

79  
zej



Universidad Nacional Autónoma  
de México

Facultad de Ciencias

CLONACION Y SECUENCIACION DEL GEN QUE CODIFICA PARA  
LA ENZIMA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *Taenia Solium*

# T E S I S

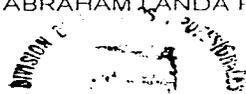
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A.

LUCIA JIMENEZ GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA



MÉXICO, D.F. 1997  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Clonación y secuenciación del gen que codifica para la  
triosa fosfato isomerasa de *Taenia solium*".

realizado por : Jiménez García Lucía

con número de cuenta 8723153-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario  
Propietario  
Propietario  
Suplente  
Suplente

Dr. Abraham Landa Piedra

Dr. Armando Gómez Ruyou

Dr. Guillermo Salgado Maldonado

M.C. Gabriela García Pérez

M.C. Rosaura Mayen Estrada

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

COORDINADOR GENERAL  
DE BIOLOGÍA

*Armando Gómez Ruyou*

*Guillermo Salgado Maldonado*

*Gabriela García Pérez*

*withness: Dr. José H. ...*

## PRESENTACIÓN

Nunca tomes el estudio como un deber, sino como la envidiable oportunidad de aprender a conocer la influencia liberadora que ejerce la belleza en el reino del espíritu, para tu alegría personal y beneficio de la comunidad a la que pertenecerá tu trabajo futuro.

**A. Einstein, 1933.**

**"Clonación y Secuenciación del gen que codifica para la enzima Triosa Fosfato Isomerasa en el metacéstodo de *Taenia solium*".**

Tesis realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM por la pasante en Biología Lucía Jiménez García, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. Esta tesis fue apoyada por DGAPA PAPIIT: IN 201795 y por el Programa de Apoyo para tesis de Licenciatura, de FUNDACION, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres y hermanos el apoyo que me han dado durante toda mi trayectoria académica, así como por su dedicación y ayuda en mi proceso de aprendizaje.

Agradezco a mi maestro y amigo Dr. Abraham Landa por la asesoría y dirección de esta tesis, así como por el apoyo y estímulos brindados para mi superación académica y personal.

Agradezco al personal académico del Depto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de esta tesis.

Agradezco también el apoyo y la asesoría brindada por el Dr. Armando Gómez-Poyou (Depto de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM) y el Dr. Alejandro Fernández (Depto de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM).

## INDICE GENERAL

<b>PRESENTACIÓN</b>	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	ii
<b>INDICE GENERAL</b>	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS</b>	iv
<b>RESUMEN</b>	v
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. UBICACIÓN TAXONÓMICA	1
2. CICLO DE VIDA	1
3. MORFOLOGÍA DEL METACESTODO	4
4. IMPORTANCIA	6
5. EPIDEMIOLOGÍA	6
6. PATOLOGÍA	7
7. DIAGNÓSTICO	9
8. TRATAMIENTO	10
9. PROTECCIÓN	11
10. PREVENCIÓN	12
<b>II. ANTECEDENTES</b>	14
<b>III. OBJETIVO</b>	18
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
1. MATERIALES	19
a) Reactivos	
b) Materiales biológicos	
c) Síntesis de oligonucleótidos	
2. MÉTODOS	19
a) Obtención de cDNA a partir de RNA Poli A+ del metacéstodo de <i>T. solium</i>	
b) Amplificación de DNA, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
c) Marcaje radiactivo de sondas de DNA	
d) Titulación de la biblioteca de cDNA	
e) Tamizaje y aislamiento de clonas positivas	
f) Preparación de DNA de las clonas de TPI	
g) Reacciones de digestión con endonucleasas	
h) Reacciones de ligación	
i) Clonación en M13	
j) Reacción de secuencia	
k) Análisis tipo Southern blot	

<b>V. RESULTADOS</b>	24
1. OBTENCIÓN DE LA SONDA	24
2. TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA CONSTRUIDA EN $\lambda$ GT10.	24
3. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL FRAGMENTO DE cDNA	26
4. SECUENCIA DE LA <i>Taenia solium</i> TPI (TTPI)	26
5. HOMOLOGÍA DE LA TTPI CON OTRAS TPIS.	26
6. ANÁLISIS TIPO SOUTHERN BLOT	26
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	33
<b>VII. APÉNDICES</b>	35
<b>VIII. LITERATURA CONSULTADA</b>	40

## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

ATP	Adenosin-trifosfato
C1	Carbono 1
C2	Carbono 2
Cm	Centímetros
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
D-GAPD	D-gliceraldehido 3-fosfato
ADN	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
FCE	Fluido cerebroespinal
GST	Glutathion S-Transferasa
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
M	Molar
Mabs	Anticuerpos monoclonales
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NCC	Neurocisticercosis
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
pmol	Picomolas
RM	Resonancia Magnética
ARN	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SM	Amortiguador para almacenar bacteriófagos
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Solución de citratos-salina
TAE	Amortiguador de tris-acetato de sodio
TC	Tomografía computarizada
TE	Amortiguador de tris-EDTA
ta	Temperatura ambiente
TP1	Triosa fosfato isomerasa
U	Unidades
µg	Microgramos
µCi	Microcuries
µj	Microjules
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
Xg	Número de veces la fuerza gravitacional

## RESUMEN

La meta del presente trabajo es la de contribuir a la caracterización a nivel molecular de las enzimas involucradas en la glicólisis de *T. solium*. Para lo cual se intentó el aislamiento de clonas de cADN que codificaran para la Triosa fosfato isomerasa. Esta enzima se encuentra en todos los organismos y esta involucrada en la conversión de la dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehido-3-fosfato en la glicólisis. La estrategia fue utilizar sondas de ADN diseñadas a partir de secuencias de aminoácidos conservadas en otras TPI's. A partir de estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos que fueron utilizados en PCR para obtener un fragmento de DNA de la TPI de *T. solium*, utilizando cADN como templado. Con este fragmento se tamizaron bibliotecas de cADN de metacéctodo de *T. solium* construidas en  $\lambda$ gt10. Esto permitió el aislamiento de cinco clonas, cuatro de las cuales contienen la secuencia codificadora completa de la TPI. Estas clonas contienen un inserto de  $\approx 1.1$  kb, el cual presenta un marco abierto de lectura de 757 pb. La secuencia de aminoácidos deducida corresponde a una proteína de 27,1678 Da. El análisis del Southern blot sugiere que este gene existe en *T. solium* como copia única y que el gene contiene intrones. Asimismo, los análisis computacionales de la secuencia nucleotídica y de aminoácidos muestran que tiene una similitud típica con otras TPI's. Esta clona abre la posibilidad de estudiar en detalle las enzimas involucradas en la glicólisis de *T. solium*.

## I. INTRODUCCIÓN

El establecimiento de las formas larvales de los *ténidos* en los tejidos de sus hospederos intermediarios, da lugar a la enfermedad conocida como cisticercosis, la cual se adquiere al ingerir los huevecillos que producen las formas adultas. De esta parasitosis, una de las más importantes desde el punto de vista de salud pública y económico es la provocada por el metacéstodo de *Taenia solium* (Damonte, 1983).

El hospedero intermediario de *T. solium* es comúnmente el cerdo, pero se tienen reportes de cisticercos encontrados en perros y en otros animales, incluyendo al hombre (Mazzotti y col., 1965). En humanos se han reportado cisticercos localizados en tejido subcutáneo, músculo esquelético, corazón, retina y cerebro. Es en este último donde constituyen la entidad clínica más importante por la severidad de las manifestaciones que provoca (Davis y col., 1991). Por otro lado, aunque esta enfermedad está asociada a las clases sociales más bajas, ningún grupo está exento de padecerla, pues existen condiciones propicias en el ambiente físico, biológico y social que facilitan la transmisión.

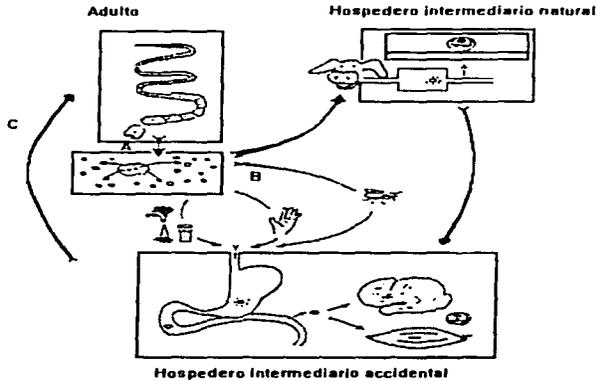
### 1.-UBICACIÓN TAXONÓMICA (Zaman, 1979).

