) No Determinado (ND)
11	Nivel de proteínas en LCR	> 90 mg (1), < 90 mg (0) No Determinado (ND)

Espacio Subaracnoideo de los surcos (SAs), Espacio Subaracnoideo de las cisternas de la base (SAb), Médula Espinal (Sc), Iv (intraventricular), P (Parénquima). *Para los hallazgos histológicos, la inflamación se definió como la presencia de linfocitos y macrófagos. La gravedad radiológica se definió de acuerdo con el número y la localización de parásitos, la presencia de aracnoiditis/ependimitis y la hidrocefalia; la gravedad inflamatoria se definió de acuerdo con la aracnoiditis/ependimitis, el grado de involución de los parásitos, los hallazgos histológicos y las características citoquímicas del LCR (número de células/mm³ y nivel de proteínas).

Tabla 4. Valor de *R* y *P* de las pruebas de asociación entre la variabilidad genética y los datos demográficos, clínicos y radiológicos de los pacientes con la prueba de Mantel.

Matriz	<i>R</i>	<i>P</i>
F81 vs. 11 variables demográficas, clínico-radiológicas	0.327	0.0001
<i>P</i> -distance vs. 11 Variables Demográficas, clínico-radiológicas	0.34	0.0001
F81 vs. <i>p</i> -distance vs. 11 variables demográficas, clínico-radiológicas	0.85	0.001

La prueba de Mantel se realizó utilizando dos distancias genéticas de los parásitos (F81 o *p*-distance) con 11 variables de los pacientes.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ilustra la presencia de polimorfismos genéticos en el gen mitocondrial *Cytb* de cisticercos de *T. solium* obtenidos por extracción quirúrgica a pacientes con NC. Como se muestra en este trabajo, del total de 12 pacientes se analizaron las secuencias del gen mitocondrial *Cytb* de 28 parásitos; entre éstas se hallaron 9 haplotipos, y éstos a su vez se agruparon en 4 haplogrupos. Esta heterogeneidad puede observarse en los pacientes 1, 2, 8 y 9, quienes presentan más de un haplotipo en los cisticercos recuperados. Estos hallazgos concuerdan con los reportes de estudios realizados en cisticercos de cerdos naturalmente infectados (Vega et al., 2003; Maravilla et al., 2003; Bobes et al., 2010; Barcelos et al., 2012).

Como mencionamos anteriormente, la NC es una enfermedad compleja en donde factores etarios y sexuales participan en la modulación de la expresión de la enfermedad (Saenz et al., 2006; Fleury et al., 2004). La presencia de variabilidad genética en el gen *Cytb* de los cisticercos obtenidos de pacientes permite considerar factible la posibilidad de la participación de la diversidad genética de los parásitos en la heterogeneidad de la NC. Esto concuerda con el hallazgo de la asociación estadísticamente significativa (medida con la prueba de Mantel) de las 11 variables clínico-radiológicas y la variabilidad genética (medida a través de la distancia genética de F81). Estos resultados además se apoyan con observaciones previas de que variantes genéticas de organismos infecciosos influyen en el curso de la enfermedad (Li et al., 2010).

Con respecto a la cisticercosis causada por *T. solium*, hasta la fecha sólo se ha reportado la relación entre el reconocimiento de antígenos del parásito y su variación genética (Barcelos et al., 2012). Por ello, éste es el primer trabajo que sugiere directamente el impacto de la diversidad genética de los parásitos en las variables de heterogeneidad clínico-radiológica de los pacientes con NC.

Adicionalmente, en este trabajo se observa una asociación de los haplogrupos 3 y 4 con la edad y el sexo, respectivamente, hallazgo que puede ser importante puesto que se ha descrito que la neuroinflamación y algunas presentaciones severas de la NC son más intensas en mujeres y menos frecuentes en niños que en adultos. En efecto, las formas encefálicas de la NC, que pueden ser causadas por múltiples degeneraciones de parásitos alojados en el parénquima cerebral, son presentaciones inflamatorias de la NC que se han encontrado exclusivamente en pacientes mujeres adultas (Fleury et al., 2010).

Al comparar las 24 secuencias del gene *Cytb* de cisticercos de *T. solium* disponibles en Gene Bank, en las cuales se incluyen los 9 haplotipos encontrados en los cisticercos de humanos, encontramos que los haplotipos de los cisticercos aislados de humanos en México se mantienen en un cluster con los cisticercos recuperados de cerdos de Ecuador, Brasil, Camerún, Tanzania y Madagascar, manteniendo la distribución del genotipo mitocondrial africano/americano, común en estos países. Un grupo formado por el haplotipo 8, el aislado 7 de Madagascar y el aislado de Ecuador forman un cluster con un valor de bootstrap de 92%, mientras que los haplotipos 6 y 7 de cisticercos de humanos se mantuvieron en otro grupo junto con el aislado de Tanzania, y por último los haplotipos 2, 3 y 9 mantuvieron una asociación con los aislados de Camerún, Brasil y México. Este dato es importante porque puede indicar que los haplotipos del gene *Cytb* de cisticercos de *T. solium* descritos en este trabajo pueden deber su presencia a diferentes arribos de *T. solium* a México (Michelet y Dauga, 2012); a su vez, esta diversidad en haplotipos podría explicar las diferencias clínico-radiológicas en los pacientes con neurocisticercosis, y aunque no se encontró asociación de estas variables con los haplotipos o haplogrupos de cisticercos de humanos, sí se encontró asociación entre las variables clínico-radiológicas y la variabilidad genética a través de la prueba de Mantel.

Cabe recalcar que no se encontró asociación entre las variables clínico-radiológicas de los pacientes y los haplogrupos o haplotipos observados. Esta

falta de asociación podría ser resultado del bajo número de pacientes y de cisticercos incluidos en el estudio. Es factible que el aumento en el número de muestras logre enriquecer la información que pueda generarse en un estudio posterior. En este sentido, convendría incluir en el estudio otras secuencias de genes mitocondriales o nucleares que han generado información en análisis similares con otros patógenos como, es el caso de *Cox1* e *ITS1*.

CONCLUSIONES

- ❖ Se observó variabilidad genética en los cisticercos de SNC de humanos comparando la secuencias respectivas del gen mitocondrial *Cytb*.
- ❖ La variabilidad genética encontrada en el gen *Cytb* se asocia con las variables demográficas de los 12 pacientes, de acuerdo con la Prueba de Mantel.

Conclusión general

En este estudio no encontramos evidencias estadísticamente significativas que permitan sustentar que la variabilidad genética del cisticerco en el gen mitocondrial *CytB* se asocia con diferentes fenotipos clínico-radiológicos. No obstante, se observó una asociación sugerente de una relación entre la variabilidad del parásito y la heterogeneidad de la NC.

BIBLIOGRAFÍA

Achour YB, Chenik M, Louzir H, Dellagi K. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infect Immun* 2002; 70(7):3576-85.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR, Venter JC. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Sci*. 1991;252:1651-1656.

Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 1998;84(2):117-22.

Avise JC. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. 2000.

Barcelos IS, Souza MA, Pena JD, Machado GA, Moura LGM, Costa-Cruz JM. Genetic polymorphism in *Taenia solium* metacestodes from different Brazilian geographic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):24-30.

Bandelt H, Forster P, Röhl AA. Median-Joining Network for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16:37-48.

Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Vega R, De Aluja SA, Zúñiga G, Morales J, Larralde C, Sciutto E. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. *Vet Parasitol*. 2010;168(1-2):130-135.

- Bowles, J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;54, 165–174.
- Bowles J, McManus D. Genetic characterization of the Asian *Taenia* a newly described Taeniid cestode of humans. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50(1):33-44.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterisation of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol*. 1994;109,215-221.
- Bowles J. and McManus DP. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol*. 1993;23,969–972.
- Bruchhaus I, Roeder T, Lotter H, Schwerdtfeger M and Tannich E. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol Microb*. 2002;44,(4):1063-1073.
- Bryant Z, Subrahmanyam L, Tworoger M, LaTray L, Liu CR, Li MJ, van den Engh G, Ruohola-Baker H. Characterization of differentially expressed genes in purified *Drosophila* follicle cells: toward a general strategy for cell type-specific developmental analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5559-64.
- Chapman A, Vallejo V, Mossie KG, Ortiz D, Agabian N, Flisser A. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1283-8.
- Crosby, A.W. The Columbian exchange. Contributions in American Studies. No. 2. Greenwood Press, Inc. 1972. Westport, Connecticut 06880. USA.

Del Brutto OH, Granados G, Talamas O, Sotelo J, Gorodezky C. Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, C, DR, and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Hum Biol.* 1991;63:85-93.

