



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN
ESTRUCTURAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA
GLUTATIÓN TRANSFERASA SIGMA DE *Taenia
solium*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

VIANEY CAROLINA JIMENO TRONCOSO



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA
2016.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Para la realización de termino de estudio de licenciatura la alumna Vianey Carolina Jimeno Troncoso recibió apoyo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que corresponde al contrato 176925 con el número de becaria 20213.

Cada hombre llega a un campo cada vez más refinado de conocimiento en el cual debe ser un experto para poder competir con otras personas. El especialista sabe más y más sobre menos y menos, finalmente lo sabe todo acerca de nada.

Konrad Lorenz.

Agradecimientos

Gracias papis por darme todo lo que he necesitado hasta llegar a esta meta tan importante que en realidad es de los tres, ya que compartieron mi pasión por la Biología, gracias por darme la mejor herramienta para ser competente en la sociedad sin duda la mejor herencia. Gracias pa por siempre estar a mi lado por todas las desveladas e irme a dejar a la escuela, por aquellas risas que compartimos durante el trayecto, por los sándwiches que me preparaste y por ser mi mejor amigo y tomarme de la mano en el camino, gracias ma por darme todo no cabe duda que sin tu apoyo no hubiera podido concluir mi carrera, de la única forma que puedo agradecerles es cuidarlos como ustedes han cuidado de mí. Gracias a mi abue porque es como mi mamá y a mi hermana que compartimos muchas desveladas haciendo tareas y estudiando tú también eres un pilar en mi vida, gracias a las dos que siempre han estado mí lado cuidándome. Gracias Ana Bahena por tu apoyo incondicional por las palabras de aliento e impulsarme a seguir adelante y por ser parte de mi vida, eres una pieza fundamental para completar esta etapa y las demás que vengan.

La F.E.S.I. me dio a los mejores compañeros de equipo y amigos a “Los Pollos de Cobre” vivimos 3 años juntos compartiendo comida, habitación, fueron tantas carcajadas y enojos, con ustedes viví cosas que siempre recordaré, siempre tendré la dicha de decir que nuestro equipo era el mejor (Aris, Azu, Eliz, Lenin y Salo). A mis amigos Juan Carlos, Ricardo, Anita Castañón, Aranza, Barbara y Arturo gracias también por las carcajadas, consejos y apoyo, por hacer momentos divertidos de desestrés en los pasillos de nuestra máxima casa de estudios.

Quiero agradecer a la Maestra Carmen Alvares Rodríguez por todo lo que me enseñó, por su amistad y sus consejos. Gracias Maestra Irma Dueñas, Maestra Lucía Pavón y Dra. Martha Salcedo por todo su conocimiento que me transmitieron y por su apoyo. Gracias a la M. en C. Laura Aguilar por la foto de *T. solium* que tomamos en el año 2010.

A mi familia que elegí Eduardo Román, Aza, Rigo, Imer, Bere, Toño, Edi y a los Paco's, gracias por todo lo que me han enseñado desde ser disciplinada, ordenada, a divertirme, por cuidarme, por todos sus consejos, gracias Lalo porque desde que llegue al CUATE (Cuerpo de Atención de Emergencias) me has enseñado lo que no te enseñan en un salón de clases cómo la humildad, la empatía, aprender a levantarme y muchas otras cosas más de la vida. Mis CUATE's gracias por todo.

A mis mejores amigos Tania, Saraí, Jorge, Paulina, David, Poly y Bebain gracias porque siempre han estado conmigo apoyándome y dándome fuerza para seguir adelante y a pesar de la distancia siempre están en cada momento de mi vida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de biología molecular de *Taenia solium* gracias Oscar, Aliz y Lucia porque me tuvieron paciencia y me enseñaron mucho, a Nard que también me ha enseñado y ayudado en muchas cosas así como Vera que son como mis hermanitas mayores del lab. Finalmente al Dr. Abraham Landa gracias por aceptarme en el laboratorio, por enseñarme a hacer biología molecular, por dedicarle tiempo a mí proyecto, por su amistad y por todo el conocimiento que me ha transmitido es una gran persona e investigador.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	7
Resumen	9
I. Introducción	10
1.1 Historia y Clasificación de <i>Taenia solium</i>	10
1.2 Morfología	11
1.3 Ciclo de vida	13
1.4 El binomio de enfermedades teniasis y cisticercosis	14
1.5 Diagnóstico	16
1.6 Tratamiento	18
1.7 Cisticercosis Porcina	19
1.8 Epidemiología	20
II. Glutación Transferasas	22
2.1 Las Glutación Transferasa en helmintos parásitos	25
III. Justificación	27
VI. Hipótesis	28
V. Objetivos	28
Objetivo General	28
Objetivos particulares	28
VI. Materiales y métodos	29

5.1 Purificación DNA genómico de <i>Taenia solium</i>	29
5.2 Reacción Cadena Polimerasa (PCR)	29
5.3 Purificación de los fragmentos obtenidos de la PCR	30
5.4 Clonación	30
5.5 Obtención de DNA plasmídico pequeña escala (MINI PREP)	30
5.6 Obtención de DNA plasmídico gran escala (BIG PREP)	31
5.7 Secuenciación	32
VII. Resultados	33
VIII. Discusión	38
IX. Conclusión	40
X. ANEXO	41
XI. Bibliografía	42

Abreviaturas

%	Porcentaje
μ	Micras
μg/mL	Microgramos por mililitro
μL	Micro litros
μm	Micrómetros
Abs	Absorbancia
BrEt	Bromuro de etidio
DNAc	DNA complementario
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfato de desoxirribonucleotidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DNAg	DNA genómico
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación transferasa
GSTS	Glutación transferasa sigma
h	Hora
H ₂ O M.Q	Agua doblemente desionizada
RMN	Imágenes por resonancia magnética
KDa	Kilodaltones
M	Concentración Molar
m	Metros
mm	Milímetros
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Mili Molar
NCC	Neurocisticercosis
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
TAC	Tomografía computarizada
TE	Amortiguador de Tris-HCl con EDTA
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

Las Glutación Transferasas (GSTs) son una familia de enzimas multifuncionales que participan en la degradación de amino ácidos aromáticos, el transporte de moléculas y la formación de canales iónicos. Su principal función es la desintoxicación de una amplia diversidad de agentes tóxicos los cuales inactivan y los convierten en compuestos solubles en agua por medio del ataque nucleofílico de GSH. En eucariontes se encuentran tres familias: citosólicas, mitocondriales y microsomales. Las GSTs citosólicas son las más estudiadas, en helmintos parásitos se han identificado las clases mu (M), alfa (A), pi (P), sigma (S), y omega (O). Las GSTs son el principal sistema de desintoxicación de xenobióticos en helmintos, debido a que carecen del citocromo P450. El parásito del hombre *Taenia solium* presenta tres GSTs citosólicas, una de clase A-P, una de clase M y otra de clase S, con pesos moleculares de 26, 25 y 24kDa, se sabe que las tres GST citosólicas presentes en *T. solium* participan en la desintoxicación y neutralización de agentes endógenos y exógenos tóxicos como especies reactivas de oxígeno (ERO), quimioterapéuticos y agentes químicos además que las de 25 y 26kDa tienen la particularidad de que no poseen reacciones cruzadas con las GSTs de humano (M, P y A) por lo que se han propuesto como blancos para el desarrollo de vacunas o fármacos contra *T. solium*.

En este trabajo a partir de DNAg de *T. solium* se aisló y caracterizó la región estructural del gen que codifica para una GST de clase sigma, la región está compuesta por un total de 1861 pb, se conforma de tres intrones y cuatro exones. Los exones presentan un marco abierto de lectura de 639 pb que codifican para una proteína de 212 aminoácidos. Un alineamiento de esta secuencia con secuencias del GenBank (Blast) mostró que presenta una identidad del 100% con la GST Sigma de *T. solium* obtenida de un DNAc, un 37.3% y un 34.4% con las glutación transferasas Sigma de los trematodos *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis*, respectivamente; en contraste presentó una identidad del 26.8% y 26.4% con las secuencias del humano y del cerdo respectivamente. Este es el primer estudio que caracteriza un gen que codifica para una de las tres Glutación transferasas presentes en *T. solium*.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia y Clasificación de *Taenia solium*

Desde los antiguos Griegos se tienen reportes de la cisticercosis parasitosis causada por *T. solium*, Aristóteles (322-384 a.C) describe a los cisticercos como vejigas o quistes en los músculos de los cerdos y los compara con el granizo. Rumler en 1558 reporta en la autopsia de una persona epiléptica vesículas llenas de líquido presentes en las meninges, y en 1697 Malpighi describe las vesículas (cisticerco) y el escólex de *T. solium*. Hasta el siglo XIX el patólogo Alemán Küchenmeister reconoce la similitud morfológica de la cabeza del parásito adulto y el escólex del cisticerco, demostrando que la ingestión del cisticerco del cerdo causa teniasis intestinal en el humano; y finalmente, Yoshino confirma el conocimiento del ciclo de vida de *T. solium* de manera experimental auto infectándose (Del Brutto *et al.*, 2015).

La clasificación taxonómica de *T. solium* (Becerril, 2014) es la siguiente:

Reino: Animal

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoidea

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia*

Especie: *solium*

1.2 MORFOLOGÍA

Los cestodos o taenias son parásitos que presentan una simetría bilateral, generalmente aplanados dorsoventralmente, carecen de una cavidad y tienen una pared corporal llamada tegumento. No poseen sistema digestivo ni circulatorio por lo que se nutren por absorción directa del tegumento, el sistema osmorregulador y excretor se lleva a cabo por células especializadas llamadas solenocitos o células llama (común en todos los plathelminths). Poseen un sistema neuromuscular compuesto por varias capas musculares, ganglios y cordones nerviosos que permiten el movimiento de la taenia (Botero y Restrepo, 2012; Cheng, 1986).

En su fase adulta el parásito mide 2-7m de longitud, y se comprende de tres partes 1) escólex u órgano de fijación, 2) el cuello o zona germinal y 3) el estróbilo (Fig.1).

- 1) El escólex mide aproximadamente 1mm de diámetro, presenta cuatro ventosas y un róstelo armado con dos hileras de 22-32 ganchos, presenta ganchos largos (180 μ) y cortos (130 μ).
- 2) El cuello se encuentra detrás del escólex, no está segmentado y tiene una gran actividad, en él se lleva a cabo el proceso de estrobilación es decir, se originan los proglótidos.
- 3) La porción más grande del parásito es el estróbilo, el cual se compone de tres tipos de proglótidos (Fig. 1B): los inmaduros que se localizan después del cuello y presentan los sistemas reproductores indiferenciados, en seguida se encuentran los proglótidos maduros que reciben este nombre porque los aparatos reproductores están diferenciados y son sexualmente maduros y finalmente se encuentran los proglótidos grávidos en donde se encuentran los huevos (Schantz, 1996).

Este parásito es hermafrodita y los proglótidos albergan a los órganos genitales masculinos (testículos, canalículos, conducto deferente y bolsa del cirro) y femeninos (ovarios, oviductos, útero y vagina). Ambos se ponen en contacto en el seno genital el cual puede estar en el mismo lado de cada proglótido, la fecundación produce una gran cantidad de huevos (>50000).