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Subreino</b>	Metazoa
<b>Phylum</b>	Platyhelminthes
<b>Clase</b>	Cestoda
<b>Orden</b>	Cyclophyllidea
<b>Superfamilia</b>	Taenoidea
<b>Familia</b>	Taeniidae
<b>Género</b>	<i>Taenia</i>
<b>Especie</b>	<i>T. solium</i>
<b>Etapas larvarias:</b>	Metacéstodo ó cisticerco.

Sinónimos: *Taenia cucurbitina* (Palas, 1976); *T. pellucida* (Goeze, 1782); *T. vulgaris* (Werner 1782); *T. armata humana* (Brera, 1808).

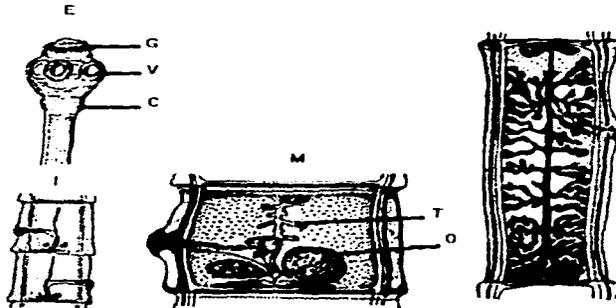
### 2.-CICLO DE VIDA

En el ciclo de vida del parásito (**Fig. 1**), el humano es el hospedero definitivo, pero puede actuar como un hospedero intermediario al infectarse con el metacéstodo. El ciclo inicia cuando el humano ingiere carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos, las enzimas proteolíticas y sales biliares del sistema digestivo activan al parásito; éste se exquisita y se adhiere a la pared del intestino delgado en donde aproximadamente en dos semanas se desarrolla en un gusano adulto hermafrodita, cuyo cuerpo se divide en tres regiones:



**Fig 1.** Ciclo de vida de *T. solium*. El ciclo comienza cuando el parásito adulto alojado en el intestino delgado del hospedero definitivo (humano), expulsa sus huevos al ambiente (A). Estos huevos al ser ingeridos por los hospederos intermedios (cerdo o humano), liberan a la oncosfera que se desarrolla en un metacéstodo (B). Cuando el humano ingiere carne de cerdo infectada, el metacéstodo se desarrolla en adulto (C). (Michel, 1992).

- a) El escólex de aproximadamente un mm de diámetro con cuatro ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos.
- b) El cuello que es corto y sin segmentaciones.
- c) El estróbiló que consta de proglótidos fusionados. Los proglótidos cercanos al cuello son jóvenes e indiferenciados, los de en medio son maduros, cortos y contienen los órganos reproductores (testículos constituidos por 150 a 200 folículos distribuidos a través del plano dorsal, así como un ovario con dos lóbulos grandes y simétricos más un lóbulo accesorio en lado del poro genital). Al final se encuentran los proglótidos grávidos con aproximadamente 50,000 huevos cada uno (**Fig 2A**). Estos proglótidos se desprenden de la tenia y son expulsados al ambiente a través de la materia fecal donde se descomponen y liberan a los huevos que contaminan el suelo, el agua y los alimentos. Los huevos son esféricos y miden de 30 a 45  $\mu\text{m}$  de diámetro; su cuerpo está constituido por una envoltura externa de tipo celular denominada vitelo, un embrióforo estriado (compuesto de bloques proteicos unidos por una proteína cementante) y una membrana hialina de origen embrionario denominada membrana oncosferal que envuelve al embrión hexacanto (llamado así por poseer tres pares de ganchos), también conocido como oncosfera (**fig 2B**). Cabe mencionar que los huevos de *T. solium*, no pueden distinguirse de los de *T. saginata* (Faust y col., 1981; Whithe y col., 1992).



**Fig 2A.** Estadio adulto de *Taenia solium*. El gusano consta de tres partes: el escólex (E) con un rostelo armado con una doble corona de ganchos (G) y cuatro ventosas (V). El cuello corto sin segmentaciones (C) y el estróbiló compuesto de proglótidos. Los proglótidos cercanos al cuello son inmaduros (I) (organos reproductores en desarrollo), los de en medio son maduros (M) y contienen los testículos (T) y un ovario trilobulado (O). Al final se encuentran los proglótidos grávidos repletos de huevos (H).



**Fig 2B.** Huevo de *Taenia solium*. Micrografía electrónica de barrido que muestra el embrión (E), la oncosfera (O) y los ganchos oncosferales (G). (Laclette y cols. 1982).