Del Brutto OH, Sotelo J and Román GC. *Neurocisticercosis. A clinical handbook.* Swets and Zeitlinger Publishers. 1998.

Dirienzo A, and Wilson C. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:1597-1601.

Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Bilderback AL, Berger EM. The isolation of two juvenile hormone-inducible genes in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 2000;224(2):486-95.

Eom KS. and Rim HJ. Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp. n. *Korean J Parasitol.* 1993;31(1):1-6.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981;17(6): 368-376.

Fleury A, Gómez T, Álvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarría A, Carrillo-Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 2003; 22(2):139-145.

Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E. Symptomatic human neurocysticercosis Age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol.* 2004; 251(7):830-7.

Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yanes O, Piña J, Carrillo-Mezo R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessien A, Larralde C. and Sciutto E. An epidemiologic study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(6):551-8.

Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, Larralde C, Sciutto E. Neurocysticercosis, a persisting health in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8):e805.

Gao Y, Hernandez VP. and Fallon AM. Immunity proteins from mosquito cell lines include three defensin A isoforms from *Aedes aegypti* and a defensin D from *Aedes albopictus*. *Insect Mol Biol.* 1999;8:311–318.

Garcia H. and Del Brutto O. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Tropica* 2003;87 71-78.

Garcia HH, Araoz R, Gilman RH, Valdez J, Gonzalez AE, Gavidia C, Bravo ML, Tsang VC. Increased prevalence of cysticercosis and teniasis among professional fried pork vendors and the general population of a village in the Peruvian highlands. Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:902-905.

Gasser RB, Zhu X, McManus DP. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *Intern J for Parasitol.* 1999;29:1965-1970.

Gobert GN, Stenzel DL, Jones MK, and Mc Manus DP. Immunolocalization of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitol.* 1996;115,33-39.

- González A. Expresión diferencial de genes entre cisticercos procedentes de músculo esquelético y de diferentes regiones del sistema nervioso central del cerdo. Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM. 2007.
- Gonzalez LM, Montero E, Harrison LJS, Parkhouse RME, Gárate T. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. J of Clinical Microbiol. 2000;38(2):737-744.
- González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. Exp Parasitol. 2002a;102(1):46–56.
- Gonzalez LM, Montero E, Sciuotto E, Harrison LJS, Parkhouse RME, Gárate T. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infections: from DNA probes to polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002b;96 (Suppl 1):S243-50.
- Gottstein B, Deplazes P, Tanner I, Skaggs JS. Diagnostic identification of *Taenia saginata* with the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85(2):248-249.
- Greene RM, Hancock K, Wikins PP, Tsang VCW. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related diagnostic antigens. J Parasitol. 2000;86(5):1001-1007.
- Greene RM, Wilkins PP, Tsang VCW. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cyst share homologues 14- and 18kDa subunits. Mol. Biochem. Parasitol. 1999;99(2):257-261.
- Guindon S, and Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 2003;52(5):696-704.

- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999;41:95-98.
- Hancock H, Broughel DE, Moura INS, Khan A, Pieniazek NJ, González AE, García HH, Gilman RH, Tsang VCW. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India and Asia. Int J Parasitol. 2001;31(14):1601-1607.
- Harnett W, and Harnett MM. Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoprotein secreted by parasitic filarial nematodes. Biochim Biophys Acta. 2001;1539(1-2):7-15.
- Harrison LJS, Delgado J, Parkhouse RME. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* with DNA probes. Parasitol. 1990;100(Pt3):459-461.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature . 1984;308:149-153.
- Higuchi R, Focler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnol. 1993;11:1026-1030.
- Hinojosa-Juarez AC, Sandoval-Balanzario M, McManus DP, Monroy-Ostria A. Genetic similarity between cysticerci of *Taenia solium* isolated from human brain and from pigs. Infect Genet Evol. 2008;8(5):653-656
- Hoberg EP, Alkire NL, de Queiroz A, Jones A. Out of Africa: origins of the *Tania* tapeworms in humans. Proc Biol Sci. 2001; 268 (1469):781-787.

- Hoberg EP. Phylogeny of *Taenia*: species, definitions and origins of human parasites. *Parasitol Int.* 2006; 55:S23-S30.
- Hussein AS, Kichenin K, Selkirk ME. Suppression of secreted acetylcholinesterase expression in *Nippostrongylus brasiliensis* by RNA interference. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;122(1):91-94.
- Ito A, Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, Okamoto M, Sato MO, Nakaya K, Margono SS, Ikejima T, Kassuku AA, Afonso SM, Ortiz WB, Plancarte A, Zoli A, Geerts S, Craig PS. Multiple genotypes of *Taenia solium* -ramifications for diagnosis, treatment and control. *Acta Trop.* 2003;87(1):95-101.
- Jiménez-Marcial ME, Velásquez-Pérez L. Morbidity at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez 1995-2001. *Gac Med Mex.* 2004;140(2):155-62.
- Karl SA, Bowen BW, and Avise JC. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analysis of anonymous nuclear loci. *Genetics.* 1992;131:163-173.
- Kang D, Liu G, Gunne H, Steiner H. PCR differential display of immune gene expression in *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1996;26(2):177-84.
- Kawasaki ES, Clark SS, Coney MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:5698-5702.
- Kronstad JW. Serial análisis of gene expresión in eukaryotic pathogens. *Infect Disorders - Drug Targets.* 2006;6:281-297

Larrarde C, y A. S. de Aluja coordinadores. Cisticercosis guía para profesionales de la salud. Fondo de Cultura Económica ed. 2006

Li H, Sullivan DG, Feuerborn N, McArdle S, Bekele K, et al. Genetic diversity of hepatitis C virus predicts recurrent disease after liver transplantation. *Virology*. 2010;402(2):248-55.

Liang P, and Pardee AB. Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Sci*. 1992;257:967-971.

Librado P, and Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451-1452.

Ma E, Xu T, and Haddad GG. Gene regulation by O₂ deprivation: an anoxia-regulated novel gene in *Drosophila melanogaster*. *Mol Brain Res*. 1999;63:217-224.

Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*. 1967;27:209-220.

Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopez-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, Ambrosio J, Kawa S, Flisser A. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol*. 2003;89(6):1250-4.

Maravilla P, González-Guzmán R, Zuñiga G, Peniche A, Dominguez-Alpizar JL, Reyes-Montes R, Flisser A. Genetic polymorphism in *Taenia solium* cysticerci recovered from experimental infections in pigs. *Infect Genet Evol*. 2008.

Mayta H, Taelley A, Gilman RH, Jiménez J, Verastegui M, Ruiz M, García HH, González AE. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* Infections by Simple Hematoxylin-Eosin Staining and PCR-Restriction Enzyme Analysis. J Clin Microbiol. 2000;38(1):133-137.

McManus DP. Molecular discrimination of taeniid cestodes. Parasitol Int. 2006;55(Suppl):S31-S37.

McManus DP, and Bowles J. Asian (Taiwan) *Taenia*: species or strain? Parasitol Today. 1994;10(7):273-5.

Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late onset epilepsy in Mexico. Arch Intern Med. 1990;150(2):325-327.

Michelet L, Carod JF, Rakontondrazaka M, Ma L, Gay F, and Dauga C. The pig tapeworm *Taenia solium*, the cause of cysticercosis: biogeographic (temporal and spatial) origins in Madagascar. Mol Phylogenetics Evol. 2010;55, 744–750.

Michelet, L., Bouteille, B. and Dauga, C. Complex taeniasis/cysticercosis and humans migration. In Proceedings of the 31th Reunion Interdisciplinaire of Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris-La Défense. 2011.

Michelet L, and Dauga C. Molecular evidence of host influences on the evolution and spread of human tapeworms. Biol Rev Camb Philos Soc. 2012;87:731-741.

- Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P. *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol.* 2000;94(3):133-42
- Montero E, Gonzalez LM, Bonay P, Rosas G, Hernandez B, Sciuotto E, Parkhouse RM, Harrison LJ, Morales MA, Garate T. *Taenia solium*: identification and preliminary characterization of a lipid binding protein with homology to the SEC14 catalytic domain. *Exp Parasitol.* 2007;116(3):191-200.
- Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm worldwide. *Parasitol.* 2002;124(6):657-62.
- Nakao M, Sako Y, Yokoyama N, Fukunaga M and Ito A. Mitochondrial genetic code in cestodes. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2000;111:415-424.
- Nei M, and Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press. 2000. 336p.
- Otero AA, De la Cruz M, and Oyama K. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 1997;60:85-117.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, and Fuerst PA. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology.* 1998;79:361-382.
- Pfaffi MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research.* 2001;29:2003-2007.
- Posada D, and Crandall K. A. Selecting the best fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol.* 2001;50:580-601.