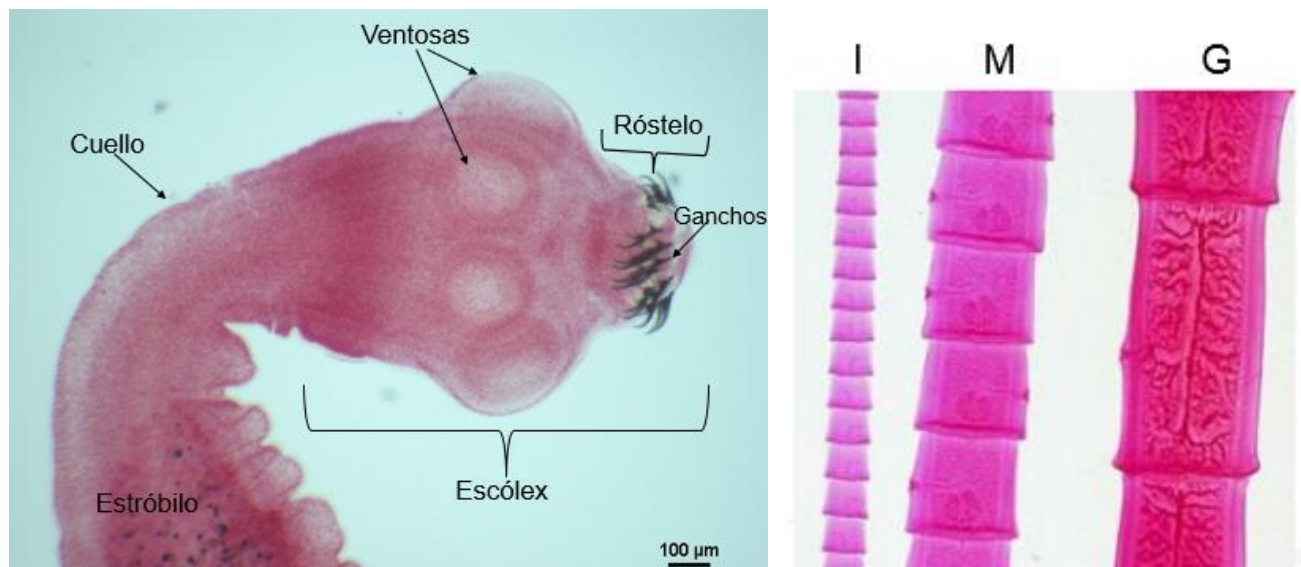


Fig. 1 Morfología del adulto de *Taenia solium*. A) muestra el escólex con su rostelo con ganchos, cuatro ventosas, el cuello y parte del estróbilo. B) muestra los proglótidos inmaduros (I), maduros (M) y grávidos (G) que componen al estróbilo (Tomado de <https://medicinaunal.wordpress.com>).

Los huevos son esféricos y miden de 47-77µm de diámetro poseen una capa vitelina externa y un embrióforo constituido de bloques de queratina que protegen a un embrión hexacanto (seis ganchos) conocido como oncosfera. El estadio de larva se denomina cisticercos o metacestodos, miden de 0.5 a 1.5cm, son de color blanco o amarillento de forma ovalada, la pared es translúcida y a través de la cual se puede ver el escólex (Pumarola *et al.*, 1994). En el hospedero intermediario los cisticercos se presentan de dos formas: los celulosos, que son los más comunes son pequeños de forma esférica u ovalada; y los cisticercos racemosos que se observan en la NCC y se encuentran en la subaracnoides o en los ventrículos del cerebro humano, se observan como una vesícula grande, multilobulada, redondeada con una pared delicada. Ambos presentan tres compartimentos uno interior que contiene al escólex, líquido vesicular y al canal espiral (Deply *et al.*, 2004; Flisser y Pérez, 2006).

La familia Taeniidae incluye tres parásitos que afectan al ser humano *T. solium* (taenia de cerdo), *T. saginata* (taenia bovina) y *T. asiatica*. Las principales diferencias morfológicas entre éstas se muestran en la tabla 1. *T. solium* es la más relevante como patógeno humano debido a que causa dos enfermedades la teniasis (forma adulta del

parásito) y NCC (forma larval) la cual es una de las principales causas de convulsiones y discapacidad neurológica en todo el mundo.

Tabla 1. Diferencias morfológicas de taenias que parasitan al humano.

CARACTERÍSTICA	<i>T. solium</i>	<i>T. saginata</i>	<i>T. asiatica</i>
Hospedero intermediario	Cerdo	Bovino	Cerdo
Alojamiento del metacestodo	Cerebro, piel y músculos	Músculo y vísceras	Hígado
Número de ventosas	4	4	4
Rostelo	Presente	Ausente	Presente
Número de ganchos	22-32	Ausentes	Ausentes
Número de testículos	375-575	800-1200	868-904
Ovario	Trilobulado	Bilobulado	Bilobulado
Ramas uterinas	7-12	18-32	16-21

(Singh y Prabhakar 2002)

1.3 Ciclo de vida

El parásito tiene dos tipos de hospederos: el intermediario (cerdo) y el definitivo (humano). El adulto se aloja en el intestino delgado del humano, en dónde los proglótidos grávidos y los huevos se eliminan por la materia fecal, permaneciendo viables y contaminando el medio ambiente. Cuando el humano o el cerdo consumen alimentos o agua contaminada con los huevos del parásito o el cerdo ingiere heces humanas con huevos, las oncosferas se liberan y se activan en el estómago e intestino por la acción del ácido clorhídrico, enzimas digestivas y bilis; las oncosferas migran por medio del torrente sanguíneo a diferentes órganos y después de 8 semanas alcanzan la segunda fase de desarrollo “cisticerco”. La viabilidad de los cisticercos es por largos períodos por lo que al ingerir carne de cerdo cruda o mal cocida, el escólex evagina y en el tercio superior del duodeno se fija con sus ventosas y ganchos hasta alcanzar la fase adulta y después de tres o cuatro meses empieza a liberar los proglótidos grávidos de esta forma se completa el ciclo biológico de *T. solium*. Otro mecanismo es la autoinfección endógena, que es cuando el gusano adulto sin salir del cuerpo del individuo, regresa los proglótidos por

reflejo del vómito y se liberan las oncosferas de los huevos y al estar en contacto con el jugo gástrico produce cisticercosis (Becerril M, 2014). El parásito *T. solium* en el humano causa dos enfermedades 1) Teniasis cuando el parásito adulto se establece en el intestino delgado y 2) Cisticercosis cuando las oncosferas penetran al sistema circulatorio y migran a órganos como cerebro, corazón, ojo, músculo estriado y tejido subcutáneo.

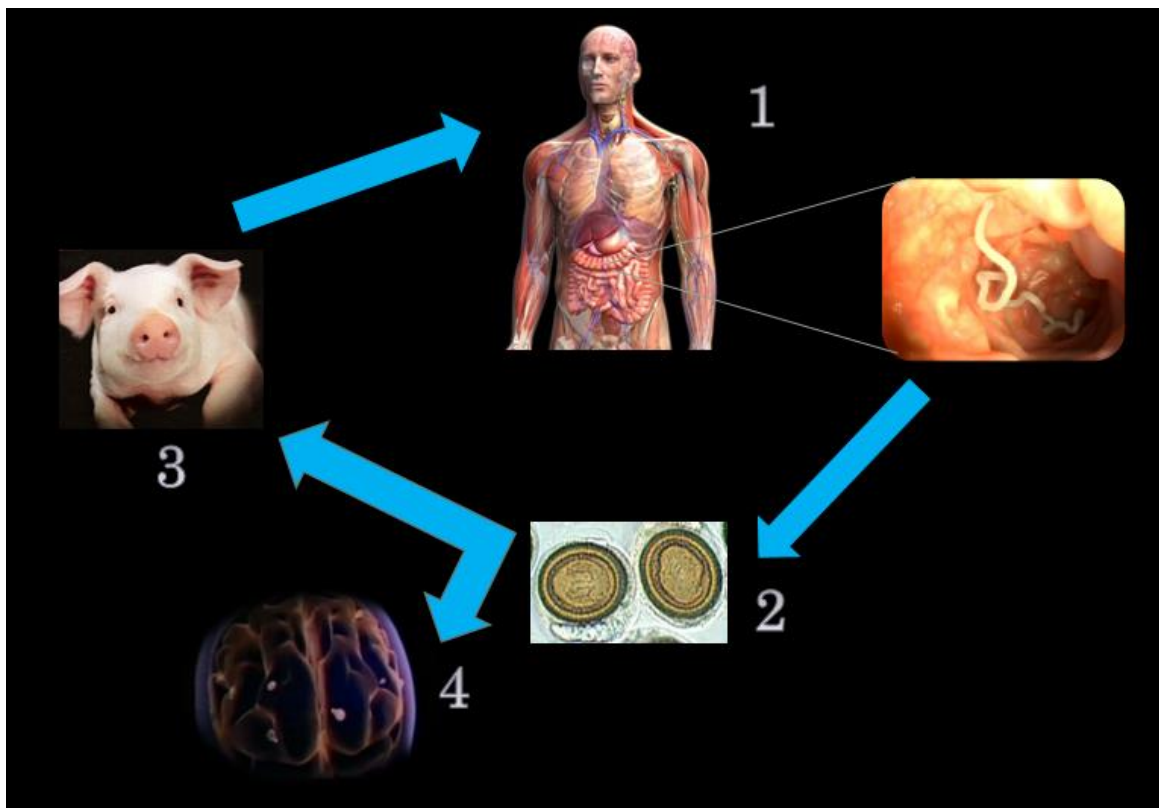


Fig. 2 Ciclo de vida de *Taenia solium*. 1) El humano desarrolla al adulto al ingerir carne de cerdo con cisticercos, este se aloja en el intestino delgado, 2) Los huevos son liberados por la defecación del humano, 3) El cerdo ingiere materia fecal contaminada con huevos y desarrolla la cisticercosis, 4) El hombre desarrolla NCC por consumir huevos o por autoinfección.

1.4 Binomio de enfermedades teniasis y cisticercosis

La teniasis y cisticercosis se consideran un complejo de enfermedades zoonóticas endémicas de países en vías de desarrollo las cuales se encuentran desatendidas. En los países desarrollados en donde se consideraba que habían sido erradicadas se han reportado recientemente casos de NCC debido a la migración de personas de áreas endémicas (Gabriël *et al.*, 2015).

Se considera que la teniasis es endémica en lugares donde el consumo de carne de cerdo es elevado, aunque el hombre es el único hospedero definitivo es el causante de la cisticercosis en humanos y cerdos. La teniasis regularmente es asintomática, aunque la presencia del adulto en el intestino puede provocar algunos síntomas como una ligera irritación en la zona donde se fija, también se puede presentar dolor abdominal con diarrea o estreñimiento, sensación de hambre, pérdida de peso, náuseas, prurito anal y eosinofilia. Los síntomas son muy inespecíficos y se pueden confundir con otro cuadro patológico (Del Brutto, 2013; Becerril, 2014).

La NCC es la enfermedad más grave que produce *T. solium*, presentando manifestaciones clínicas que dependen del número de cisticercos, la localización, estadio del parásito, grado de reacción inflamatoria y las condiciones del hospedero. La manifestación de los síntomas puede presentarse después de 4 años de la infección. Se pueden identificar fases en la NCC, la primera es una etapa vesicular en la que el desarrollo del quiste es exitoso evadiendo los mecanismos de defensa del hospedero, por ejemplo liberando paramiosina que inhibe la activación del complemento a nivel de C1, otro producto es el factor de metacestodo que inhibe la respuesta celular de citosinas como IL-2, IL-4, e IFN- γ y la reacción inflamatoria y por último una cisteína proteasa que es secretada por el parásito limita la cantidad de linfocitos CD4. Posteriormente hay una degradación y se comienza la etapa coloidal cuando el cisticerco se muere y se rompe la cubierta, liberándose todo el contenido. Este proceso involucra una moderada respuesta inflamatoria en la que participan células mononucleares, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Cuando el cisticerco se degrada más o envejece, el hospedero desarrolla una reacción granulomatosa que mata al metacestodo y se inicia el proceso de calcificación (Romero, 2007; Dhesi *et al.*, 2015).

En el 70% de los casos con NCC los pacientes presentan crisis convulsivas, otras de las complicaciones frecuentes son la hipertensión endocraneal y la hidrocefalea. Los síntomas van a estar relacionados con el lugar en donde se encuentre el parásito, ya sea en el parénquima o en los espacios extraparenquimatosos. Generalmente cuando se encuentran en el parénquima va a ocasionar convulsiones que pueden ser focalizadas o generalizadas y los quistes viables pueden sobrevivir años o décadas ocasionando

síntomas como parestesia, anestesia localizada, síntomas visuales y auditivos, cefaleas constantes, afasia y amnesia. La NCC extraparenquimatosa es más agresiva, pues los cisticercos localizados en el espacio subaracnoideo crecen y se convierten en una masa que bloquea la circulación del líquido cefalorraquídeo causando posteriormente una hidrocefalia. A diferencia de la NCC intraparenquimatosa la subaracnoidea es progresiva y está asociada a una mortalidad significativa ya que presenta una tasa de mortalidad de alrededor del 20% (Flisser y Pérez 2006; García *et al.*, 2014).