Cuando cerdos o humanos ingieren los huevos, los jugos gástricos y biliares degradan el embrión activando a la oncosfera, la cual penetra la mucosa intestinal para ser transportada a diversos órganos a través del torrente sanguíneo. En 60 a 70 días la oncosfera se transforma en una vesícula con un nódulo que contiene un escólex invaginado también llamado protoescólex, esta vesícula comúnmente llamada cisticerco corresponde al estadio larval o de metacéstodo de *T. solium* (**Fig 2C**) (Davis y col., 1991).

### 3.-MORFOLOGÍA DEL METACESTODO

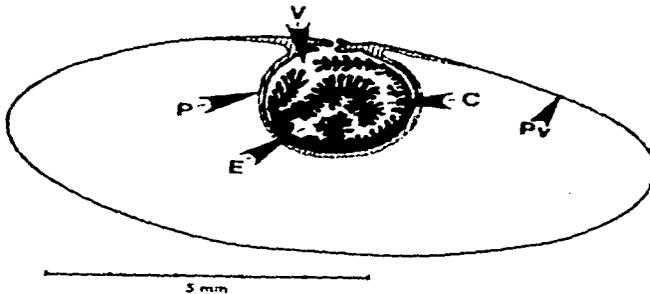
Un cisticerco es una vesícula ovalada de aproximadamente 0.5 a dos cm de diámetro, cuya pared es semitransparente excepto en el área donde se encuentra el escólex. Esta vesícula se encuentra llena de un fluido claro denominado fluido vesicular. La pared vesicular mide de 100 a 200  $\mu\text{m}$  y consta de tres capas:

1.- Un tegumento externo o cutícula de aproximadamente tres  $\mu\text{m}$  de grosor que presenta estructuras digitiformes llamadas microtricas y una zona vacuolar compuesta por vesículas de diferentes tamaños.

2.- Una capa celular intermedia con una estructura pseudoepitelial compuesta de una red de células musculares de tipo liso, células subtegumentales y de fibras mesenquimales la que se denomina membrana basal que delimita al tegumento.

3.- Una capa reticular o fibrilar interna, compuesta de una red de células que forman canales y cuerpos calcáreos.

El área parenquimatosa contiene un canal espiral en cuya parte final se encuentra el escólex invaginado. Este escólex posee cuatro ventosas y un roseto con una doble corona de ganchos birrefringentes. Opuesto al escólex se encuentra un pequeño poro excretor que conecta al exterior (Davis y col., 1991; Withe y col., 1992).



**Fig 2C.** Estadio de metacéstodo. El metacéstodo consta de una pared vesicular (PV) que contiene al fluido vesicular (FV). En un polo de la pared se encuentra una área parenquimatosa compuesta por un canal espiral (CE) en cuya parte final se aloja el escólex invaginado (E). (Landa, 1992).

#### 4.-IMPORTANCIA

La cisticercosis tanto humana como porcina, constituye un serio problema de salud pública y de economía principalmente en las ciudades donde esta enfermedad es endémica.

Con respecto a la cisticercosis humana en América latina se ha estimado que de cada 100,000 habitantes, 100 de ellos se encuentran parasitados (Schenone y col., 1982). Además, cuando los cisticercos se localizan en el Sistema Nervioso Central, entidad clínica llamada Neurocisticercosis (NCC) se pueden presentar patologías que varían en intensidad y gravedad dependiendo del número de parásitos y de su localización. Existen reportes de que la neurocisticercosis representa tanto en México como en Perú el 10% de las admisiones a hospitales por problemas neurológicos (Schenone y col., 1973). Asimismo, se estima que en México el rango de infección puede llegar hasta el 3% de la población en general (Larralde y col., 1992). Por otro lado, cerca del 75% de los pacientes con NCC, están en edad productiva y en la mayoría de los casos se ven incapacitados para trabajar debido a las manifestaciones clínicas que presentan. También cabe mencionar que los gastos que se requieren para la atención de los pacientes los cuales comprenden hospitalización, pruebas radiológicas, tratamiento, cirugía, etc., son sumamente elevados, así tenemos que tan solo en 1986 hubo gastos de 14.5 millones de dólares en atención a pacientes con NCC (Flisser, 1988).