Quet F, Preux PM, Huerta M, Ramirez R, Abad T, Fragoso G, Morales J, Sciutto E, Fleury A. Determining the burden of neurological disorders in populations living in tropical areas: who would be questioned? Lessons from a Mexican rural community. *Neuroepidemiol.* 2011;36(3):194-203.

Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun.* 2001;69(7):4554-4560.

Rodríguez-Canul R, Fraser A, Allan JC, Dominguez-Alpizar JL, Argaez-Rodríguez F, Craig PS. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Ann Trop Med Parasitol.* 1999;93(1):57-67.

Rodríguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A, Shoemaker CB, Lacleste JP. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitol.* 1998;117(Pt 6):579-588.

Rodríguez-Hidalgo R, Geysen D, Benitez-Ortiz W, Geerts S, Brandt J. Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenias saginata* and an improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment. *J Parasitol.* 2002;88(5):1007-1011.

Rohlf FJ. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.01. 1998 Setauket, New York, USA: Exeter Software.

- Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, López-Casillas F, Pérez A, Bonilla MA, Rosales R, Sciutto E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol.* 1998;84(3):516-523.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Sci.* 1985;230:135-154.
- Sáenz B, Ruíz-García M, Jiménez E, Hernández-Aguilar J, Suastegui R, Larralde C, Sciutto E, Fleury A. Neurocysticercosis: clinical, radiologic, and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(9):801-803.
- Salgado, P.; Rojas, R. and Sotelo, J. Cysticercosis: Clinical Classification Based on Imaging Studies. *Arch Intern Med.* 1997;157(17):1991-1997.
- Sato OM, Sako Y, Nakao M, Wandra T, Nakaya K, Yanagida T, Ito A. A possible nuclear DNA marker to differentiate the two geographic genotypes of *Taenia solium* tapeworms. *Parasitol Int.* 2011;60,108–110.
- Schena M, Sharon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Sci.* 1995;270:467-470.
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2000;2:1875-1890.

Scott JC, and Mc Manus DP. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. Trop Med Parasitol. 1994;45,1-4.

Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. Parasitol. 1997;114(1):37-43.

Simpson J. Amplified fragment length polymorphisms. Bol. Soc. Bot. Méx. 1997. 60:73-76.

Stansfield WD. Genética. McGraw- Hill, México.1992.

Stein J, and Liang P. Differential display technology: a general guide. Cell Mol Life Sci. 2002;59(8):1235-40.

Suastegui-Román RA, Soto-Hernández JL, Sotelo J. Effects of prednisone on ventriculoperitoneal shunt function in hydrocephalus secondary to cysticercosis: a preliminary study. J Neurosurg. 1996; 84(4):629-633.

Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol and Evolution. 2007;24:1596-1599.

Thompson, J. D., T.J. Gibson; F. Plewniak; F. Jeanmougin y D. G. Higgins. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997;24:4876-4882.

Thompson RC, Lymbery AJ. Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. Parasitol. 1996;112,7-22.

Thompson RCA. and Meloni BP. Molecular variation in *Gardia* and its implications. *Acta Tropica*. 1993;53. 167-84.

Thompson RCA. and McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genes *Echinococcus*. *Trends Parasitol*. 2002;18(10):452-457.

Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989;159(1):50-59.

Valadez E. and Kahl G. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.2000.

Van Beneden R. J., Rhodes L. D. and Gardner G. R. Potential alterations in gene expression associated with carcinogen exposure in *Mya arenaria*. *Biomarkers*. 1999;4:485-491.

Vega R, Pinero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Sciutto E, Larralde C, Fragoso G. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol*. 2003;33(13):1479-85.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Sci*. 1995;270:484-487.

Verma A, Prasad KN, Gupta RK, Singh AK, Nyati KK, Rizwan A, Pandey CM, Paliwal VK. Toll-like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis*. 2010;202(8):1219-25.

Villagran UJ, Olvera JE. Cisticercosis humana. Estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia. *Patología*. 1988;26:149-156.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res. 1990;18:6531-6535.

Zarlenga DS, McManus DP, Fan PC, Cross JH. Characterisation and detection of a newly described Asian taeniid using cloned ribosomal DNA fragments and sequence amplification by the polymerase chain reaction. Experimental Parasitol. 1991;72(2):174-183.

Zhang W, Li J, You H, Zhang Z, Turson G, Loukas A, McManus DP. A gene family from *Echinococcus granulosus* differentially expressed in mature adult worms. Mol Biochem Parasitol. 2003;126(1):25-33.

Anexo 1

Artículo publicado como resultado del trabajo de esta tesis doctoral.

914 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(7): 914-920, November 2013

Genetic variation in the *Cytb* gene of human cerebral *Taenia solium* cysticerci recovered from clinically and radiologically heterogeneous patients with neurocysticercosis

Héctor Palafox-Fonseca¹, Gerardo Zúñiga², Raúl José Bobes¹, Tzipe Govezensky¹, Daniel Piñero³, Laura Texco-Martínez¹, Agnès Fleury^{1,4}, Jefferson Proaño⁵, Graciela Cárdenas⁶, Marisela Hernández¹, Edda Sciuotto¹, Gladis Frago^{1,7}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas ²Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México ³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México DF, México ⁴Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, México DF, México ⁵Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México ⁶Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México DF, México

Neurocysticercosis (NC) is a clinically and radiologically heterogeneous parasitic disease caused by the establishment of larval Taenia solium in the human central nervous system. Host and/or parasite variations may be related to this observed heterogeneity. Genetic differences between pig and human-derived T. solium cysticerci have been reported previously. In this study, 28 cysticerci were surgically removed from 12 human NC patients, the mitochondrial gene that encodes cytochrome b was amplified from the cysticerci and genetic variations that may be related to NC heterogeneity were characterized. Nine different haplotypes (Ht), which were clustered in four haplogroups (Hg), were identified. Hg 3 and 4 exhibited a tendency to associate with age and gender, respectively. However, no significant associations were found between NC heterogeneity and the different T. solium cysticerci Ht or Hg. Parasite variants obtained from patients with similar NC clinical or radiological features were genetically closer than those found in groups of patients with a different NC profile when using the Mantel test. Overall, this study establishes the presence of genetic differences in the Cytb gene of T. solium isolated from human cysticerci and suggests that parasite variation could contribute to NC heterogeneity.

Key words: neurocysticercosis - *Taenia solium* - cysticercosis - genetic variability

Taenia solium neurocysticercosis (NC) is a parasitic disease that seriously threatens human health in developing countries (Rodríguez-Camul et al. 1999, Sciuotto et al. 2000). This disease is also present in Mexico (Fleury et al. 2010) and Mexico's close proximity to the United States of America (USA) is thought to be one of the main causes of a recent NC emergence in the USA due to worker immigration (Sorvillo et al. 2011).

NC exhibits a heterogeneous clinical manifestation that ranges from asymptomatic cases to severe neurological symptoms (Fleury et al. 2004, 2011, Sotelo 2011). Current evidence indicates that patient genetic background and immune status contribute to the clinical course and outcome of the disease (Del Brutto et al. 1988, Fleury et al. 2004, 2010, Chavarría et al. 2005, Sáenz et al. 2006, Cárdenas et al. 2012). In addition, age and gender have previously been shown to correlate with

clinical differences; some studies have shown a lower prevalence of symptomatic NC in children than in adults and females exhibit a stronger inflammatory response to *T. solium* infection than males do (Fleury et al. 2004, 2011, Chavarría et al. 2005). Less attention has focused on the relevance of parasite variations on NC severity. Studies performed in *T. solium* cysticerci recovered from pigs with different geographical origins have shown that genetic variations of the parasite may be involved in pathogenicity (Maravilla et al. 2003, 2008, Vega et al. 2003, Hinojosa-Juarez et al. 2008, Bobes et al. 2010). Moreover, genetic differences in the mitochondrial *cox1* and ribosomal *ITS1* genes were observed in 13 cysticerci obtained from NC patients; however, this study did not attempt to correlate parasite variation and NC severity (Hinojosa-Juarez et al. 2008).

As no previous study has tested the correlations between polymorphisms in any specific parasite gene and clinical differences among NC patients, the focus of this study was to search for an association between these two factors. The *Cytb* gene is a mitochondrial gene that is highly conserved among species (Hey 1997, Simmons & Weller 2001). In this study, *Cytb* was selected as a molecular marker because polymorphisms in this gene may reflect variations in other genes, some of which could directly participate in disease outcome (Laclette et al. 1992). In addition, *Cytb* was recently used in the phylogenetic analysis of taenids and was one of the genes whose analysis first indicated that *T. solium* may have di-

doi: 10.1590/0074-0276130308

Financial support: Dirección General de Apoyo Académico/UNAM (IN226707), SAGARPA. Convenio SENASICA-UNAM 29419-1499-2-VIII-II

HP-F was funded with a scholarship from CONACyT (6622).