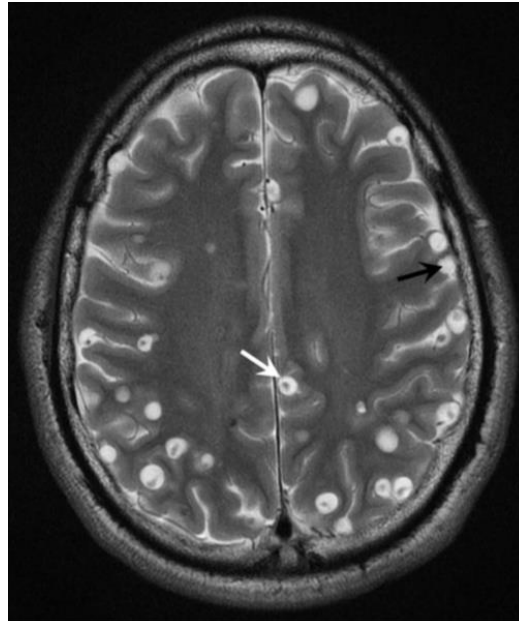


Fig. 3 Imagen de resonancia magnética (IRM) axial que muestra dos fases de la NCC la vesicular (flecha negra) y la calcificación (flecha blanca) (Dhesi *et al.*, 2015).

1.5 Diagnóstico

Teniasis

Para la teniasis se realizan exámenes coproparasitológicos, para buscar en muestras de heces los huevos. Esta técnica no es específica ni sensible ya, que los huevos de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* son morfológicamente muy similares y es necesario colectar al adulto completo o los proglótidos mediante un tamizado de heces. Por el escólex (ganchos) y número de ramas uterinas de los proglótidos se puede saber la especie. Después del tratamiento se observan las heces para saber si el paciente arrojó el cestodo completo. La identificación de la especie de *Taenia* morfológicamente a través de los proglótidos y el rostelo (tabla1), consta de recolectar las heces 24 y 48 horas

después del tratamiento para esto se colocan las heces en tamices de diferentes tamaños de poro, se lava bajo el chorro de agua y se analizan al microscópico. La ventaja que tienen estos métodos es que no son costosos y se pueden realizar varias veces, el rango de especificidad y sensibilidad es del 22.5 al 56%, ya que esto depende de la habilidad y experiencia de la persona que lo realiza.

De las muestras de heces se pueden extraer moléculas del parásito y realizar la técnica de ELISA utilizando anticuerpos de conejo inmunizado contra los antígenos del parásito adulto, este copro-antígeno sólo detecta el género *Taenia* por lo que es imposible diferenciar la especie, para *T. solium* tiene 95% de sensibilidad y 99% de especificidad (Molyneux, 2007).

Los coproensayos usando la PCR con DNA extraído de las heces detectan la especie por medio oligonucleótidos específicos para cada especie de *Taenia*, secuencias de DNA mitocondrial se conocen de las tres especies para *T. saginata* hay una amplificación específica de 827pb, *T. asiatica* amplifica 227pb y *T. solium* amplifica de 720 a 984pb. Las técnicas moleculares están bien desarrolladas ya que presentan alta sensibilidad y especificidad para la identificación de las especies de *Taenia* usando DNA y oligonucleótidos específicos de especie y técnicas de inmunoelectrotransferencia y la PCR. La desventaja de estos métodos diagnósticos es que son muy costosos y en los países endémicos que se encuentran en vías de desarrollo, no se cuenta con el equipo necesario para realizarlos (Dongyou, 2013; Chandra *et al.*, 2013).

Cisticercosis

La NCC se diagnostica por la historia clínica del paciente, estudios de neuroimagen como son la TAC que detecta a los cisticercos que se localizan en el parénquima cerebral o bien por la RMN (simple o de contraste), estas técnicas son útiles para detectar cisticercos que se encuentran a nivel intraventricular y el espacio subaracnoideo ya que muestran el número de cisticercos infectantes, su morfología y localización así como la presencia de inflamación circundante (García *et al.*, 2014; Molyneux, 2007).

La detección de casos de NCC por la serología muestra la presencia de anticuerpos específicos con la reacción de fijación del complemento en líquido cefalorraquídeo con

antígenos para cisticercos. El antígeno de secreción y excreción es el más utilizado en inmunoelctrotransferencia (EITB) y ELISA y presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 98%, cuando da positivo indica que el cisticerco está vivo y los antígenos que libera son producto de su metabolismo (Romero R, 2007; Deckers N y Dorny P, 2010). La técnica de Tsang se basa en una EITB, en la cual se busca el reconocimiento de 8 proteínas de excreción secreción del estadio larvario del parásito, de las cuales 3 son consideradas como diagnósticas GP42, GP39 y GP24. Como ventaja presenta 100% de especificidad y 98% de sensibilidad. Actualmente se cuenta con tres proteínas recombinantes purificadas del mismo método de Tsang, las cuales se definen como antígenos recombinantes (rGP50, rT24H y TsRS1); sin embargo este método tiene como desventaja la obtención del material biológico con el cual se debe trabajar ya que se emplean cisticercos de cerdos infectados naturalmente (Scheel *et al.*, 2005).

A diferencia de la detección de anticuerpos, los antígenos circundantes refieren la etapa viable de los cisticercos además que se puede hacer una predicción de la localización de los mismos ya que en la NCC extraparenquimatosa los niveles de antígenos son diez veces más que en la intraparenquimatosa. También se puede evaluar la eficacia de los antihelmínticos por que los niveles de antígenos caen rápidamente ante un tratamiento. Un método diagnóstico con antígenos es el HP10, que es un antígeno que se detecta con un anticuerpo monoclonal biotilnado, el cual se empleó para la identificación de *T. saginata*, actualmente Fleury y colaboradores lo emplean como diagnóstico de NCC en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía empleando la técnica de ELISA. Este método ayuda a la identificación del cisticerco cuando se localiza en el espacio subaracnoideo, cabe mencionar que esta localización causa una severa hipertensión intracraneal (Deckers N y Dorny P, 2010; Fleury *et al.*, 2007). Los métodos como la TC e IRM son de alto costo y en los países endémicos estos no son de fácil acceso por lo que no se utilizan de forma rutinaria.

1.6 Tratamiento

El tratamiento para la teniasis en un adulto es una administración única de prazicuantel de 10 mg/Kg, este medicamento induce cambios en el tegumento del parásito aumenta la permeabilidad de los iones de calcio, los cuales se acumulan en el citosol de las células

del parásito, le ocasiona una parálisis y el escólex se desprende, por los movimientos peristálticos del hospedero (Botero y Restrepo 2012).

Para la cisticercosis el albendazol tiene una eficacia del 80% en casos parenquimatosos, la dosis es 15mg/kg una dosis al día por 8 días, en forma conjunta se administra dexametasona de 10 a 20mg durante 4 días para evitar reacciones inflamatorias agudas inducidas por la muerte súbita el parásito. El tratamiento sintomático incluye corticoesteroides, antiepilépticos y analgésicos (Romo *et al.*, 2014).

La intervención quirúrgica se indica para la extirpación de cisticercos que se encuentran en zonas importantes que comprometen las funciones del cerebro o donde no llega el medicamento, así como en las formas racemosas, cisticercos oculares y subcutáneos (Becerril, 2014).

1.7 Cisticercosis porcina

La detección de cerdos infectados en granjas lleva a una pérdida económica ya que se sacrifican y al no haber una indemnización orilla a los criaderos a realizar una venta ilegal lo que aumente el riesgo de que más personas sean infectadas, por ello la importancia de dar un tratamiento efectivo a los cerdos que se encuentren infectos (Mkupasi E; Sikasunge C *et al.*, 2013). El diagnóstico de cisticercosis en cerdos se lleva a cabo de manera manual, revisando la parte ventral de su lengua (Molyneux, 2007). El tratamiento es una dosis única de 30 mg/kg de Oxfendazol, el cual se ha demostrado que causa la calcificación de los cisticercos de corazón, músculo y lengua (fig.4) (Mkupasi E; Nogowi H *et al.*, 2013). Se puede prevenir la infección de los cerdos para bloquear la transmisión a los humanos y bloquear el ciclo de vida del parásito, varios enfoques se están evaluando para la creación de una vacuna como la aplicación de antígenos recombinantes y péptidos de la oncosfera, dos de estos antígenos recombinantes designados como TSOL18 y TSOL45 han sido evaluados en América Latina y África los cuales muestran una protección para los cerdos de 00.5-99.9% y 97-98.6% respectivamente (Molyneux, 2007).



Fig. 4 Muestra la imagen de un corazón porcino con los cisticercos calcificados después de un tratamiento con Oxfendazole (Mkupasi E; Nogowi H *et al.*, 2013).

1.8 Epidemiología

En los países en vías de desarrollo de África, Asia y América Latina, la cisticercosis es una enfermedad a la que no se le ha presentado una importancia adecuada y causa una morbilidad significativa. La OMS indica que hay de 2.5 a 5 millones de personas infectadas por teniasis y 50 millones de personas presentan cisticercosis. Para que se cumpla el ciclo de vida de *T. solium* se necesita que los cerdos tengan acceso a las heces humanas por lo que estas condiciones de falta de higiene son comunes en los países en vías de desarrollo y en especial en sus zonas rurales. En los países desarrollados se tienen reportes del binomio de estas enfermedades a causa de la migración, pero se tiene un control de los animales y casi han sido erradicadas. En América Latina varios países son endémicos y la prevalencia de NCC que se tiene es: Colombia 1.8-2.2 %, Brasil 3-5,6 %, México 1.3-10%, Perú 7.1-26.9%, Honduras 16.6-17%, Ecuador 2.6-14.3%, Guatemala 10-17%, Bolivia 22% y Venezuela 4- 36.5% (Boutellie, 2014).

La migración de personas con NCC no representa ningún riesgo para otras personas o para los cerdos, sin embargo las personas que presentan teniasis y no han sido diagnosticadas son el foco de infección para las personas que viven a su alrededor. Hay muy poca información en las zonas endémicas sobre la prevalencia de la teniasis la cual oscilan del 1% al 60%. Sin embargo para la cisticercosis la OMS en 2012 presenta un mapa a nivel mundial (fig. 4) de los países endémicos y de los casos que se presentan por migración a países no endémicos como es el caso de E.U. que la cifra estimada de inmigrantes ilegales es de 3 a 6 millones de personas las cuales provienen de países con endemismo del binomio de estas enfermedades (Gabriël *et al.*, 2015).

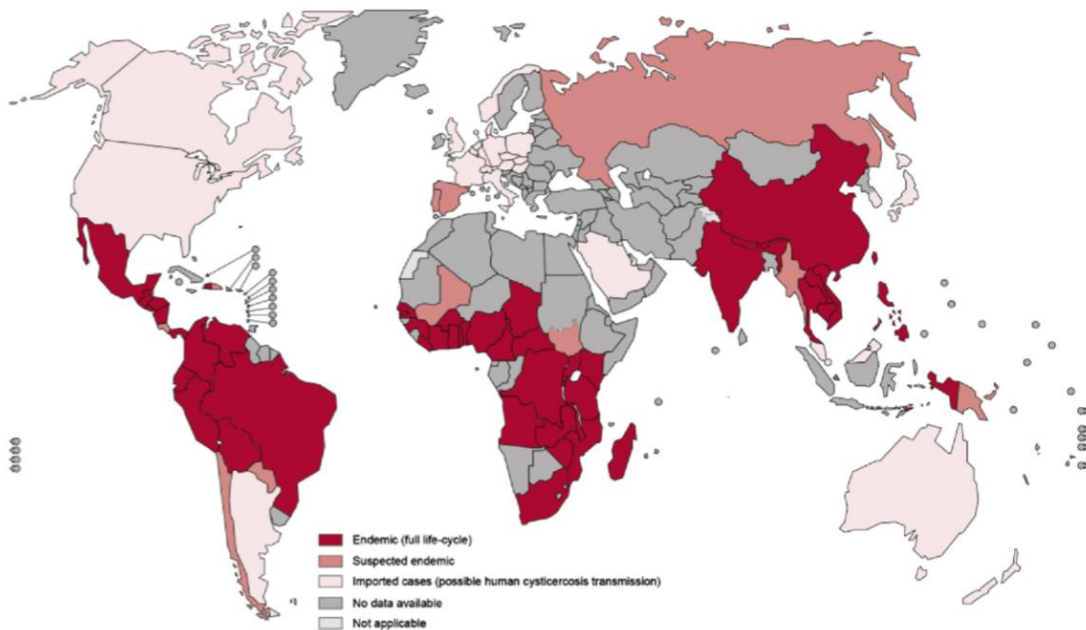


Fig. 5 Prevalencia geográfica de la cisticercosis en el mundo el rojo más intenso hace referencia a los países endémicos, mientras que los países en color gris no se tiene datos reportes de la infección (Gabriël *et al.*, 2015).