La cisticercosis porcina representa una considerable pérdida económica, ya que los cerdos infectados tienen que ser decomisados por las autoridades de salud. Así vemos que tan solo en 1980, hubo pérdidas de más de 43 millones de dólares por decomisos, representando más del 50% de la inversión en la crianza de cerdos. A esto hay que agregar que no todos los cerdos infectados están sujetos a inspección o bien que en algunas ciudades operan rastros clandestinos lo que constituye una importante fuente para la adquisición de la enfermedad conocida como teniasis, provocada por el estadio adulto de *T. solium*, que por ser virtualmente asintomática en la mayoría de los casos pasa desapercibida, incluso en las revisiones médicas rutinarias de los pacientes (Acevedo, 1989).

#### 5.-EPIDEMIOLOGÍA

Dentro del cuadro epidemiológico de la enfermedad uno de los factores determinantes que facilitan la transmisión en grandes poblaciones es la insalubridad del ambiente y falta de higiene personal. De hecho, se han propuesto tres mecanismos para la transmisión de la parasitosis y dos de ellos involucran estos factores:

- a) Heteroinfección, cuando los huevecillos llegan al organismo por consumo de agua o alimentos contaminados.
- b) Autoinfección externa vía anal-oral de pacientes infectados con el adulto.
- c) Autoinfección interna, en la que los huevos son llevados hacia el duodeno o el estómago por retroperistaltismo, donde eclosionan y migran hacia los tejidos

del hospedero. Este mecanismo, aun no ha sido demostrado y no hay registros que sugieran infecciones por esta vía (Faust y col., 1981).

La cisticercosis humana y porcina ha sido considerada por diversos investigadores como el más frecuente problema patológico en México, por lo que la cisticercosis es una enfermedad de notificación obligatoria desde 1979 y los Servicios Coordinados en los Estados deben informar a la Dirección General de Epidemiología, incorporándose también los casos citados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (Damonte, 1983). Además, en 1984 se estableció el Programa Prioritario para el Control y Erradicación, de la teniasis-cisticercosis causada por *T. solium* (Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, 1984). Asimismo, diversos estudios aportan cifras que informan de la alta prevalencia de la enfermedad en la población por ejemplo, se ha considerado que el dos al 3% de casos de autopsias practicadas en el Hospital General de México entre 1953 y 1984 presentaron cisticercosis (Villagrán-Urbe, 1989) y la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) de 1987-1988 que se llevó a cabo con 66,754 sueros de la población mexicana, mostró niveles de prevalencia global del 1.2% con diferencias significativas según los estados, siendo los niveles más altos en la región centro-occidental y el sureste (**Fig 3**), (Larralde y col., 1992). También es notable el gran incremento de casos encontrados a partir de la introducción de la tomografía computarizada (TC), la imagen por resonancia magnética (RM) y el diagnóstico inmunológico. Sin embargo, hay que considerar que las prevalencias referidas por los casos revisados en hospitales la mayoría de las veces no son representativos de la población por lo que es muy probable que la frecuencia sea mayor a la estimada estadísticamente. Esta situación resulta semejante en los países donde la enfermedad es endémica (Botero, 1993).

Las principales zonas de endemia en el mundo son: (Michel y col., 1992).

**Africa:** Camerún, Senegal, Rwanda, Zaire, Ile de la Reunion y Madagascar.

**América:** México, Brasil, Argentina y Chile.

**Europa:** Polonia, Rusia, Hungría, Checoslovaquia, España y Portugal.

**Asia:** China e India

## 6.-PATOLOGÍA

La patología depende en gran medida del número, tamaño, viabilidad y sobre todo, localización de los cisticercos. Así tenemos que cisticercos localizados en músculo esquelético usualmente son asintomáticos pero en ciertas ocasiones pueden causar pseudohipertrofia muscular. Los cisticercos localizados en la retina causan una reacción inflamatoria que disminuye la capacidad visual e incluso puede derivar en ceguera. Dependiendo de la localización en el corazón, se pueden presentar arritmias o anomalías en la conducción sanguínea (Botero, y col., 1993). Finalmente, para la NCC se han propuesto diversas clasificaciones. Por ejemplo, tomando en cuenta la localización de los cisticercos se clasifica en parenquimal y extraparenquimal. A su vez estas se subdividen en

Intraventricular, subaracnoidea y espinal (Nava, 1983). Otra clasificación se encuentra basada en los síntomas considerando si los cisticercos están vivos (NCC activa) o muertos (NCC inactiva), (Sotelo y col., 1985). En esta clasificación la forma activa considera a los cisticercos aislados o múltiples, la localización en el Sistema Nervioso Central es variada pero resulta más común en el espacio subaracnoideo causando aracnoditis y en la mitad de los casos hidrocefalia obstructiva. Las meninges inflamadas no permiten la absorción del líquido cefalorraquídeo, causando hipertensión endocraneana. Otras veces, pueden encontrarse intraventricularmente causando hidrocefalia y ependimitis. Los cisticercos espinales causan compresión del cordón espinal.