+ Corresponding author: gladis@unam.mx

Received 7 June 2013

Accepted 16 August 2013

online | memorias.ioc.fiocruz.br

verged into two strains. One of these strains was isolated from Asia and the other strain was isolated from Africa and Latin America (Okamoto et al. 2001). The possible reasons for this divergence have been recently explored (Michelet & Danga 2012). *Cytb* has also been employed for molecular epidemiological surveys of other parasitic diseases (Sakuma et al. 2012) and in the clinical diagnosis of cysticercosis (Kobayashi et al. 2013).

Thus, an analysis of the *Cytb* gene sequences isolated from different clinical patients with NC was conducted.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Samples - Twenty-eight *T. solium* cysticerci were obtained from 12 patients who underwent surgical cysticercus removal after being diagnosed with NC based on clinical assessment and radiologic imaging. Twenty-two cysticerci were excised from patients at the National Institute of Neurology and Neurosurgery Manuel Velasco Suárez, Secretary of Health, Mexico City, and six cysticerci were excised from patients at the National Medical Center Siglo XXI (Hospital Specialties Dr Bernardo Sepúlveda G, Research Unit of Neurological Diseases), Mexico City. Cyst samples were donated by both hospital centres and the DNA was extracted from each sample. The patient demographic data, the number and location of the recovered parasites and the patient inflammatory status are described in Table I. Immediately after the surgical procedure, the parasites were exhaustively washed with phosphate buffered saline, dried and frozen at -70°C until DNA extraction.

Clinical features - The clinical files of 12 NC patients were retrieved to collect demographic data (age and gender), clinical and histological findings (intracranial hypertension and inflammation level, respectively), characteristics of cerebrospinal fluid (cell count and protein level) and radiological features (location, number and status of parasites, arachnoiditis, ependymitis and hydrocephalus) (Table I).

Genomic DNA (gDNA) extraction - gDNA from *T. solium* cysticerci excised from infected human patients was purified using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended protocol for DNA isolation from animal tissue.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA sequencing - The complete 1,068-bp *Cytb* gene was amplified using the primer set described by Nakao et al. (2002) (*Cytb*/F forward 5'-ATAAACTGATAGAT-TGTGTTTC-3' and *Cytb*/R reverse 5'-CATATGACT-GTCTAATGAAGAAAA-3'). All PCR reactions were performed in a final volume of 50 µL containing 10 µL of 5X Phusion HF buffer (Finnzymes), 1 µL of 100 mM deoxyribonucleoside triphosphates (Invitrogen), 1 µL of the corresponding forward and reverse primers at a concentration of 20 ng/µL and 0.5 µL of Phusion DNA polymerase (Finnzymes). gDNA (500 ng) was added to each reaction. Briefly, the PCR conditions were as follows: initial denaturation at 72°C for 30 s, followed by 30 denaturation cycles at 72°C for 10 s, annealing at 58°C

for 30 s, extension at 72°C for 1 min and a final cycle at 72°C for 5 min on a Corbett Research thermal cycler CGI-96 (Corbett Life Sciences, San Francisco, USA). Amplification products were harvested and purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. All sequencing reactions were performed in a Big Dye Terminator v. 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and sequenced using a 3130XL Sequencer (Applied Biosystems).

Sequence analysis - The 28 sequences were assembled manually, edited in BioEdit v. 7.09 (Hall 1999) and aligned with CLUSTALX v. 2.0.12 (Thompson et al. 1997). A maximum-likelihood phylogenetic inference analysis of the 28 sequences was performed with approximate likelihood ratio test Maximum-Likelihood Phylogenies (atc.lirmm.fr/phyml/) (Guindon & Gascuel 2003) using the F81 model (Felsenstein 1981) and the data were analysed with ModelTest software (Posada & Crandall 2001). This model was the most appropriate for our sequence set according to the Bayesian Information Criterion (BIC) implemented in ModelTest v. 3.7 (Posada & Crandall 2001) (BIC = 3288.625, -lnL = 1445.567; nucleotide base frequency: FreqA = 0.231, FreqC = 0.091, FreqG = 0.215, FreqT = 0.461). The results were confirmed with Network 4.6.1.0 (fluxus-engineering.com) (Polzin & Daneschmand 2003) using the median-joining method (Bandelt et al. 1999) with the default parameters of this software.

Haplotypes (Ht) (a statistically defined set of single-nucleotide polymorphisms in a specific gene) present in our sequence sets were defined directly from the alignment. In addition, we defined haplogroups (Hg) (a collection of potential Ht that belong to same group or clade) based on the clustering of 28 sequences into a tree and network. The Ht and Hg were tested for associations with patient clinical manifestations.

Statistical analysis - To evaluate a possible association between 11 clinical manifestations in each patient (Table I) and cyst genetic variation, we used two methods: (i) the relationship between the matrices of parasite pairwise genetic distance and the NC patients' pairwise phenotypic distance using the Mantel test and (ii) the association of different Ht and Hg with clinical manifestations in NC patients (Table I) using Fisher's exact test.

For the first method, genetic distances among cysticerci were estimated using the F81 nucleotide substitution model (Felsenstein 1981). As the phenotypic data were coded as binary data (1, 0) (Table II), a phenotypic distance among NC patients was estimated using the relation 1-single matching index (Romesburg 1990). Finally, F81 and phenotypic distance matrices were compared using the non-parametric Mantel test (Mantel 1967) after 10,000 permutations with NTSYSpc v 2.02j (Rohlf 1997).

For the second method, Hg were coded as binary data to compare one Hg to the remaining three Hg in 2 × 2 contingency tables. Likewise patients, classified as those with a single cyst vs. those with multiple cysts and patients harbouring cysts with a single sequence Ht at the

TABLE I
General, clinical, radiological and inflammatory characteristics of the 12 neurocysticercosis patients

Patient number	Age	Gender	ICH	Parasite location	Number of parasites	Arachnoiditis and/or ependymitis	Parasite status	Hydrocephalus	Histological findings	CSF data		Haplotype
										Inflammation (cells/mm ³)	Protein level (mg/dL)	
1	59	Male	Yes	Ventricle	Multiple	Yes	Colloidal	Yes	ND	56	240	A, 7
2	76	Male	Yes	Ventricle	Multiple	No	Vesicular	Yes	Yes	106	109	L, 2
3	56	Male	Yes	Parenchyma	Single	No	Colloidal	No	Yes	ND	ND	6
4a	39	Male	Yes	Subarachnoid sulci	Multiple	No	Vesicular	Yes	Yes	ND	ND	6
5	75	Female	Yes	Subarachnoid basal cisterns	Single	Yes	Colloidal	Yes	Yes	6	31	8
6	29	Female	No	Spinal cord	Multiple	Yes	Vesicular	No	No	2	15	6
7	27	Male	Yes	Ventricle	Multiple	Yes	Colloidal	Yes	ND	69	94	5
8	48	Female	Yes	Ventricle	Multiple	Yes	Colloidal	Yes	Yes	62	96	3, 4
9	42	Male	Yes	Ventricle	Multiple	Yes	Colloidal	Yes	No	11	88	3, 9
10	46	Female	Yes	Ventricle	Multiple	Yes	Colloidal	Yes	ND	32	71	8
11	43	Female	No	Subarachnoid sulci	Multiple	Yes	Vesicular	No	ND	ND	ND	8
12	27	Male	Yes	Ventricle	Multiple	Yes	Vesicular	No	ND	ND	ND	6

parasites from 12 patients were recovered during medical-indicated surgery. All data were recovered from each patient's clinical and radiological file. Parasite location refers to the position of the parasite recovered during surgery. Data on parasite location, number of parasites, presence of arachnoiditis and/or ependymitis and parasite status were obtained from the radiological studies and interpreted by a neuroradiologist; histological studies were conducted in a section of the parasites extracted from each patient by the Histopathology Service of each hospital. Data on cellularity and protein level in the cerebrospinal fluid (CSF) were obtained by each hospital laboratory. ICH: intracranial hypertension; ND: not determined.

studied locus vs. those with more than one sequence Ht were tested for association with general, clinical and radiological features using the same statistical test. Results were considered statistically significant at a p value < 0.1.