En los últimos años en México se han reportado 500 casos de NCC, aunque estos datos no representan la realidad de esta enfermedad, debido a que falta realizar estudios de prevalencia para conocer la cifra real. Se considera que hay una prevalencia del 32% para la cisticercosis, razón por la cual ésta sigue siendo un problema de salud pública en México. Las condiciones rurales del país permiten que el ciclo de vida de este parásito se complete y se mantenga el binomio de las enfermedades que produce *T. solium*

(Fleury *et al.*, 2012). Estos casos de teniasis (12 casos en 2014 y 11 casos en 2015) y cisticercosis (18 casos en 2014 y 21 en 2015) provienen de los estados de Aguascalientes, Chiapas, Guanajuato, Nuevo León, Querétaro, Veracruz, Chihuahua, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, San Luis Potosí y Sinaloa, reportándose para (fig. 6) (Boletín epidemiológico, 2015). Esto demuestra que el parásito está presente en México.

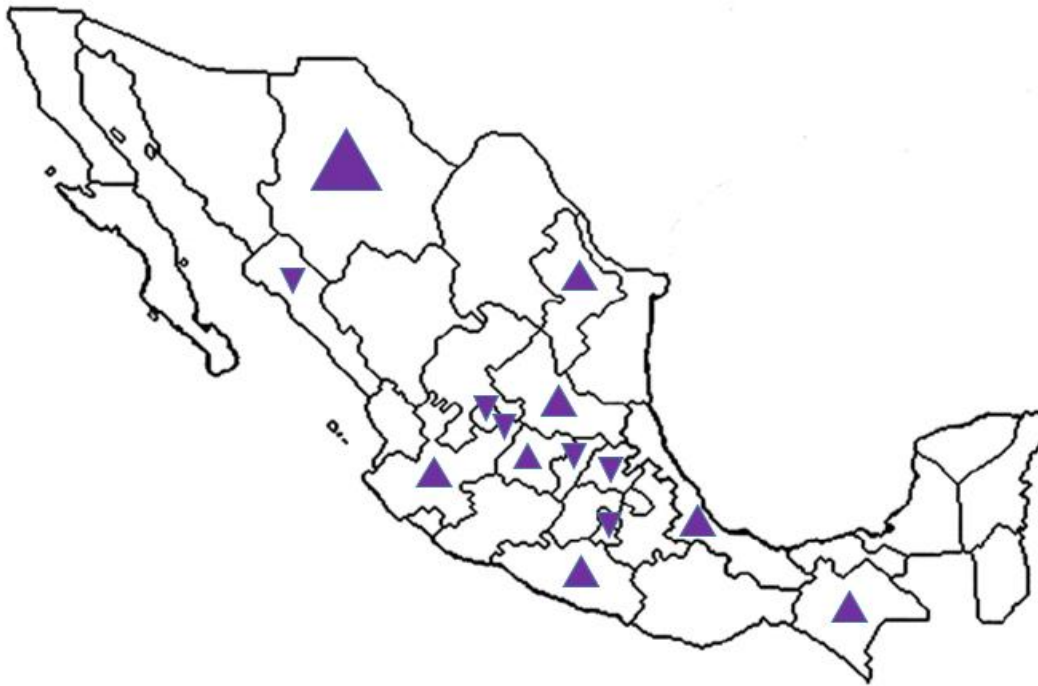


Fig. 6 Estados de la República Mexicana en los que se han reportado (marcados con un triángulo) casos de teniasis o cisticercosis entre los años de 2014 y 2015.

CAPITULO II. GLUTATIÓN TRANSFERASAS

Las GST son una súper familia de proteínas multifuncionales que trasportan moléculas como la bilirrubina, esteroides y hormonas, participan en el catabolismo de amino ácidos aromáticos y forman canales iónicos. Su principal función es que son agentes desintoxicantes ya que inactivan una amplia diversidad de agentes tóxicos conjugando mediante un ataque nucleófilico el GSH a sustratos electrófilos (Armstrong, 1997).

Actualmente por estudios de filogenia sabemos que surgieron en cuatro tiempos diferentes por lo que hay cuatro diferentes familias las citosólicas, las microsomales, las mitocondriales y las bacterianas. Las citosólicas se encuentran las clases mu (M), alfa (A), pi (P), theta (T), sigma (S), zeta (Z) y omega (O) (Pearson W. 2005). En general las GST citosólicas son dímeros de 23 a 30 kDa (de 200 a 250 aminoácidos). Son homodímeros que poseen dos dominios el primero (G) presenta una estructura característica compuesta de láminas β y hélices α ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$) y el segundo dominio (H) se compone sólo de α hélices con un número variable dependiendo de la clase. El dominio N-Terminal o G que corresponde a los primeros 80 residuos de amino ácidos de la proteína, con el motivo estructural $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, donde $\beta\alpha\beta$ realiza la activación del grupo tiol del GSH y el motivo $\beta\beta\alpha$ reconoce la porción γ -Glutamil del GSH y une al motivo $\beta\alpha\beta$ por un bucle de α hélice donde reside la cis-Prolina que es importante para mantener a la proteína en una estructura catalíticamente competente. Este dominio está altamente conservado ya que contiene residuos específicos para unión a GSH utilizando el grupo hidroxilo de la Ser (clase theta y zeta) y la Tyr (clases mu, pi y sigma). El segundo dominio es el C-Terminal o H y está formado de α hélices (4 a 7) que interactúan con los sustratos hidrófobos. Los dominios G y H se unen por una secuencia corta de ~ 10 amino ácidos y ambos constituyen el sitio catalítico de la enzima (Frova 2006). En la fig. 7 se muestra la conformación general de los dominios N-Terminal y C-terminal ya mencionados de las GSTs citosólicas, estos cristales son de las GST de clase M y clase A-P de *T. solium*.

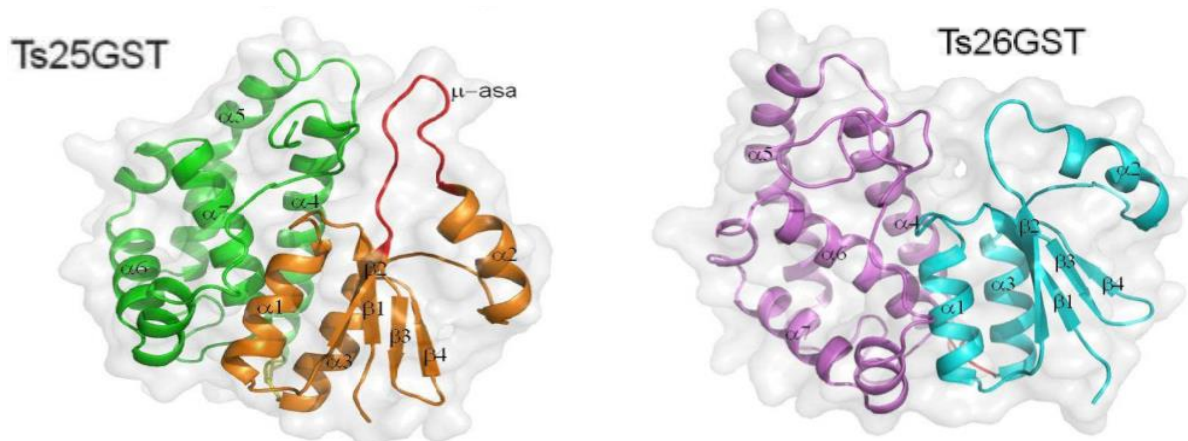


Fig. 7 Muestra los monómeros de las Glutación transferasas de 25 y 26kDa, donde se observa el dominio N-Terminal (naranja y azul) compuesto de tres α hélices y cuatro β (α 1-3 y β 1-4) y el dominio C-terminal compuesto por cinco alfas (α 4-8) verde y morado, respectivamente (Landa, 2014).

Los organismos vivos están continuamente expuestos a xenobióticos, que interactúan en el organismo causando toxicidad y algunas veces hasta efectos cancerígenos. Estos compuestos han aumentado en los últimos dos siglos por los productos químicos artificiales introducidos al medio ambiente, aunque de forma natural también existen como son las toxinas de hongos, fenoles de plantas, las especies reactivas de oxígeno como el ión superóxido ($O_2\bullet$) y el peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). La capacidad de sobrevivir a estos xenobióticos endógenos y exógenos representa una adaptabilidad biológica fundamental (Sheehan., *et al.* 2001).

Como se ha mencionado la principal función de las GSTs es inactivar una amplia gama de moléculas tóxicas exógenas y endógenas y convertirlas en compuestos solubles en agua, por ejemplo haluros de arilo, lactonas, epóxidos, quinonas, ésteres de sulfato y fosfato y alquenos activados, todas ellas moléculas electrofílicas (Wilce y Parker 1994). Su reacción general (fig. 8) consiste en conjugar GSH reduciendo a las moléculas con centros electrofílicos estabilizándolo con el grupo tiol de GSH (Armstrong R, 1998), ya que el GSH es un tripéptido que se conforma de γ -glutamil-cistein-glicina, es una molécula estable debido a que forma un enlace peptídico entre el amino terminal del glutamato y la cisteína. Otra característica importante es que posee un grupo sulfhidrilo o tiol (-SH) que le permite donar átomos de hidrógeno tanto para reducir moléculas oxidadas como para neutralizarlas, de esta forma puede participar en la regulación de enlaces disulfuro y sirve para deshacerse de moléculas oxidantes o electrófilos (Laguna *et al.*, 2013; Bladeren P, 2000).

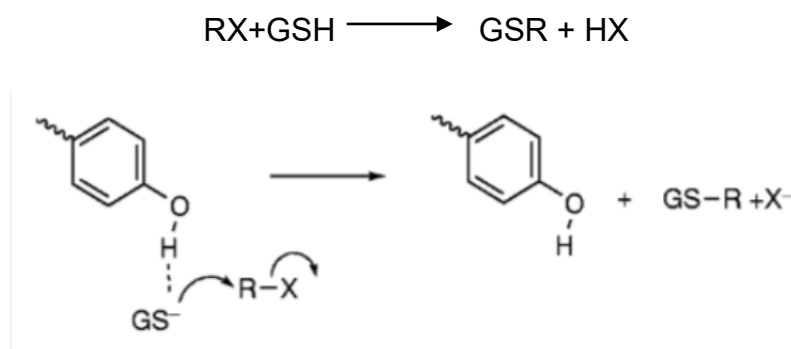


Fig. 8 Reacción de conjugación del GSH (Armstrong R, 1998).

2.1 La GST en helmintos parásitos

Las GSTs son el principal sistema de desintoxicación de agentes xenobióticos en helmintos parásitos debido a que estos organismos carecen del citocromo P450. Hasta la fecha se han identificado en parásitos familias para las clase M, P, S, A y O. En general se muestra una homología alta entre las GSTs de parásitos y mamíferos con ciertos cambios, uno de ellos es la secuencia consenso SNAIL/TRAIL característica de las GSTs de mamífero, la cual está ubicada en el dominio N-Terminal en los residuos 77/68, en los parásitos existe una secuencia sinónima "SMAIA" por lo que este motivo puede identificar si es GST de mamífero o de algún parásito. Se han caracterizado algunas GST de parásitos, lo cual abre un panorama para el desarrollo de inhibidores específicos para éstos (Torres y Landa, 2008); en el caso de *Schistosoma japonicum* se caracterizó la GST de 26kDa de la clase M que codifica 218 amino ácidos, su dominio N-terminal se conforma de residuo 1 al 76 y mantiene la estructura conservada de tres α hélices y cuatro laminas β ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), el dominio N-terminal se une al C-terminal por 7 residuos (77-84), el dominio C-terminal presenta cinco α hélices. Al comparar con la clase M de rata, el sitio de unión a GSH es idéntico pero el sitio de unión a xenobióticos presenta dos residuos aromáticos diferentes (Trp206-Tyr104) lo cual hace más estrecha la entrada de los xenobioticos, lo que proporciona una base estructural para el diseño de fármacos (McTingue *et al.*, 1995).