Por otro lado, se estima que más del 50% de los casos de NCC ocurren en la forma inactiva, los cisticercos generalmente se encuentran calcificados e histológicamente están asociados a inflamación granulomatosa y se puede observar hidrocefalia como resultado de la fibrosis meningeal que sigue a la respuesta inflamatoria causada por la muerte del cisticerco. Es común encontrar estos dos tipos de NCC coexistiendo en un paciente y cuando ambas se encuentran localizadas en el parénquima el síntoma más común es la epilepsia. (Botero, 1993).



**Fig 3.** Mapa de la prevalencia de cisticercosis en México. Las zonas delimitadas en claro (Morelos, Chiapas, Hidalgo, Edo de México, Yucatán, Michoacán, Quintana Roo, Aguascalientes, Durango, Puebla y Colima), presentan un nivel de prevalencia de 1.0 a 1.9%; mientras que las zonas delimitadas en oscuro (Nayarit, Jalisco, Guanajuato, Zacatecas, Distrito Federal y Guerrero), presentan un nivel del 2.0 al 3.0% de prevalencia en cisticercosis. La prevalencia global es del 1.2% (Larralde y cols, 1992).

## 7.-DIAGNÓSTICO

En lo que se refiere al diagnóstico la confirmación definitiva de la infección sólo se realiza disectando al parásito del órgano afectado por medio de cirugía. Sin embargo, en los últimos años se ha contado con un gran avance en métodos diagnósticos entre los que se incluyen la TC y la RM, ambos con una alta resolución y sensibilidad, pero sin ser 100% específicos. Por ejemplo, cisticercos localizados en la base del cerebro, pueden aparecer como simple hidrocefalia o deformación de la cisterna basal o bien los cisticercos cuando se presentan en forma de granulomas pueden ser indistinguibles de otras formas granulomatosas como en caso de la tuberculosis (García y col., 1994). Además, cuando se localizan en meninges el resultado de la TC puede aparecer como un simple edema cerebral difuso, condición que se puede atribuir a traumatismos anteriores, hipertermia o embolia (Creasy y col., 1994). Cisticercos ventriculares pueden ser isodensos con el líquido cefalorraquídeo (LCR) por lo que no pueden ser discernidos por ninguno de estos métodos. Por otro lado, la TC no detecta a las oncosferas que se encuentran en etapa de desarrollo. Aunado a esto tales métodos de diagnóstico son de alto costo, por lo que para la mayoría de los pacientes de los países más afectados resultan inaccesibles (Davis y col 1991; Botero y col., 1993).

Es por esto que contar con métodos que detecten antígenos o anticuerpos circulantes en LCR o suero sanguíneo resultarían útiles para establecer un diagnóstico, tanto en casos sintomáticos como en los asintomáticos. (Contreras y col., 1990). El diagnóstico de la cisticercosis por métodos inmunológicos se basa en la presencia de anticuerpos, principalmente la detección de IgG e IgM presentes en el suero o líquido cefalorraquídeo que reaccionan uniéndose a las moléculas del parásito. Entre los métodos diagnósticos más usados hoy en día se encuentra el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (Laralde y col., 1986; Chang y col, 1988; Flisser y col., 1990; Cho y col., 1992; Morakote 1992; Lee y col., 1993; Yong y col., 1993), y la Inmunolectrotransferencia IET (Grogl y col., 1985; Gottstein y col., 1986; Tsang y col., 1989; Laralde y col., 1989; Wilson y col., 1991; Xu y col., 1992). Estas técnicas varían en sensibilidad y especificidad de acuerdo al antígeno empleado. Se han empleado extractos crudos de cisticercos completos (Rosas y col., 1986), homogeneizados de membranas o de escólex (Feldman, 1990), fracciones glicoproteicas obtenidas a partir de extractos crudos por cromatografías de afinidad con lectinas (Tsang, 1989), o bien fluido vesicular (Laralde y col 1986), con resultados favorables.