Ethics - Cysticerci were removed during neurosurgery. Surgery was indicated by the neurologist based on the clinical condition of the patient and the feasibility of the procedure. Cysticerci samples were kindly donated by the hospital centres for genetic variation studies and all samples were anonymous. According to hospital policy, patients were required to sign informed consent forms for the surgical procedure. This study conformed to all research regulations regarding the use of human subjects as required by Mexican law and international regulations and the study adhered to the ethical guidelines in the General Rules of Health from Clinical Investigation. The research protocol was approved by the Ethical Committee of XXI Century National Medical Center, Mexican Social Security Institute.

RESULTS

Sequencing results of the *Cyrb* gene from all tested cysticerci suggested that all cysticerci were of the American/African genotype (Nakao et al. 2002). The *Cyrb* gene sequences from 28 cysticerci from 12 patients were analysed; only one insertion/deletion (nucleotide 761) was detected in the first amplicon obtained from parasite 5, which was excised from patient 2. In addition, 13 polymorphic sites were found, 61.53% of which were informative sites (Fig. 1).

Significant statistical associations were observed between the F81 genetic distance and 11 host variables (χ^2_{Mantel} = 0.327, p = 0.0001). Furthermore, nine Ht (accesses

JQ973073 H2, JQ973074 H5, JQ973075 H3, JQ973076 H4, JQ973077H6, JQ973078 H7, JQ973079 H8 and JQ973080 H9) were identified among all 28 sequences (Fig. 1), which were subsequently clustered into four Hg in the tree topology (bootstrap values \geq 80%) (Fig. 2).

The first Hg was comprised of seven parasites, which were all excised from the same patient and contained polymorphisms at nucleotides 340, 360 and 651 [guanine (G) was replaced by cytosine (C), adenine (A) by G and C by thymine (T), respectively]. The parasite with a deletion at nucleotide 761 was included in this group. The second Hg included six cysticerci from three different patients. These sequences were grouped based on the variant at nucleotide 340 (G by C); however, three of them exhibited mutations at other positions (Fig. 1). The third Hg included 10 parasites from five patients with variations at positions 543 (G by A) and 546 (A by G). The fourth Hg was comprised of five parasites from three patients who exhibited variations at nucleotides 672 and 914 (C by G and A by G, respectively) (Figs 1, 2).

A tendency towards association between Hg 3 and age was observed (p = 0.07): of the five patients harbouring parasites of Hg 3, four were younger than 40, whereas six of the seven patients exhibiting cysts from other Hg were older than 40. The three patients with parasites from Hg 4 were female. In contrast, only two out of seven patients infected with parasites from other Ht groups were female (p = 0.04). Younger patients tended to harbour parasites with the same Ht, whereas the four patients presenting with cysticerci containing two Ht were older than 40 (p = 0.07). No statistically significant association between Hg and clinical or radiological manifestations was observed.

TABLE II
General, clinical and radiological features of neurocysticercosis patients used in the association analysis and binary transformation

Category	Patient features	Binary transformation
1	Age	> 40 (1), < 40 (0)
2	Gender	Female (1), male (0)
3	Clinical severity (intracranial hypertension symptoms)	Yes (1), no (0)
4	Parasite location	SAb or Sc or Iv (1), SAs or P (0)
5	Number of parasites	Multiple (1), single (0)
6	Arachnoiditis and ependymitis	Yes (1), no (0)
7	Parasite status	Colloidal (1), vesicular (0)
8	Hydrocephalus	Yes (1), no (0)
9	Histological findings	Presence of inflammation (1), absence of inflammation (0)
10	Cerebral spinal fluid F cell count	Not determined
11	Cerebral spinal fluid protein level	> 10 cells (1), < 10 cells (0) > 90 mg (1), < 90 mg (0)

α : for histological findings, inflammation was defined as the presence of lymphocytes and macrophages; Iv: intraventricular; P: parenchyma; SAb: subarachnoid basal cisterns; SAs: subarachnoid of sulci; Sc: spinal cord.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL CISTICERCO DE *Taenia solium* RELACIONADOS CON SU LOCALIZACIÓN Y SU GRADO INFLAMATORIO EN LA NEUROCISTICERCOSIS

918 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(7), November 2013

Patient number	Cysticerc number	Nucleotide position										Haplotype	Haplogroup			
		273	292	294	340	350	500	543	546	505	651			672	914	1053
2	5	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	1
	7	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	
	6	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	
	1	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	
	4	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	
9	2	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	2
	1	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	1	
8	1	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	3	2
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	G	*	*	*	*	4	
7	1	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	5	3
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	5	
4	1	*	*	*	C	G	*	*	*	*	T	*	*	*	5	3
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	
6	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	3
	3	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	
	1	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	
12	1	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	3
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	
	3	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	6	
1	1	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	7	4
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	7	
11	1	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	8	4
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	8	
10	1	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	8	4
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	8	
5	1	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	8	4
	2	*	*	*	C	G	*	*	*	A	G	*	*	*	8	

Fig. 1: polymorphic sites in *Cytb* gene sequences of 28 parasites from 12 neurocysticercosis patients. The position and nucleotide changes found haplotypes and haplogroups formed by different haplotypes are shown.

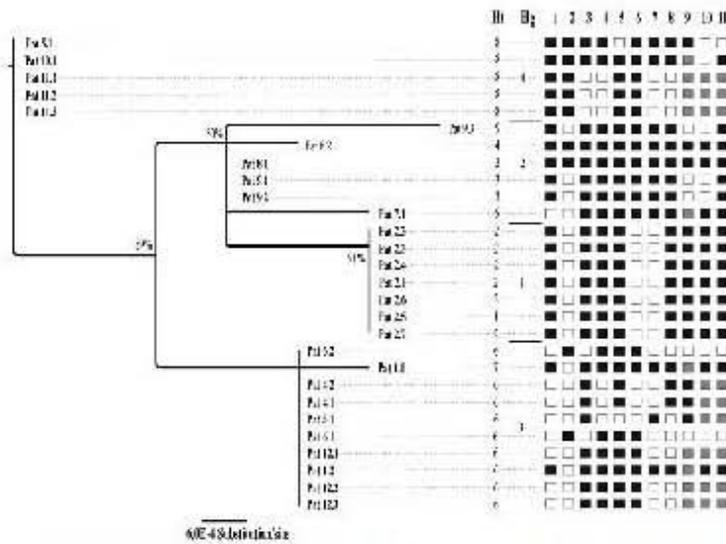


Fig. 2: maximum-likelihood phylogenetic tree based on single nucleotide polymorphism (SNP) differences across the *Cytb* gene of *Taenia solium* cysticerci. A maximum-likelihood phylogenetic tree of the 28 *T. solium* cysticerci from 12 patients based on SNP differences across the 1,068 bp of the complete *Cytb* gene (left) is shown. Haplotypes (Ht), haplogroups (Hg), as well as demographic, clinical, radiological and inflammatory features of each patient-derived cyst are shown (right). The number of each column corresponds to the same clinical category shown in Table II. White and dark squares correspond to the binary transformation according to Table II.

DISCUSSION

In this study, the sequences of the mitochondrial *Cytb* gene were studied in 28 cysticerci surgically excised from NC patients. The genetic variations observed were clustered into nine Ht and four Hg. This finding highlights the genetic heterogeneity among cysticerci isolated from human patients. These genetic variations are consistent with the genetic heterogeneity observed among swine-derived *T. solium* metacestodes isolated from different areas of Mexico and other endemic countries (Maravilla et al. 2003, 2008, Vega et al. 2003, Bobes et al. 2010, Barcelos et al. 2012).

A significant association between the 11 included host features and the genetic distances among parasites was observed (Mantel test). This result indicates that patients with similar features harbour parasites that are more closely related, which suggests that parasite diversity may contribute to the heterogeneous clinical manifestations observed in NC patients (Fleury et al. 2010). Clinical and radiological heterogeneity is a main characteristic of NC. Although previous studies have shown that host genetic background, sex, age and immune status affect the susceptibility to infection and disease (Del Brutto et al. 1988, Chavarría et al. 2005, Sáenz et al. 2006), this is the first study suggesting that parasite heterogeneity may contribute to disease heterogeneity. It is important to note that the observed genetic variation in the mitochondrial *Cytb* gene among the parasites and the association of genetic variation with the observed clinical features could be due to the action of *Cytb* (i.e., *Cytb* encodes a protein that plays an important role in electron transfer, the respiratory chain and oxidative phosphorylation in aerobic organisms) (Fernández et al. 2008, Chen et al. 2009). However, it is possible that this association may reflect an indirect effect of *Cytb* genetic variation due to variation in other genes, which could directly affect disease outcome (Laclette et al. 1992).

The selection of the *Cytb* gene for this molecular study of *T. solium* merits some discussion. First, *T. solium* mitochondrial genes, such as *co1*, *Cytb* and *nad*, are more polymorphic than nuclear genes and are more informative for molecular epidemiology purposes (Martínez-Hernández et al. 2009). *Cytb* was also an attractive target for this study because a study of the *co1* gene was not feasible: the complete amplification of the *co1* gene from human brain cysticerci collected in this study was not possible (data not shown) for reasons that are not yet understood.