En el parásito *Fasciola hepatica* se han caracterizado las GST de la clase M y la clase S, con respecto a la clase M presenta cuatro isoformas con las características ya mencionadas en sus dominios N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal está formado de tres α hélices y cuatro laminas β ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), en la primera α hélice se lleva la unión del grupo tiol del GSH por medio de una Tyr (T) en la posición 6 la cual juega un papel importante en la catálisis y el dominio C-Terminal presenta cinco α hélices; la GSTS se expresa durante la embriogénesis y la reproducción, además juega un papel muy importante en el sistema inmune del hospedero, ya que se expresa en gran medida en el parénquima y tegumento donde lleva a cabo la desintoxicación de moléculas del hospedero (Rossojohn J *et al.*, 1997; Lacourse E *et al.*, 2012).

Al igual que en otros parásitos helmintos *T. solium* es capaz de vivir durante largos períodos dentro de sus hospederos, este establecimiento exitoso está relacionado con sus mecanismos de defensa que inactivan la respuesta inmune del hospedero y su alta tolerancia al estrés oxidativo. Se sabe que en la familia Taeniidae presenta un sistema antioxidante enzimático compuesto por una Cu/Zn superóxido dismutasa, tres Glutación transferasas de tipo M, A-P y S, una torredoxina, una tiorredoxina glutatiión reductasa y una 2Cys peroxirredoxina; enzimas antioxidantes que reducen el ión superóxido ($O_2\bullet$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua, en el caso de los helmintos aunque se encuentran en un espacio pobre de oxígeno, se enfrentan al estrés oxidativo de los mecanismos de defensa del hospedero (Vaca *et al.*, 2009). Además se sabe que las tres GST citosólicas presentes en *T. solium* participan en la desintoxicación y neutralización de agentes endógenos y exógenos tóxicos como especies reactivas de oxígeno (ERO), quimioterapéuticos y agentes químicos (Torres y Landa, 2008).

La GSTS es una proteína intracelular que se expresa principalmente en el citosol de las células del parenquima y el escólex de *T. solium*, su DNAC presenta el ORF de 639 pb que codifica para una proteína de 212 aminoácidos que codifican para una proteína de 24.5 kDa. Su forma recombinante presenta actividad enzimática en presencia de 1,2-Dicloro-4-Nitrobenceno (DCNB) y puede ser inhibida por bromosultaleína (BSP). Las GST de 25 y 26kDa en su forma recombinante presentan actividad con DCNB y a varios xenobióticos. Estas últimas GSTs tienen la particularidad de que no poseen reacciones cruzadas con las GSTs de humano (M, P y A) por lo que se han propuesto como blancos para el desarrollo de vacunas o fármacos contra *T. solium*. Cabe mencionar que la inmunización con GST26.5 kDa en un modelo de cisticercosis murino reduce la carga parasitaria en un 90% (Nguyen *et al.*, 2010; Torres y Landa 2008; Vibanco *et al.*, 2002; Landa, 2014).

CAPITULO III. JUSTIFICACIÓN

Se conocen tres GST citosólicas en *T. solium*, las cuales son el principal sistema de desintoxicación en cestodos. Se han clonado los DNAs y generado sus productos recombinantes de cada una de ellas y se sabe que son buenos antígenos vacúnales. Hasta la fecha, no existe ningún reporte sobre la caracterización de los genes que las codifican. Es de importancia estudiar la estructura de los genes, cómo se regulan, y sus productos recombinantes. El conocer lo antes mencionado para la GST Sigma permitirá comparar con las GSTs de los hospederos de este parásito e identificar blancos para desarrollar fármacos que inhiban su regulación y función, además de contribuir en el conocimiento de la genómica y de la biología de *T. solium*.

Es importante reiterar que en los países en vías de desarrollo incluido México, este parásito es endémico, y causa problemas de salud y pérdidas económicas por las enfermedades que produce principalmente la NCC. Las enfermedades causadas por este parásito podrían reducirse, si los gobiernos dotaran de una buena infraestructura sanitaria pública, educación, decomiso de carne de cerdo infectada y tratamiento para los humanos con teniasis. Desafortunadamente los gobiernos no invierten en lo antes mencionados por lo que las universidades han abordado estudios para encontrar blancos esenciales para el parásito y desarrollar vacunas o fármacos en su contra.

CAPITULO IV.

HIPÓTESIS

Si el principal sistema desintoxicante de *T. solium* son las GSTs citosólicas, entre las que está incluida una GST sigma, entonces deberá tener un gen que la codifique.

CAPITULO V.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar de la región estructural del gen que codifica para la GST Sigma de *T. solium* (TsGSTS)

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Preparar DNA genómico a partir cisticercos de *T. solium*.
- 2.- Obtener la región estructural del gen para la TsGSTS.
- 3.- Secuenciar y analizar *in silico* la región estructural del gen.

CAPITULO VI.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Purificación de DNA genómico (gDNA) de *T. solium*.

Se obtuvieron larvas de *T. solium* de cerdos infectados naturalmente, las cuales fueron pulverizadas en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. Se adicionaron 15 volúmenes de amortiguador de lisis. Posteriormente se agregaron 50 µL de Proteinasa K y NaCl 2M se agitó lentamente durante dos minutos y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min en una centrifuga Thermo Legend Micro 21R. Se adicionó fenol y cloroformo se agitó y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio con isopropanol frío a -20°C y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 3 min para recuperar el DNA (pastilla), se lavó 2 veces con etanol frío al 70% y se colocó en el secador de vacío durante 10 min. Terminado el ciclo se re suspendió en 500 µL de amortiguador TE. Se cuantificó el DNA en un espectrofotómetro (260/280 nm) y finalmente se corrió en un gel de agarosa al 2% para verificar la pureza del mismo.

5.2 Reacción Cadena Polimerasa (PCR)

Se realizó una PCR con el estuche (Bio TecMol Amplificasa), utilizando un programa de 30 ciclos (95°C-1 min, 50°C-1 min, 72°C-1 min) para la amplificación de fragmentos específicos de la GST 24. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados a partir del DNAC previamente reportado: GSTS-X1: ATGGATTTACAACCTTAAACAGGCC, GSTS-RA1: ATGCCCTTCAACCAGCTGCCCGTC, GSTS-F2: GTAAGTGAAACTGAGTGGCCC, GSTS-F1R: GAAATCTATGCCTTGGGCTTGAAGAAG, GSTS-F1: CTCTTGGAGGAAATCTATGCCTTGGGCTTGAAGAAG, GSTS-X2: CGCCCAGCTACCGATTTC (Nguyen *et al.*, 2010). Como templado se utilizó gDNA (2 ug) de *T. solium*. Asimismo para verificar los fragmentos clonados en el vector pCRII se utilizaron oligonucleótidos de M13 contenidos en el estuche de TOPO® TA Cloning®, usando el mismo programa de amplificación antes mencionado.

5.3 Purificación de los fragmentos obtenidos de PCR

Los fragmentos obtenidos de la PCR se purificaron del gel de agarosa, a los cuales se les agregó 200 µL de solución de unión del estuche (QI Aquick gel extraction Kit 250) y se incubaron a 60°C para su solubilización, después se colocaron en un tubo de membrana y se dejó 1 min a temperatura ambiente, transcurrido el minuto se centrifugó a 13000 rpm por 3 min en una Thermo Legend Micro 21R y se decantó el sobrenadante, se adicionaron 700 µL de la solución dos del estuche (solución de lavado) y se centrifugó a 13000 rpm por 3 min y se decantó el sobrenadante, el paso anterior se repitió pero con 500 µL, se centrifugó por última vez 13000 rpm por 3 min para retirar el etanol residual. La última centrifugación se realizó con 50 µL de agua bidestilada previamente calentada a 100°C. El sobrenadante se colectó en un tubo y la integridad de los fragmentos y pureza se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

5.4 Clonación del gen

Los fragmentos puros se re amplificaron por medio de una PCR y se clonaron en el vector pCRII utilizando el estuche TOPO® TA Cloning® Kit. Primero se realizó la ligación, se tomaron 4 µL de PCR fresco y se adicionó 1 µL de solución salina y 1 µL del vector, se dejó una hora a temperatura ambiente y se guardó a 4°C; al día siguiente se realizó la transformación en la cepa de *Escherichia coli* TG1 competentes del estuche poniendo 2 µL de la ligación y 30 µL de bacterias, posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por dos minutos, se agregó 200 µL de medio LB y se incubó por 45min a 37°C y 200 rpm. Finalmente se pasó a una caja con medio de cultivo LB y se dejó incubar toda la noche a 37°C.

5.5 PREPARACIÓN PEQUEÑA DE PLÁSMIDO

Se tomó 1.5 ml de un cultivo de 5 ml crecido toda la noche en medio LB líquido a 37°C con agitación a 150 rpm, Los 1.5 ml contenidos en un tubo eppendorf se centrifugó a 10000 rpm por 1 min en una centrífuga Thermo Legend Micro 21R se decantó el sobrenadante y se le adicionaron 200 µL de la solución 1 (SET), el precipitado se re suspendió en un agitador vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se adicionaron 400 µL de la solución 2 de lisis y se mantuvieron en hielo

durante 5 min, transcurrido el tiempo se adicionaron 300 μ L de la solución neutralizante 3, los tubos se agitaron en el vórtex y se mantuvieron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante se puso en un tubo nuevo y se le adicionaron 600 μ l de isopropanol frío y se mantuvo en hielo durante 5 min, después se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante, se adicionaron 100 μ L de etanol al 70% y se centrifugo rápidamente, se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó en un desecador durante 10 min, finalmente el botón se disolvió en 50 μ L en TE.

5.6 PREPARACION GRANDE DE PLÁSMIDO

Un cultivo de 50 mL se creció toda la noche en medio de cultivo LB líquido con ampicilina a una temperatura de 37°C y a 150 rpm. El volumen se repartió en dos tubos falcon de 50 ml y se centrifugó a 3 000 rpm por 10 min en una centrífuga Thermo Legend Micro 21R se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió 500uL en la solución 1 se agito en vortex y se incubo 10 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 10 mL de la solución 2 la suspensión se mezcló vertiendo los tubos dos veces y se mantuvieron en hielo 10 min, se adicionaron 7.5 mL de la solución 3 se agito en vortex y se mantuvieron 10 min en hielo. La suspensión se centrifugó 3000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante se vació en un tubo nuevo, se agregaron 15 ml de isopropanol frío y mantuvieron en hielo durante 10 min se prosiguió a centrifugar a 3000 rpm por 10 min el sobrenadante se desechó y el botón se re suspendió en 200 μ l de TE. A los tubos se les agrego 2 μ L de RNAasa (1 mg/mL) se dejaron incubando durante 30 min a 37°C. Posteriormente a la muestra se le realizó un fenol y cloroformo (1:1) y se centrifugo y el sobrenadante se pasó por una columna de sefarosa CL4B, previamente equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 500 μ L y 10 μ l de cada fracción se observaron en un gel de agarosa al 1% con BrEt. Las fracciones con plásmido se les realizó una precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio 3M pH 5.2 y se mantuvieron toda la noche a -70°C. Las fracciones se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante y el precipitado en el tubo se dejó secar, las fracciones conteniendo el plásmido se re suspendieron en 50 μ L de TE. Finalmente se checó la concentración en

un espectrofotómetro con una celda de cuarzo a 260 y 280 nm y se verificó la integridad en un gel de agarosa al 1% con BrEt.