Sin embargo, debido a la compleja composición proteica es fácil tener reacciones cruzadas con antígenos presentes en otros organismos relacionados, por lo que algunos investigadores han realizado estudios con el fin de identificar antígenos específicos de *T. solium* que eliminen las reacciones cruzadas en las pruebas diagnósticas. Uno de los trabajos más completos al respecto fue la identificación de siete glicoproteínas que se encuentran entre 10 y 50 kDa y están presentes en una fracción obtenida por cromatografía de afinidad utilizando la lectina de lenteja. Estas glicoproteínas tienen una especificidad del 100% y una sensibilidad del 96% (Tsang y col., 1989). Asimismo, otros autores han identificado diversos antígenos en el fluido vesicular (Laralde 1986, 1988, 1994; Kong y col., 1989,1992; Cho y col., 1986). También se han identificado tres

antígenos altamente reactivos con sueros de pacientes con pesos moleculares de 64, 53 y 32-30 kDa (Grogil y col., 1985). Asimismo, se han aislado algunos antígenos con el fin de aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad, tal es el caso de 2 polipéptidos de 26 y 8 kDa que han mostrado ser 100% específicos (Gottstein y col., 1986), y se tienen algunos otros componentes purificados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de pesos moleculares por arriba de 100 kDa que aun no se han ensayado en pruebas de reactividad cruzada (Choromanski y col., 1990). Cabe mencionar que también se han utilizado antígenos heterólogos provenientes de otros céstodos para detectar este tipo de parasitosis; por ejemplo, el caso de un antígeno denominado ThFAS de *T. crassiceps* que es utilizado para diagnosticar cisticercosis bovina (Zarlenga y col., 1994). También, recientemente se han producido anticuerpos monoclonales (MAbs) en contra de determinantes antigénicos del metacéstodo de *Taenia solium* que han aumentado la sensibilidad del diagnóstico empleándose con técnicas como el ELISA y la IET (Chang-Yuan y col., 1992). También estos MAbs han sido utilizados para purificar antígenos que han sido utilizados en ensayos diagnósticos mostrando un 100% de sensibilidad (Nascimento y col., 1987). Cabe mencionar que estos últimos antígenos no se han probado en ensayos de reacción cruzada con otros helmintos.

A partir de una biblioteca de cADN de *Echinococcus multilocularis* se obtuvo un antígeno recombinante que mostró tener 100% de especificidad a este parásito, pero con baja sensibilidad (alrededor de 37%) (McManus y col., 1991). Por otro lado, otros autores han identificado secuencias de ADN específicas que han sido utilizadas para diferenciar entre especies y su utilidad en diagnóstico está siendo evaluada; por ejemplo, se ha logrado obtener secuencias de ADN que pueden identificar o diferenciar a *T. solium* de *T. saginata* y viceversa, lo que resulta particularmente importante sobre todo en la identificación de huevos y del adulto de *T. solium* (Rishi y McManus, 1987; Harrison y col., 1990).

Finalmente cabe mencionar que varios autores realizan estudios para identificar y aislar antígenos estadio-específicos útiles para el diagnóstico de teniasis y cisticercosis por ejemplo: se han identificados dos antígenos de 135 y 45 kDa específicos del estadio adulto de *T. solium*, que son frecuentemente reconocidos por antisueros de hamsters infectados experimentalmente con este parásito (Monroy y col., 1992).

## 8.-TRATAMIENTO

Una vez diagnósticada la parasitosis se cuenta con drogas que en algunos casos son capaces de destruir a los parásitos. En los casos donde la localización es tal que no se presentan manifestaciones patológicas en general no se recomienda la terapia y ésta es más adecuada para los casos de NCC con sintomatología. El tratamiento de la NCC varía de acuerdo al estadio de la enfermedad, el número y la localización de los cisticercos. Comúnmente se utiliza albendazol o praziquantel cuando los cisticercos son viables y se localizan en el parénquima. La dosis común de albendazol es de 15mg/kg/día en dosis divididas y la terapia dura entre 14 a 28 días. El praziquantel fue la primera droga que se encontró que resultaba útil en el tratamiento de la cisticercosis; actúa