In addition, we observed a tendency of association between Hg 3 and 4 with age and gender, respectively. Considering the relevance of gender and age in NC pathogenesis, these tendencies also merit some discussion. It is known that the neuroinflammation accompanying severe NC forms is more intense in women. In addition, the encephalitic form of NC, which is caused by multiple degenerating parasites located in the parenchyma, is an inflammatory form of the disease that is found almost exclusively in female patients (Fleury et al. 2010). With respect to age, most paediatric patients present a benign form of the disease with parasites localised in the parenchyma; however, adult patients present

with an extra-parenchymal form and more severe forms of the disease (Sáenz et al. 2006). Thus, the underlying cause of some of these differences may involve parasite genetic variation.

No other associations among the individual radiological or clinical variables of NC patients and *Cytb* Ht or Hg were observed. These negative results should be interpreted with caution because of our small sample size, which could influence these results.

The influence of genetic variation in infectious organisms on the clinical course of the resulting disease has been described previously (Li et al. 2010). In the case of *T. solium* cysticercosis, genetic variation of the parasite has reportedly been associated with different parasite antibody recognition patterns (Barcelos et al. 2012).

In conclusion, our results suggest that a parasite genetic profile may contribute to NC heterogeneity; however, no individual associations with clinical or radiological characteristics were found.

ACKNOWLEDGEMENTS

To MC Jorge Yañez and MC Patricia de la Torre, for DNA sequencing, to Karel Estrada, for providing the *Cytb* gene sequence from the *T. solium* genome database, to Dr Rosalba Vega Orozco, for the histological analysis of the samples, to Juan Francisco Rodríguez, for copy-editing the English version, to the neurosurgical team of INNN, to Barbara Nettel, of the National Medical Center Siglo XXI, IMSS and to Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

REFERENCES

Bandelt H, Forster P, Röhl AA 1999. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.

Barcelos IS, Souza MA, Pena JDO, Machado GA, de Moura LGM, Costa-Cruz JM 2012. Genetic polymorphism in *Taenia solium* metacestodes from different Brazilian geographic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 24-30.

Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes M del R, Duarte-Escalante E, Vega R, Aluja AS, Zúñiga G, Morales J, Larralde C, Scintto E 2010. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. *Vet Parasitol* 168: 130-135.

Cardenas G, Valdés R, Sáenz B, Bottasso O, Fragoso G, Scintto E, Romano MC, Fleury A 2012. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol* 42: 171-176.

Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G, Scintto E 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immuno-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 116: 271-278.

Chen J, Sun Y, Manglai D, Min L, Pan Q 2009. The association analysis between *Cytb* polymorphism and growth traits in three Chinese donkey breeds. *Livestock Prod Sci* 126: 306-309.

Del Brutto OH, García E, Talamas O, Sotelo J 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med* 148: 544-546.

Felsenstein J 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.

Fernández AI, Alves E, Fernández A, de Pedro E, López-García MA, Ovilo C, Rodríguez MC, Sillio L 2008. Mitochondrial genomes

- polymorphisms associated with longissimus muscle composition in Iberian pigs. *J Anim Sci* 86: 1283-1290.
- Fleury A, Carrillo-Mazo R, Flisser A, Scintto E, Corona T 2011. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9: 123-133.
- Fleury A, Dessain A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Scintto E 2004. Symptomatic human neurocysticercosis: age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 251: 830-837.
- Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Scintto E, Larralde C 2010. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 243-250.
- Guindon S, Gascual O 2003. Simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hey J 1997. Mitochondrial and nuclear genes present conflicting portraits of human origins. *Mol Biol Evol* 14: 166-172.
- Hinojosa-Juarez AC, Sandoval-Balanzario M, McManus DP, Monroy-Ostria A 2008. Genetic similarity between cysticerci of *Taenia solium* isolated from human brain and from pigs. *Infect Genet Evol* 8: 653-656.
- Kobayashi K, Nakamura-Uchiyama F, Nishiguchi T, Isoda K, Kokubo Y, Ando K, Katurahara M, Sako Y, Yanagida T, Ito A, Iwabuchi S, Ohnishi K 2013. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveller after returning from India. *Am J Trop Med Hyg* 89: 58-62.
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 148: 124-128.
- Li H, Sullivan DG, Fueserborn N, McArdle S, Bekke K, Pal S, Yah M, Carithers RL, Perkins JD, Gretch DR 2010. Genetic diversity of hepatitis C virus predicts recurrent disease after liver transplantation. *Virology* 402: 248-255.
- Mantel N 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Maravilla P, Gonzalez-Guzman R, Zulliga G, Paniche A, Dominguez-Alpizar JL, Reyes-Montes R, Flisser A 2008. Genetic polymorphism in *Taenia solium* cysticerci recovered from experimental infections in pigs. *Infect Genet Evol* 8: 213-216.
- Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopez-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, Ambrosio J, Kawa S, Flisser A 2003. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol* 89: 1250-1254.
- Martinez-Hernandez F, Jimenez-Gonzalez DE, Chamillo P, Alonso-Fernandez C, Maravilla P, Flisser A 2009. Geographical wide-spread of two lineages of *Taenia solium* due to human migrations: can population genetic analysis strengthen this hypothesis? *Infect Genet Evol* 9: 1108-1114.
- Michelet L, Daugs C 2012. Molecular evidence of host influences on the evolution and spread of human tapeworms. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87: 731-741.
- Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A 2002. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology* 124: 657-662.
- Okamoto M, Nakao M, Sako Y, Ito A 2001. Molecular variation of *Taenia solium* in the world. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2 (Suppl): 90-93.
- Polzin T, Daneschmand SV 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper Res Lett* 31: 12-20.
- Posada D, Crandall KA 2001. Selecting the best fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol* 50: 580-601.
- Rodriguez-Camul R, Fraser A, Allan JC, Dominguez-Alpizar JL, Arguez-Rodriguez F, Craig PS 1999. Epidemiologic study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan State, Mexico. *Am Trop Med Parasitol* 93: 57-67.
- Rohlf FJ 1997. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.01. Available from: axssoftware.com/downloads/ntsypguide21.pdf.
- Romesburg CH 1990. *Cluster analysis for researchers*. Malabar Florida Krieger Co, Florida, 334 pp.
- Saenz B, Ruiz-Garcia M, Jimenez E, Hernandez-Aguilar J, Suastegui R, Larralde C, Scintto E, Fleury A 2006. Neurocysticercosis: clinical, radiologic and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr Infect Dis J* 9: 801-803.
- Sakuma M, Fukuda K, Takayama K, Kobayashi Y, Shimokawa Miyama T, Setoguchi A, Endo Y 2012. Molecular epidemiological survey of the *Babesia gibsoni* cytochrome b gene in western Japan. *J Vet Med Sci* 74: 1341-1344.
- Scintto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Ahuja A, Vargas L, Larralde C 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2: 1875-1890.
- Simmons RB, Weller SJ 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Mol Phylogenet Evol* 20: 196-210.
- Sorvillo F, Wilkins P, Shafir S, Eberhard M 2011. Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. *Emerg Infect Dis* 17: 1-6.
- Sotelo J 2011. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 529-535.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.
- Vega R, Piñero D, Ramamankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Scintto E, Larralde C, Fragoso G 2003. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol* 33: 1479-1485.

Anexo 2

Aislamiento de RNA total

Protocolo aislamiento de RNA Trizol®

1. Homogenización del tejido en 10-20 volúmenes de Trizol

Transportar los cisticercos congelados y almacenados a -80° C en hielo, en 500 μ L de Trizol frío en una caja Petri de 60 x 15 mm. Con el émbolo de una jeringa, macerar cada cisticerco hasta tener un homogenizado. Pasar el homogenizado a un tubo de 1.5 mL, y con 500 μ L de Trizol nuevo lavar la caja Petri para recuperar la mayor cantidad de muestra.

El volumen de la muestra puede no exceder 10% del volumen de Trizol usado para la homogenización.

2. Incubar el homogenizado por 5 min a temperatura ambiente.

3. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min a 4 $^{\circ}$ C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

Esta centrifugación opcional sólo se requiere para remover material insoluble del homogenizado, que contiene cantidades altas de proteínas, lípidos, polisacáridos o material extracelular, sobre todo en el músculo y los tejidos grasos. Al centrifugar se empastillan membranas extracelulares, polisacáridos y el DNA de alto peso molecular. El RNA queda en el sobrenadante.