5.7 Secuenciación y Análisis del gen

La secuenciación de los plásmidos se llevó a cabo con el estuche Thermo Sequence Cy 5.5 Dye terminator Sequencing Kit, en el cual se necesita un mínimo de 500 ng de DNA en un volumen de 12 μ L de agua desionizada. A la dilución anterior se le agrega 1 μ L de cebadores (M13 R y F) marcados fluorescentemente (2-5 μ M) y se agita suavemente, esta mezcla (“master mix”). Para las reacciones de terminación se necesitan 3 μ L de dideoxinucleótidos del estuche repartidos en sus respectivos tubos, uno para A, para C, para G y para T, a cada una de estas reacciones se les agrega 3 μ L de “master mix”, se agitan perfectamente los cuatro tubos y se someten a 20 ciclos de 95°C por 30seg, 55°C por 30 seg y 72°C por un minuto. Terminados los ciclos las mezclas se enfrían a 4°C y entonces se les agrega 6 μ L de amortiguador TE. Todos los elementos anteriores se agitan en un vortex y se someten a 72°C por 3 min y 1 min en hielo. Para mejorar las señales de eliminación por el exceso de fluorocromos, las mezclas antes de ser cargadas en el gel se pasan a través de una microcolumna de sefarosa G50 para eliminar todos los dideoxi nucleótidos y cebadores que no se incorporaron durante la extensión, inmediatamente las muestras se secan al vacío y se resuspenden en 6 μ L de amortiguador de cargador con formamida y colorante. La secuenciación se llevó a cabo con en el secuenciador SEQ4x4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech. Los análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas, así como la traducción de la secuencia a aminoácidos y los alineamientos tipo Clustal se realizaron con el programa PCGENE. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes *Opistorchis viverrini* (GenBank:AAL23713.1), *Clonorchis sinensis* (GenBank: GAA33791.2), *Sus scrofa* (GenBank:XP_003357127.1) y *Homo sapiens* (GenBank: NP_055300.1).

CAPITULO VII. RESULTADOS

Mediante la PCR y utilizando como templado el DNAg obtenido de cisticercos de *T. solium* y oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de DNAc (Fig. 10), previamente reportada (Nguyen *et al.*, 2010). En la Figura 9 se muestran los geles de agarosa al 2% de la amplificación de cuatro fragmentos con los tamaños de: A) ~480pb (carril 1) con los oligonucleótidos GSTS-X1 + GSTS-RA1, ~760pb (carril2) con GSTS-F2 + GSTSF-1R y ~608pb (carril 3) con los oligonucleótidos GSTS-F1 + GSTS-X2. B) ~1.8 kb (carril 3) con los oligonucleótidos GSTS-X1 + GSTS-X2. Ningún fragmento se amplificó en los carriles 1 y 2, donde solamente se utilizó un sólo oligonucleótido del par utilizados en la amplificación del carril 3.

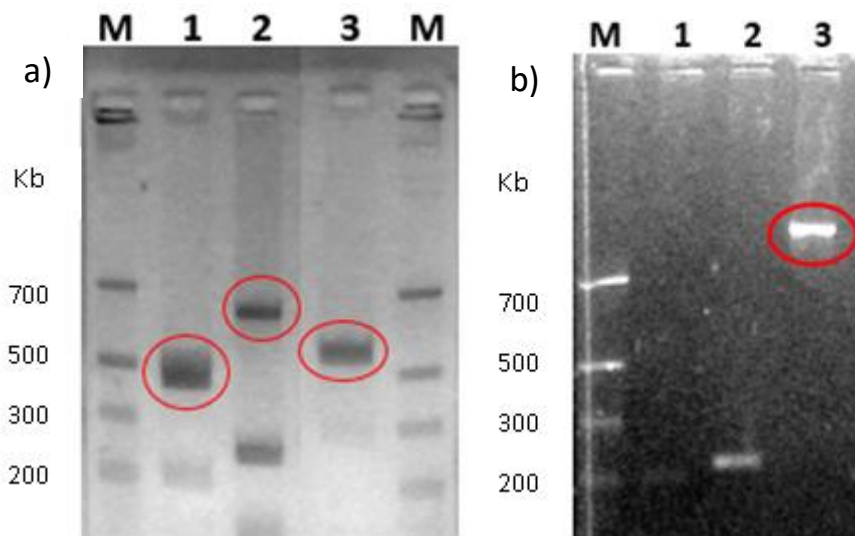


Figura 9. Geles de agarosa al 2% teñidos con BrEt que muestran las amplificaciones por PCR de la región estructural del gen para la Glutación transferasa sigma de *Taenia solium*, utilizando DNA genómico como templado con los oligonucleótidos A) GSTS-X1 + GSTS-RA1 (carril 1), GSTS-F2 + GSTSF-1R (carril 2) y GSTS-F1 + GSTS-X2 (carril 3). B) GSTS-X1 (carril 1), GSTS-X2 (carril 2), y GSTS-X1+ GSTS-X2 (carril 3). M marcador de tamaño molecular (200, 300, 500 y 700 pb).

En la figura 10 se muestra la secuencia de la región estructural del gen para la GST Sigma de *T. solium* obtenida de los tres primeros fragmentos amplificados de la Fig. 9A La cual presenta un total de 1870pb, con una composición de bases nitrogenadas de 562 Adeninas (30.19%), 426 Citosinas (22.89%), 364 Guaninas (19.55%) y 509 Timinas (27.35%). La secuencia se compone de tres intrones y cuatro exones. Los intrones

corresponden al grupo III denominados empalmosoma que generalmente tienen los dinucleótidos GT en el extremo 5' y AG en el extremo 3' los cuales marcan el sitio de corte y empalme. Cabe mencionar que el fragmento de ~1.8 kb amplificado con los oligonucleótidos (Fig. 9B) que flanquean la región estructural del gen (GSTS-X1 y GSTS-X2) para la GSTS de *T. solium*, al ser secuenciado mostro una secuencia de nucleótidos y aminoácidos idéntica a la de los 3 fragmentos antes mencionados.

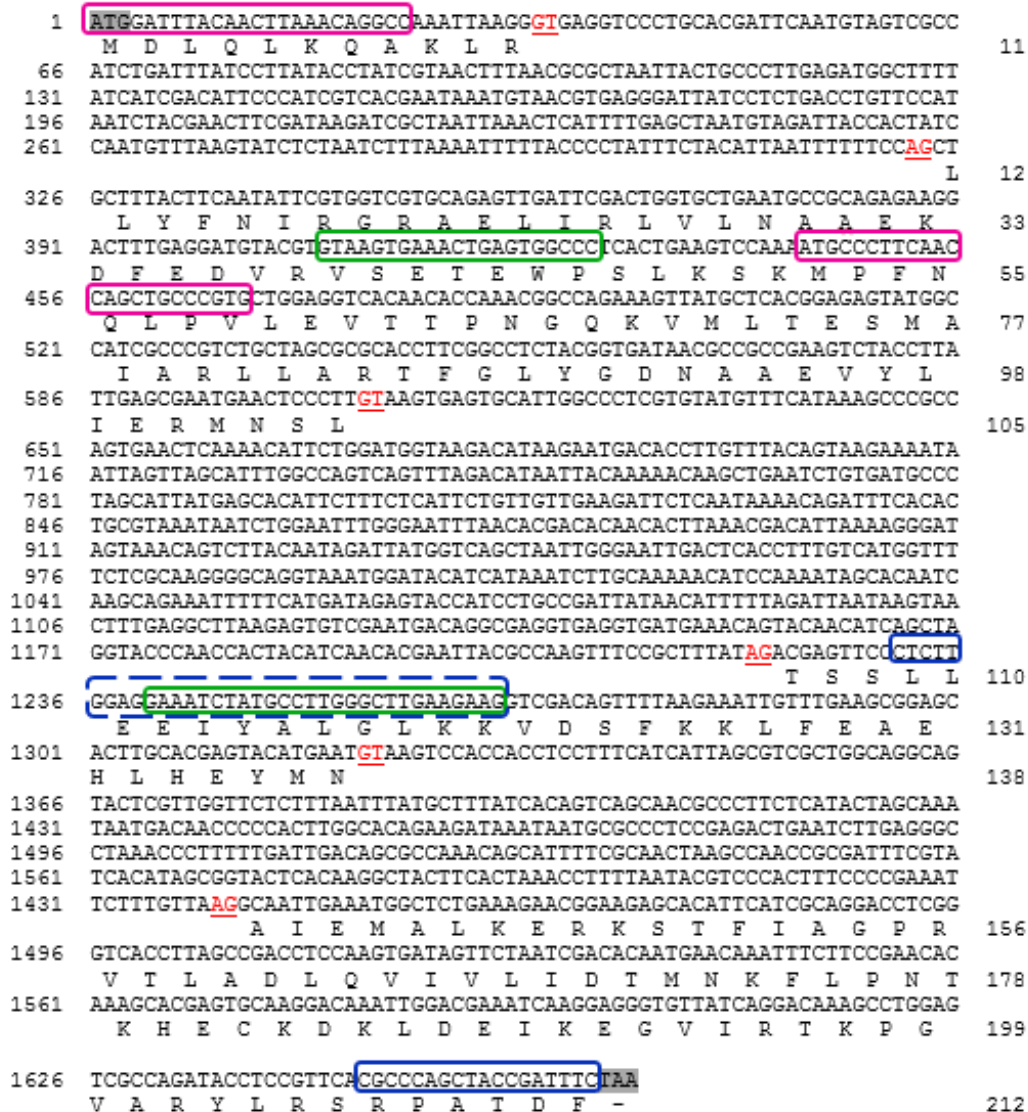


Fig. 10 Secuencia de nucleótidos y amino ácidos de la región estructural del gen para la Glutación transferasa sigma de *T. solium*. Los números del lado izquierdo corresponden a los nucleótidos (1821 pb) y los números del lado derecho corresponden a los aminoácidos (212 aa). Los codones de inicio (ATG) y de término (TAA) se observan subrayados de color gris, los cuatro exones y los tres intrones se delimitan por los sitios de corte y empalme (GT y AG en rojo). Las regiones encerradas en una caja con el mismo color indican los pares de oligonucleótidos y la posición utilizados para amplificar los fragmentos, en rosa GSTS-X1 y GSTS-RA1, en verde GSTS-F2 y GSTS-RA2, y en azul GSTS-F1 y GSTS-R.

En la figura 11 se muestra una comparación de los exones de la región estructural obtenida del gen de *T. solium* con los genes homólogos de sus dos hospederos el cerdo (GenBank NC_010450.3) y el humano (GenBank:NC_000004.12). Los mamíferos mantienen el mismo número de exones (5) y estos codifican para la misma cantidad de amino ácidos, expresando una GSTS de 199 residuos, mientras que *T. solium* presenta 4 exones que expresan una GSTS de 212 residuos. Por otro lado *T. solium* presenta 3 intrones el primero es de 290pb, el segundo de 616pb y el tercero de 316pb, en contraste las GSTS de ambos hospederos presentan 4 intrones que codifican diferentes tamaños, el primer intrón es de 6,498pb y de 16,531pb para cerdo y humano respectivamente. El segundo intrón es de 5,586pb en el cerdo y 9,129pb en el humano y el tercer intrón presentan 5,264pb y 6,389pb respectivamente, estos tres intrones y coinciden en posición con los intrones de *T. solium*. El último intrón es el más pequeño y sólo está presente en los mamíferos u hospederos y presenta un tamaño de 4,801pb en el cerdo y de 2,501pb en el humano.

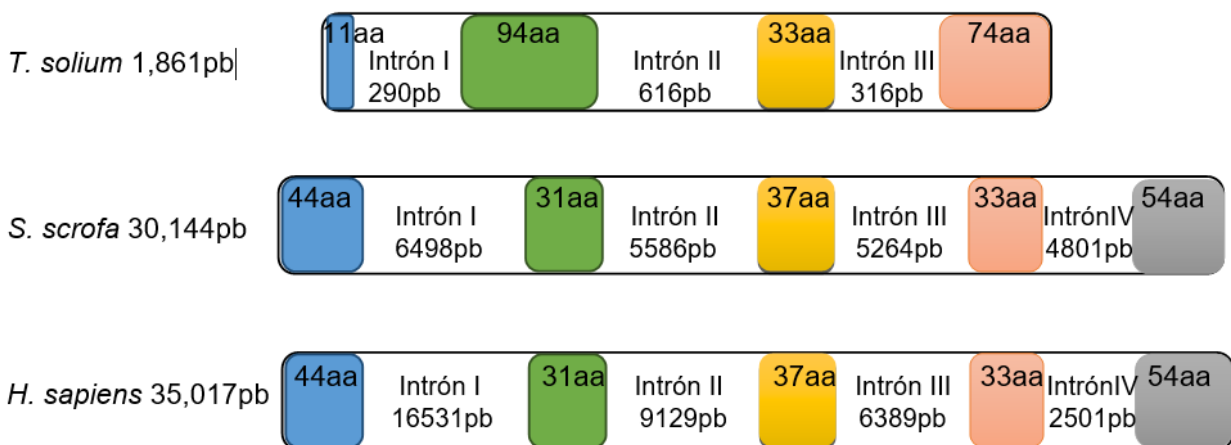


Fig. 11 Comparación de la región estructural del gen que codifica para GST Sigma de *T. solium* y sus hospederos el humano y el cerdo (mamíferos). El primer exón codifica para 44 residuos en los hospederos y 11 residuos en *T. solium* (azul), el segundo exón de *T. solium* codifica para 94 residuos, y en los hospederos para 31 residuos (verde), el tercer exón de *T. solium* codifica para 33 residuos mientras que en los hospederos codifica para 37 residuos (amarillo), el cuarto exón de *T. solium* codifica para 74 residuos, en contraste con el de los hospederos que codifica para 33 (naranja). Se observa que los mamíferos poseen un quinto exón que codifican para 54 residuos (gris).

Con la secuencia de amino ácidos obtenida de la región estructural del gen para la GSTS de *T. solium*, se realizó un análisis tipo Blast y un Clustal con otras GSTS (fig.12). Se observó que la que la secuencia obtenida de la región estructural de *T. solium* es idéntica en 100% a la secuencia reportada por Nguyen *et al* (2010), con respecto a las GSTS de helmintos parásitos tiene un 37.3% de identidad con *Opisthorchis viverrini* (OvGSTS) y 34.4% con *Clonorchis sinensis* (CsGSTS). Las identidades con sus hospederos *Homo sapiens* (HsGSTS) y *Sus scrofa* (SsGSTS) son 26.8% y 26.4% respectivamente.

En esta misma figura encontramos el motivo (88-L/YMA/GD/CDNK-91) que divide los dominios G y H de la enzima y los residuos que participan en la activación del GSH (sitio G) como Tyr (Y) 14, Phe (F) 15, Arg (R) 20, Trp (W) 45, Lys (K) 49 , Lys (K) 56, Ile (I) 57, Pro (P) 53, Pro (P) 58 , Ser (S) 75 y Ser (S) 108. Así mismo, se muestran los residuos que interacciones con los sustratos hidrofóbicos (sitio H) Ile (I) 17, Arg (R) 18, Gly (G) 19, Arg (R) 20, Glu (E) 22, Leu 23, Ser (S) 107, Leu (L) 110, Glu (E) 111, Leu (L) 116, Val (V) 166, Thr (T) 170 y Phe (F) 212 (Jowsey I *et al.*, 2001).

También se encontró el motivo característico (75-S/GMAIA-79) que define a las GSTs de los helmintos (Torres y Landa 2008).

Los residuos en el sitio H que no se conservan en *T.solium* son Ser (S) 107, Glu (E) 111 y Leu (L) 167.

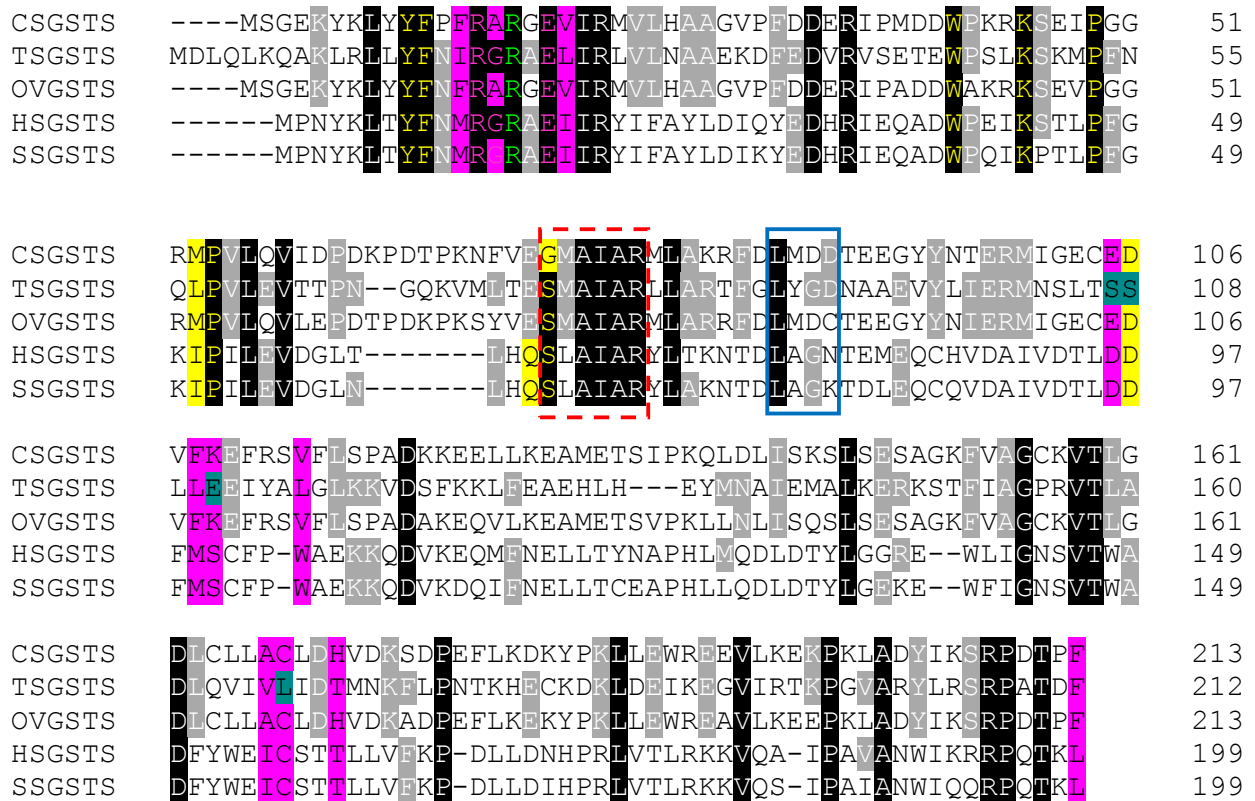


Fig. 12 Alineamiento múltiple de la Glutación transferasa Sigma de *Taenia solium* (TsGSTS) con otras glutaciones homologas como la de *Opisthorchis viverrini* (OvGSTS), *Clonorchis sinensis* (CsGSTS), *Homo sapiens* (HsGSTS) y *Sus scrofa* (SsGSTS). Los amino ácidos importantes para la unión a GSH se encuentran marcados de amarillo, la R 20 que interacciona con el GSH y los sustratos hidrofóbicos está en verde. Se muestra el motivo consenso para GSTS de helmintos (75-S/GMAIA-79, caja punteada en rojo). Los residuos que unen a los dominios G y H están marcados con una caja azul. Los residuos marcados de rosa son los que presentan las interacciones con los sustratos hidrofóbicos y los amino ácidos en verde son residuos que no se conservan para la interacción con los sustratos hidrofóbicos. Los amino ácidos con fondo negro están conservados en la enzima y los de fondo gris presentan identidad con *T. solium*

CAPITULO VIII.

DISCUSIÓN

Se obtuvo una sola banda de DNA genómico íntegro con un tamaño por arriba de 23 kb observado en un gel de agarosa al 2% teñido con BrEt, este resultado coincide con lo descrito para *T. solium* (Aguilar *et. al.*, 2006).

Así mismo, se obtuvo la región estructural del gen que codifica para la GSTS del parásito mediante la PCR usando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de una GSTS de *T. solium*, previamente reportada (Nguyen *et al.*, 2010). La secuencia nucleotídica presentó un tamaño de 1870pb con 3 intrones y 4 exones, en contraste la región estructural del gen que codifica la GSTS en humanos y cerdo presentan un tamaño de 35,017pb y 30,144 pb, así como la presencia de cinco exones y cuatro intrones. La comparación de esta región estructural del gen de *T. solium* con la de sus hospederos mostró diferencias en cuanto al tamaño como a la posición de los intrones y exones (Kanaoka Y *et al.*, 2000, Groenen M *et al.*, 2012; GenBank NC_010450.3). Los sitios de corte y empalme que eliminan los intrones dejan los dinucleótidos GT en el extremo 5' y AG en el 3', los intrones pertenecen al grupo tres denominados empalmosoma, este es un complejo proteico formado por pequeñas ribonucleoproteinas nucleares (snRNP), en eucariontes hay 5 snRNA (U1, U2, U4, U5 Y U6); (Nguyen *et al.*, 2010; Nelson D y Cox M, 2009). Estas diferencias en longitud y secuencia de los intrones podrían ser de gran utilidad para determinar polimorfismos, así como de gran utilidad para el desarrollo de un método diagnóstico del parásito.

Por otro lado, los análisis del alineamiento múltiple de la secuencias proteicas mostraron que todas las especies tanto de helmintos como la de los mamíferos mantienen conservados muchos de los amino ácidos que se utilizan en la conjugación del GSH a los sustratos hidrofóbicos, como son la Tyr (Y) 14 que activa al grupo tiol del GSH, el Trp (W) 45 y la Lys (K) 49 que estabilizan al γ -glutamil del GSH y la Ser (S) 75 que une a la glicina de GSH. Por otro lado, también existen cambios en los amino ácidos que conjugan al GSH a los sustratos hidrofóbicos como el del Asp (D) 108 que es cambiado por una Ser (S) que forma el segundo enlace de hidrogeno con el glicil del GSH, con respecto a

los residuos que interaccionan en los sustratos hidrofóbicos en el dominio H hay varios cambios como son el de Asp (D) 107, la Ser (S) 111 y la Cys (C) 167 presentes en todas las GSTS analizadas pero que cambian por una Ser (S), un Glu (E) y una Leu (L) en *T. solium*, respectivamente. Por ahora no sabemos si estos cambios son relevantes para la unión a los sustratos hidrofóbicos que esta enzima conjuga (Nguyen 2010; Jowsey I *et al.*, 2001). Finalmente la alta identidad que presenta la región codificante de la región estructural del gen para la GSTS de *T. solium* con la de las GSTS de *T. solium* reportada por Nguyen *et al* (2010) y su alta identidad con las GSTS de helmintos, así como la conservación de los residuos catalíticos, y su masa molecular de ~24 kDa muestra que la secuencia obtenida del DNAG de *T. solium* en este trabajo codifica para una Glutación transferasa de la clase Sigma (Jowsey I *et al.*, 2001; Nguyen *et.al.*, 2010; Armstrong, 1997; Torres y Landa 2008; Lacourse E *et al.*, 2012; Wu Z *et al.*,2007; Bae Y *et al.*,2016; Eursitthichai *et al.*, 2004).

La importancia de la GSTS radica en que participa en varios procesos como son la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, la regulación de la respuesta inmune, la vasodilatación, la bronco constricción, la embriogénesis, el desarrollo de testículos y ovarios, la reproducción, la prevención de la agregación plaquetaria, la relajación del músculo liso, la regulación de la función de las células nerviosas y tiene un efecto anti proliferativo frente a células tumorales (Jowsey I *et al.*, 2001; Lacourse E *et al.*, 2012). Todos estos procesos antes mencionados ayudarían a *T. solium* a establecerse y desarrollarse por largo tiempo en el hospedero. Por otro lado, la GSTS se expresa abundantemente en el adulto de *T. solium*, una de las funciones vitales del adulto es la producción de huevos, puesto que este organismo es hermafrodita, depende de la formación adecuada de testículos y ovarios para la embriogénesis, por eso la inhibición de actividad podría ser utilizada como blanco para matar al parásito.

Finalmente, este es el primer trabajo que publica la región estructural de un gen para una de las tres GSTs citosólicas que conforman el sistema de desintoxicación de *T. solium*.

CAPITULO IX.

CONCLUSIÓN

- ❖ Se obtuvo la secuencia de la región estructural del gen que codifica para la Glutación transferasa Sigma de *T. solium*
- ❖ Esta región presenta 4 exones que codifican para una GST Sigma con 212 amino ácidos.
- ❖ La secuencia de amino ácidos de la GST Sigma de *T. solium* presenta una baja identidad (26.8%) con respecto a las de sus hospederos definitivo (humano) e intermediario (cerdo).
- ❖ Estos estudios abren un panorama para seguir estudiando el gen y su producto, tal como el mecanismo de regulación de éste y el desarrollo de una vacuna o inhibidores de su actividad y función.

CAPITULO X.

ANEXO

Amortiguador de lisis:
Solución Tris a 0.05M
HCl pH 8
EDTA 0.5%

Amortiguador TAE:
Tris HCl-acético 0.04M
EDTA 0.002M pH8

Amortiguador TE:
Tris HCl 10mM
EDTA 1mM pH8

Gel de Agarosa 2%:
Agarosa 4.8g de
Amortiguador TAE 420mL
Bromuro de etidio 30 μ L.