4. Adicionar 200 μ L de cloroformo por cada mL de Trizol, y adicionar 12 μ L de glucógeno, mezclar bien e incubar a temperatura ambiente por 15 min.

a) Tapar los tubos firmemente y agitar vigorosamente por 15 s.

5. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a 4 $^{\circ}$ C. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

6. Adicionar 500 μ L de isopropanol por mL de Trizol, mezclar en vórtex por 5-10 s e incubar a -20° C toda la noche.

7. Centrifugar a 13000 rpm por 30 min a 4 $^{\circ}$ C y descartar el sobrenadante.

a) Remover completamente el sobrenadante sin deshacer la pastilla.

El RNA precipitado forma una pastilla similar a un gel, o una pastilla blanca en el fondo y el lado del tubo.

8. Adicionar 1 mL de etanol al 75 % por cada mL de Trizol.

Adicionar 1 mL de etanol al 75% por 1 mL de Trizol usado para homogenizar la muestra, para lavar la pastilla de RNA.

9. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min, remover el etanol y dejar secar la pastilla de RNA.

10. Disolver el RNA en 30 μ L del buffer de su elección.

- a) Disolver el RNA en solución para almacenar (ejemplo: agua libre de RNasa) por pipeteo de la solución o por agitación con vórtex vigorosamente.
- b) Almacenar a 4 °C para analizar inmediatamente o a -80 °C para uso posterior en alícuotas de 1.5 μ g o 5 μ L.

Anexo 3

Protocolo de RT-PCR punto final

RT

1. En un tubo nuevo de 2 mL adicionar lo siguiente:
2. Colocar 1 μ L de la muestra de RNA total

RNA total	1 μ g
RQ1 DNasa 10X buffer	1 μ L
RQ1 DNasa (enzima) *	1 μ L
Agua DEPC	7 μ L
Volumen final	10 μ L

*Adicionar la enzima al final

3. Incubar a 37 °C por 30 minutos
4. Posteriormente adicionar 1 μ L de Stop Solution
5. Incubar a 65 °C por 10 minutos
6. Adicionar la siguiente mezcla a la muestra

Muestra	10 μ L
Oligo dT	1 μ L
dNTP (mezcla)	1 μ L
Volumen final	12 μ L

En este paso incluir el blanco + 1 reacción extra

7. Adicionar la mezcla a las muestras
8. Incubar por 5 minutos

Después de la incubación, colocar las muestras en hielo.

9. Preparar lo siguiente

Reactivo	Volumen por muestra
5X First Stand buffer	4 μ L
DTT	2 μ L
Rnasa Out	1 μ L

Realizar una reacción extra

10. Adicionar 7 μ L por muestra. Mezclar suavemente
11. Incubar a 42 °C por 2 minutos
12. Adicionar 1 μ L de la Enzima Super Script II por cada muestra.
13. Incubar a: 42°C por 50 minutos.
70°C por 15 minutos.

Después de esta incubación, mantener las células a 4 °C (programar el Termociclador).

14. Congelar el cDNA o usar en el PCR para cada gen (3 μ L para cada reacción).

PCR

Las condiciones de cada gen se muestran a continuación

Gen	Cebadores		Longitud amplificada	Temperatura de alineamiento	Número de Ciclos
β-actina	Forward	5'-atg ggt gac gaa gaa gtt c-3'	1541 pb	54 °C	30
	Reverse	5'-gaa gca ctt gcg atg aac -3'			

1. Realizar la siguiente mezcla de los reactivos para PCR

Tabla 7. Los volúmenes son para una reacción

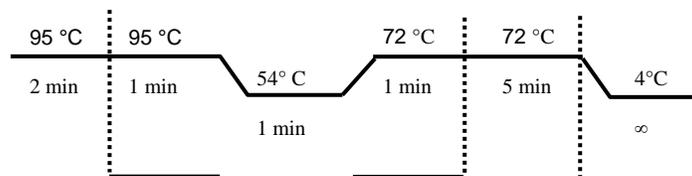
Reactivos	Para una reacción
10X PCR buffer	5 µL
50 mM MgCl ₂	1.5 µL
10 mM dNTP	1 µL
mezcla	
Primer FW	1 µL
Primer RW	1 µL
Platinum Taq	0.4 µL
DNA (molde)	3 µL
H ₂ O	37.1 µL
Volumen final	50 µL

Nota: La enzima Platinum Taq se adiciona al último en la mezcla y el DNA (molde, producto de la RT) se adiciona al final en cada reacción.

Se adicionan 47 µL de la mezcla en tubos nuevos para PCR. Se etiquetan.

2. Se adicionan 3 µL del DNA molde (cDNA).

3. La muestra se coloca en el termociclador a las condiciones de los primers.



Gen	Cebadores		Longitud amplificada	Temperatura de alineamiento	Número de ciclos
	30 ciclos				
Sec14Tsol	Forward	5'-atg gca aca gct cag aat c-3'	960 pb	55°C	30
	Reverse	5'-atc gac agc cag ttt gac-3'			

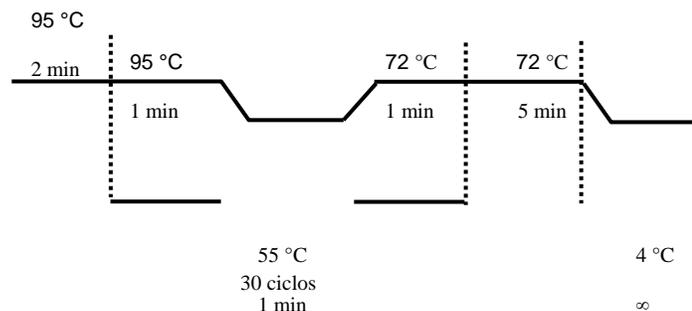
1. Realizar la siguiente mezcla de los reactivos para PCR

Tabla 8. Los volúmenes son para una reacción

Reactivos	Para una reacción
10X PCR buffer	5 µL
50 mM MgCl ₂	1 µL
10 mM dNTP mezcla	1 µL
Primer FW	1 µL
Primer RW	1 µL
Platinum Taq	0.4 µL
DNA (molde)	3 µL
H ₂ O	37.6 µL
Volumen final	50 µL

Nota: La enzima Platinum Taq se adiciona al último en la mezcla y el DNA (molde, producto de la RT) se adiciona al final en cada reacción.

2. Se adicionan 47 µL de la mezcla en tubos nuevos para PCR. Se etiquetan.
3. Se adicionan 3 µL del DNA molde (cDNA).
4. Colocar la muestra en el termociclador a las condiciones de los primers.



Gen	Cebadores		Longitud amplificada	Temperatura de alineamiento	Número de Ciclos
Importina 7	Forward	5'-atg tgt gcc ctc ctc tct c-3'	627 pb	59 °C	30
	Reverse	5'-atg gga tgg ctg atc gcc-3'			

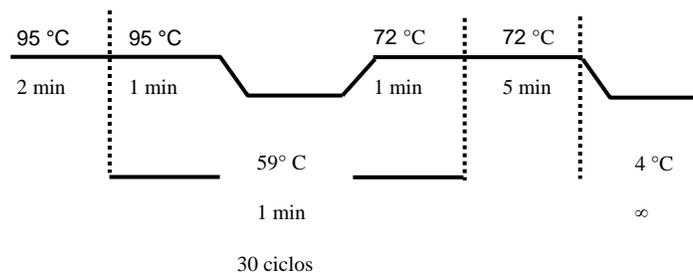
1. Realizar la siguiente mezcla de los reactivos para PCR

Tabla 9. Los volúmenes son para una reacción

Reactivos	Para una reacción
10X PCR buffer	5 µL
50 mM MgCl ₂	1 µL
10 mM dNTP	1 µL
mezcla	
Primer FW	1 µL
Primer RW	1 µL
Platinum Taq	0.4 µL
DNA (molde)	3 µL
H ₂ O	37.6 µL
Volumen final	50 µL

Nota: La enzima Platinum Taq y DNA (molde, producto de la RT) se adicionan por último.

1. Se adicionan 47 µL de la mezcla en tubos nuevos para PCR. Se etiquetan.
2. Se adicionan 3 µL del DNA molde (DNAc).
3. Colocar la muestra en el termociclador a las condiciones de los primers.



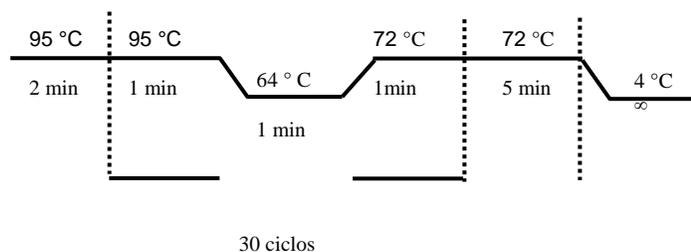
Gen	Cebadores		Longitud amplificada	Temperatura de alineamiento	Número de Ciclos
	Forward	Reverse			
Trans de aniones orgánicos	Forward	5'- atg cca gag ggt gtc cac tc -3'	567 pb	64 °C	30
	Reverse	5'- tcc tcc ctg cgc ttc cga g -3'			

1. Realizar la siguiente mezcla de los reactivos para PCR

Tabla 10. Los volúmenes son para una reacción	
Reactivos	Para una reacción
10X PCR buffer	5 µL
50 mM MgCl ₂	1.5 µL
10 mM dNTP	1 µL
mezcla	
Primer FW	1 µL
Primer RW	1 µL
Platinum Taq	0.4 µL
DNA (molde)	3 µL
H ₂ O	37.1 µL
Volumen final	50µL

Nota: La enzima Platinum Taq se adiciona al último en la mezcla y el DNA (molde, producto de la RT) se adiciona al final en cada reacción.

2. Se adicionan 47 µL de la mezcla en tubos nuevos para PCR. Se etiquetan.
3. Se adicionan 3 µL del DNA molde (cDNA).
4. Colocar la muestra en el termociclador a las condiciones de los primers.



GEL DE CORRIDO DE AGAROSA 1.5%

1. Pesar 0.75 g de agarosa
2. Disolver en 50 mL de TBE 1X
3. Fundir la agarosa
4. Adicionar 10 μ L de bromuro de etidio (BrEt 10 mg/mL)
5. Cargar 10 μ L de cDNA + 5 μ L de buffer de carga, volumen final 15 μ L

Correr el gel durante 1:00 h a 80 volts

Anexo 4

Extracción de DNA genómico de tejidos de animales con el Kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen (Cat. No. 69504)

1. Pesar 25 mg de tejido, colocarlo en tubo de 1.5 mL. Adicionar 180 μ L de buffer ATL y 20 μ L de proteinasa K, y mezclar en un vórtex.
2. Incubar las muestras a 56° C durante 1-3 h, hasta que las muestras estén completamente lisadas. Mezclar en vórtex cada 20 o 30 min.
3. Mezclar por 15 s y adicionar 200 μ L de buffer AL a cada muestra y mezclar con vórtex. Después adicionar 200 μ L de etanol absoluto (grado biología molecular), mezclar en un vórtex.
4. Pipetear la mezcla del paso 3 (incluyendo algunos precipitados) en una columna DNeasy mini montada en un tubo de colección de 2 mL. Centrifugar a 6 000 x g por 1 min a temperatura ambiente.
5. Descartar el fluido filtrado del tubo de colección y volver a montar la columna DNeasy mini, adicionar 600 μ L de buffer de lavado AW1 y centrifugar durante 1 min a 6 000 x g.
6. Descartar el fluido filtrado del tubo de colección y volver a montar la columna DNeasy mini, adicionar 600 μ L de buffer de lavado AW2 y centrifugar durante 3 min a 20 000 x g.
7. Pasar el contenido de la columna a un tubo de 1.5 mL y centrifugar 2 min a 20 000 x g para eliminar residuos de los buffers de lavado de la columna. Colocar la columna DNeasy mini en un tubo nuevo y adicionar 100 μ L de agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente por 2 min y centrifugar a 6 000 x g. Adicionar otros 100 μ L de agua e incubar 2 min y centrifugar.
8. Descartar la columna DNeasy mini, medir la concentración de DNA y almacenar a -20 °C hasta su uso.

Anexo 5

Amplificación (PCR) del gen citocromo B (*Cytb*)

Preparación de la reacción a un volumen final de 50 μ L

Para cada muestra se agregaron

	[Final]	Vol. 50 μ L
Buffer 5 X HF	1 X	10 μ L
Primer F	0.5 μ M	1 μ L
Primer R	0.5 μ M	1 μ L
dNTPs 10mM	200 μ M	1 μ L
DNA pol Phusion	1 u	0.5 μ L
DNA	---	2 μ L
Agua	---	34.5 μ L

Programa en el termociclador

98 °C	30 seg	} 30 ciclos
98 °C	10 seg	
58 °C	30 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE, correr gel 40 min a 100 volts.

Anexo 6

Protocolo de ligación de productos de PCR y clonación de plásmidos en *E. coli*, cortes con enzimas de restricción *EcoRI*

Ligación de producto de PCR en vector pCR2.1 de Invitrogen

1. 10X Buffer de ligación	1 μ L
2. pCR 2.1 vector (25 ng/ μ L)	2 μ L
3. Agua libre de nucleasas	5 μ L
4. Producto fresco de PCR	1 μ L (cuando es 400-700 pb)
5. T4 DNA ligasa (4 unidades)	1 μ L
Volumen final	10 μ L

Incubar a 4 °C durante 4 horas mínimo (preferentemente incubar toda la noche).
Proceda a transformar las células.

1. Centrifugar los viales que contienen las reacciones de ligación y colocarlas en hielo.
2. Colocar en hielo un vial con 50 μ L de células competentes para cada transformación.
3. Pipetear 2 μ L de cada reacción de ligación directamente en un vial de células y mezclar suavemente por pipeteo, todo esto en un ambiente estéril (etiquetar adecuadamente).
4. Incubar los viales de células en hielo 30 min, guardar los viales con reacciones de ligación a -20 °C.
5. Dar un choque térmico por 30 s a 42 °C a cada vial sin agitar, e incubar inmediatamente en hielo.
6. Adicionar 250 μ L de medio SOC a cada vial e incubar a 37 °C en un agitador orbital a 225 rpm.
7. Colocar de 10 a 200 μ L de cada transformación en placas de medio LB conteniendo 50 μ g/mL de XGal y 50 μ g/mL de kanamicina o 100 μ g/mL de ampicilina. Distribuir la suspensión celular con una varilla de vidrio.
8. Incubar toda la noche a 37 °C.

Elegir de cada caja tres colonias blancas (portan el plásmido con el gen de interés inserto; las azules no tienen plásmido con el gen de interés inserto). Pinchar con un palillo y colocarlo en un tubo de cultivo con 5 mL de medio LB con ampicilina e incubar toda la noche a 37 °C en agitación a 250 rpm.

Anexo 7

Protocolo de extracción de DNA plasmídico (Miniprep)

Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system Cat. No. A1330

1. Cultivar de 1-5 mL (plásmido con alto número de copias) o 10 mL (plásmido con bajo número de copias) de cultivo bacteriano durante toda la noche, centrifugar por 5 min a 13000 rpm y desechar el sobrenadante.
2. Adicionar 250 μ L de Solución de resuspensión. Mezclar hasta resuspender totalmente la pastilla celular.
3. Adicionar 250 μ L de solución de lisis celular y mezclar por inversión del tubo 4 veces, incubar hasta obtener una suspensión celular clara entre 1-4 min.
4. Adicionar 10 μ L de solución de proteasa alcalina y mezclar por inversión del tubo 4 veces, e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar 350 μ L de solución de neutralización y mezclar por inversión del tubo 4 veces.
6. Centrifugar el lisado bacteriano a 20 000 $\times g$ a temperatura ambiente durante 10 min.
7. En una columna colocada en un tubo de colección de 2 mL., adicionar el sobrenadante transparente, centrifugar a máxima velocidad 1 min. Desechar el fluido filtrado y reinsertar la columna en el tubo de colección.
8. Adicionar 750 μ L de solución de lavado de columna (antes de usar diluir con etanol al 95%). Centrifugar a máxima velocidad por 1 min, remover la columna, desechar el fluido filtrado y reinsertar la columna en el tubo de colección.
9. Repetir el lavado de la columna con 250 μ L. Centrifugar a máxima velocidad por 2 min a temperatura ambiente.
10. Cambiar la columna a un tubo de 1.5 mL y centrifugar a máxima velocidad por 2 min, para eliminar residuos de solución de lavado.
11. Cambiar la columna a un tubo de 1.5 mL nuevo.
12. Eluir el DNA agregando a la columna 100 μ L de agua libre de nucleasas incubar 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a máxima velocidad. Remover la columna y almacenar el DNA a 4 $^{\circ}$ C o -20° C hasta su utilización.

ANEXO 8

Reacción con enzima de restricción EcoRI

Agua	16.3 μ L
Buffer 10X	2 μ L
BSA acetilado	0.2 μ L
DNA	1 μ L (1 μ g/ μ L)
Enzima	0.5 μ L
Volumen total	10 μ L

Incubar por 1-4 h a 37 °C y realizar electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y correr a 80 volts durante 1 h.