Medio LB:
Tryptona 10gr
Extracto de lavadura 5g
NaCl 10gr
Agar bacteriológico 10.5 g

Solución 1 (SET):
Glucosa 50 mM
EDTA 10 mM
Tris 25 mM pH 8.0.

Solución 2 (lisis):
NaOH 0.2 M
SDS 1% (p/v).

Solución 3 (neutralización):
Acetato de amonio 7.5 M.
SDS 1% (p/v)
H₂O

CAPITULO XI.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Aguilar H., Bobes R., Carrero J., Camacho R., Cevallos M., Dávila G., Rodríguez M., Escobedo G., Fernández J., Fragoso G., Gaytán P., Garciarubio A., Gónzales L., Jiménez L., Laclette J., Landa A., Larralde C., Morales J., Morett E., Ostoa P., Sciutto E., Santamaría R., Soberón X., Torre P., Váldez V. y Yañez J. (2006). The genome project of *Taenia solium*. *Parasitology International*. Pp. 27-30
- 2.-Armstrong R. (1997). Structure, Catalytic Mechanims, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxicol.* Pp 2-18.
- 3.-Armstrong R. (1998). Mechanistic imperatives for the evolution of Glutathione Transferases. *Current Opinion in chemical Biology*. Pp 618-623.
- 4.-Bae Y., Kim J., Kong Y., (2016) Phylogenetic characterization of *Clonorchis sinensis* protein homologous to the sigma-class glutathione transferase and their diferencial expresion profiles. Elsevier. Pp 1-10.
- 5.-Becerril M. (2014). *Parasitología Médica*. Mc Graw Hill. 4ta edición. Pp 179-184.
- 6.-Bladeren P. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions*. Pp 61-76.
- 7.-Botero D y Restrepo M. (2012). *Parasitosis humanas incluye animales venenosos y ponzoñosos*. Corporación para investigaciones biológicas. 5ta edición pp187-198.
- 8.-Boutellie B. (2014). Épidémiologie de la cisticercosis et de la neurocysticercose. *Médecine et santé tropicales*. Pp 367-374.
- 9.-Chandra S., Korol D. (2013). Laboratory diagnosis of *Taenia asiatica* in humans and animals. *Tropical Parasitology*. Pp 120-124.
- 10.-Cheng T. (1986). *General Parasitology*. Academic Press. Inc. 2da edición. pp 387-443.
- 11.-Deckers N y Dorny P. (2010). Inmunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cisticercosis. Elsevier. Pp 137-142.
- 12.-Del Brutto O. (2013). Neurocysticercosis in infants and toddlers: Report of seven cases and review of published patients. *Elsevier Pediatric Neurology*. Pp 432-435.
- 13.-Del Brutto O., García H. (2015). *Taenia solium* Cysticercosis- The lessons of history. *Journal of the Neurological Sciences*. Pp 1-4.

- 14.-Delpy R., Gisset M. y Klotz F. (2004). Cestodoses adultes. Elsevier. Pp. 11–32.
- 15.-Dhesi B., Karia S., Adab N., Nair S. (2015). Imaging in neurocysticercosis. *Pract Neural*. Pp 135-137.
- 16.-Dongyou L. (2013). Molecular detection of human parasitic pathogens. CRC Press Taylor Group. Pp 297-305.
- 17.-Eursitthichai V., Viyanant V., Grams S., Sobhon P., Uptham S., Hofmann A., Korge G., Grams R. (2004). Molecular cloning and characterization of Glutathione S-transferase Encoding Gene from *Opistorchis viverrini*. *Asian Pacific Journal of allergy and immunology*. Pp 219-229.
- 18.-Fleury A., Hernández M., Avila M., Cárdenas G., Bobes R., Huerta M., Fragoso G., Uribe L., Harrison L., Parkhouse R., Sciutto E. (2007). Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and followup of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *Neural Neurosurg Psychiatry*. Pp 970-974.
- 19.-Fleury A., Sciutto E., Carralde C. (2012). Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Pública de México*. Pp 632-636.
- 20.-Flisser A y Pérez R. (2006). Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos mexicanos. 1ra edición. Pp 338-353.
- 21.-Frova C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. Elsevier. Pp. 149-169.
- 22.-Gabriël S., Johansen M., Pozio E., Smit G., Devleeschauwer B., Papadopoulus E., Giessen J., Porny P. (2015). Human migration and pig/pork important in the European Union: What are the implications for *Taenia solium*. Elsevier. Pp 38-45.
- 23.-García Hector., Nash T., Del Brutto. (2014). Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology*. Pp 1202- 1215.
- 24.-Groenen M., Archibald A., Uenishi H., Tuggle C., Takeuchi Y., Rothschild M., Gaillard C., Park C., Milan D., Megens H., Li S., Larkin D., Kim H., Frantz L., Caccamo M., Ahn H., Aken B., Anselmo A., Anthon C., Auvil L., Badaoui B., Beattie C., Bendixen C., Berman D., Blecha F., Blomberg J., Bolund L., Bosse M., Botti S., Bujie Z., Bystrom M., Capitanu B., Carvalho D., Chardon P., Chen C., Cheng R., Haeng S., Chow W., Clark R., Clee C., Crooijmans R., Dawson H., Dehais P., De Sapio F., Dibbits B., Drou N., Du Z., Eversole K., Fadista J., Fairley S., Faraut T., Faulkner G., Fowler K., Fredholm M., Fritz E., Gilbert J., Giuffra E., Gorodkin J., Griffin D., Harrow J., Hayward A., Howe K., Hu Z., Humphray S., Hunt T., Hornsh H., Jeon J., Jern P., Jones M., Jurka J., Kanamori H., Kapetanovic R., Kim J., Kim K., Kim T., Larson G., Lee K., Leggett R., Lewin H., Li, W Li., J Loveland., Y Lu., J Lunney., J Ma., O Madsen., K Mann., L Matthews., S McLaren., T Morozumi Y., Murtaugh M., Narayan J., Nguyen D, Ni P, Oh S., Onteru S., Panitz F., Park E., Park H., Pascal G., Paudel Y., Enciso M., Ramirez R., Reecy J., Rodriguez S., Rohrer

G., Rund L., Sang Y., Schachtschneider K., Schraiber J., Schwartz J., Scobie L., Scott C., Searle S., Servin B., Southey B., Sperber G., Stadler P., Sweedler J., Tafer H., Thomsen B., Wali R., Wang J., Wang J., White S., Xu X., Yerle M., Zhang G., Zhang J., Zhang J., Zhao S., Rogers J., Churcher C., Schook L. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. Pp 393-398.

25.-Jowsey I., Thomsom A., Flanagan J., Murdock P., Moore G., Meyer D., Murphy G., Smith S., Hayes J. (2001). Mammalian class Sigma glutathione S- transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH- dependent prostaglandin D₂ synthases. *Biochem. J.* Pp 507-516.

26.-Kanaoka Y., Fujimori K., Kikuno R., Sakaguchi Y., Urade Y., Hayaishi O. (2000). Structure and Chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D syntase Conservation of the ancestral genomic structure of Sigma- class glutathione S-Transferase. *Eur J. Biochem.* Pp 3315-3322.

27.-Laguna J., Piña., Martínez F., Pardo J., Riveros H. (2013). *Bioquímica de Laguna*. El manual moderno S.A de C.V. 7ma edición. Pp 415-417.

28.-Landa A. (2014). *Bioquímica y Biología Molecular de Taenia solium*. Editorial Académica Española. Pp 50-62.

29.-Lacourse E., Perally S., Morphew R., Moxon J., Prescott M., Dowling D., O'Neill S., Kipar A., Hetzel U., Hoey E., Zafra R., Buffoni L., Pérez J., Brophy P. (2012). The sigma class Glutathione Transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Plos Neglected Tropical Diseases*. Pp 1-14

30.-McTingue M., Williams R., Tainer J. (1995). Crystal structures of a Schistosomal drug and vaccine target : Glutathione S-Transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading Antischistosomal drug praziquantel. Elsevier. Pp 21-27.

31.-Mkupasi E., Sikasunge C., Ngowi H., Johansen M. (2013). Efficacy and safety of Anthelmintics tested against *Taenia solium* Cysticercosis in pig. *Plos Neglected Tropical Diseases*. Pp 1-7.

32.-Mkupasi E., Ngowi H., Leifsson O., Johansen M. (2013). Efficacy of ivermectin and oxfendazole against *Taenia solium* cysticercosis and other parasitoses in naturally infected pigs. Elsevier. Pp 48-53.

33.-Molyneux D. (2007). *Control of Human parasitic diseases*. Elsevier. 1ra edición. Pp 509-547.

34.-Nelson D., Cox M. (2009). *Principios de bioquímica*. Ediciones omega. 5ta edición. Pp 1036-1039.

35.-Nguyen H., Bae Y., Lee E., Kim S., Diaz S., Nawa Y., Kang I.,Kong Y. (2010). Anovel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode. Elsevier. Pp 1097-1106.

Pearson W. (2005). Phylogenies of Glutathione transferase Families. Elsevier. Pp 186-204.

36.-Pumarola A., Rodriguez A., García J., Piedrola G. (1994). Microbiología y Parasitología Médica. Ediciones científicas y técnicas, S. A. 2da edición. Pp 866-868.

37.-Romero R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Editorial Panamericana. 4ta edición. Pp 858-863.

38.-Romo M., Pharm D., Carpio A., Kelvin E. (2014). Routine drug and food interactions during antihelminthic treatment of neurocysticercosis: A reason for the variable efficacy of albendazole and praziquantel? The Journal of clinical pharmacology. Pp 361-367.

39.-Rossjohn J., Feil S., Wilce M., Sexton J., Spithill T., Parker M. (1997). Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate : *Fasciola hepatica* Glutathione S-Transferase. Elsevier. 857-872.

40.-Schantz P. (1996). Tapeworm (Cestodiasis). Parasite diseases of the liver and intestines. Pp 637-651.

41.-Scheel C., Khan A., García H., Gonzalez A., Gilman R., Tsang V. (2005). Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-KD proteins: Comparison of assay formats. Trop. Med Hyg. Pp 771-776.

42.-Sheehan D., Meade G., Foley V., and Dowd C. (2001). Review article structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Society. Pp.1-16.

43.-Sinhg G y Prabhakar S. (2002). *Taenia solium* Cysticercosis from basic to clinical science. CABI Publishing is a division of CAB International. Pp 1-5.

44.-Torres A., Landa A. (2008). Transferases from parasites: A biochemical view. Elsevier. Pp 99-112.

45.-Vaca F., Parra R., Landa A. (2009) Characterization of one typical 2Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. Parasitol. Pp. 781-787.

46.-Vibanco N., Jiménez, L., Mendoza G., Landa A. (2002). Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. Parasitol. 398-404.

47.-Wilce M., Parker M. (1994). Review Structure and function of glutathione S-transferases. Biochimica et Biophysica. Pp. 1-18

48.-Wu Z., Hu X., Wu D., Xu J., Chen S., Wu Z., Yu X. (2007). Clonorchis sinensis : molecular cloning and fuctional expression of a novel cytosolic glutathione transferase. Parasitol. Pp 227-232.

BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA

1.- Recursos en Parasitología - Departamento de Microbiología:

<https://medicinaunal.wordpress.com/2015/05/28/parasitologia-de-la-teniasis-cisticercosis-y-equinococosis/>, 20-04-2016, 5:30 pm.

2.- Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de epidemiología. Sistema único de información. Secretaría de salud. N°5, vol.32.

www.epidemiologia.salud.gob.mx 29-04-2016, 7:00 pm.

3.- GenBank: AAL23713.1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAL23713.1> 16-05-16, 12:00 pm

4.- GenBank: GAA33791.2

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/GAA33791.2> 16-05-16, 12:00 pm

5.- GenBank NC_010450.3:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_010450.3?report=genbank&from=134662192&to=134692377 07-04-2016, 3 :04 pm.

GenBank: XP_003357127.1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/335294075>, 07-04-2016 3 :04 pm

6.- GenBank:NC_000004.12

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000004.12?report=genbank&from=94298556&to=94342876&strand=true, 07-04-2016, 3 :04 pm

GenBank: NP_055300.1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/7657457>, 07-04-2016, 3 :04 pm