incrementando la permeabilidad de la membrana celular del parásito al calcio lo que resulta en una contracción muscular, parálisis y muerte eventual. La dosis recomendada es de 50 mg/kg/día durante 15 días. Generalmente se recomienda la administración de corticosteroides días antes de iniciar el tratamiento para disminuir los efectos secundarios de la droga que corresponden generalmente a exacerbación de la sintomatología clínica. Los medicamentos antes mencionados son caros y presentan reacciones secundarias, además algunos helmintos como *Schistosoma sp* han comenzado a adquirir resistencia al praziquantel. Por otro lado, algunos estudios muestran que aunque este medicamento disminuye el número de parásitos no destruye a todos y los que permanecen muestran el mismo grado de viabilidad antes y después del tratamiento. Es por esto que hoy en día se están desarrollando nuevos fármacos que resulten más accesibles y se administren en dosis única. Este es el caso del Oxfendazol que ha mostrado ser 100% efectivo en una dosis de 50 mg/kg administrada a cerdos infectados con cisticercos. Cabe mencionar que con este fármaco no se observaron efectos secundarios visibles en los cerdos tratados. (González y col., 1996).

En algunas ocasiones, se recomienda la cirugía sobre todo en casos en donde hay poca respuesta a la droga por ejemplo, en algunos cisticercos intraventriculares que pueden obstruir el flujo del líquido cefalorraquídeo o bien en casos de cisticercos espinales. En el caso de cisticercosis inactiva los pacientes no responden al tratamiento con praziquantel y generalmente son tratados con anticonvulsivos (Cal y col., 1983; Davis y col., 1991; Botero y col., 1993).

## 9.-PROTECCIÓN

En materia de protección se están realizando esfuerzos importantes con respecto a la cisticercosis causada por *T. solium*. Se ha observado que es posible conferir protección (inmunidad concomitante) por diversos procedimientos, ya sea por una infección previa o por inmunización con extractos parasitarios (Gallie y Sewell, 1972, 1974, 1976, 1981; Lloyd y Soulsby 1976; Rickard y Brumley, 1981). Esta inmunidad es característica en las infecciones causadas por helmintos y en particular en céstodos. Por lo que se tienen buenas perspectivas en cuanto a inducir inmunidad. Se han utilizado desde extractos crudos hasta antígenos nativos y recombinantes de los diferentes estadios biológicos en contra de las infecciones causadas por estos parásitos. Por ejemplo, se ha obtenido inmunidad en contra de la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* utilizando un extracto completo de cisticerco de *T. solium*, lo que ha llevado a establecer un modelo de protección murino gracias a la elevada reacción cruzada entre los antígenos de ambos parásitos (Sciutto y col., 1990). A su vez, se ha tratado de inducir inmunidad a cisticercosis en cerdos inyectando extractos crudos de cisticercos completo, así como extractos de escólex. Los resultados mostraron que es posible conferir protección hasta en un 75% (Molinari y col., 1983; Nascimento y col., 1995). Cabe mencionar que existen antígenos estadio específico (oncosfera, metacéstodo, adulto), pero los oncosferales han sido hasta la fecha los mejores candidatos para conferir

protección en contra de las cisticercosis (Rickard y col., 1971; Rickard y col., 1977; Rajasekariah y col., 1980; Osborn y col., 1981; Lightowlers y col., 1984).

Sin embargo, existe un importante obstáculo en el desarrollo de vacunas con antígenos nativos y es el de la incapacidad de producir suficiente antígeno lo cual impide la estandarización de métodos tales como la dosis del antígeno, trabajar con un tamaño de muestra significativa, etc. No obstante la introducción de las técnicas de ADN recombinante en el área de parasitología ha resuelto esta limitante y hoy en día se han producido vacunas recombinantes a partir de la clonación de genes que codifican para moléculas capaces de inducir protección en contra de infecciones causadas por el *Schistosoma mansoni*, *T. ovis* y algunos otros helmintos. Ejemplos de esto son los casos de la producción de Glutathion-S-Tranferasa (GST), y Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) recombinantes las cuales han resultado ser inductores de protección en contra de infecciones causadas por *S. mansoni*, y *S. japonicum* (Smith y col., 1986; Balloul y col., 1987; Boulanger y col., 1991; Shoemaker y col., 1992). Además se ha logrado expresar un antígeno recombinante preparado a partir de oncosferas de *T. ovis* que ha mostrado conferir un 94% de protección en ovejas (Smith y Johnson, 1988). También existe el reporte de una proteína recombinante correspondiente a una proteína citoplásmica que une ácidos grasos, presente en *S. japonicum*; ésto resulta interesante debido a que los schistosomas no pueden sintetizar grandes cadenas de ácidos grasos pero los pueden obtener de los hospederos, por lo que esta proteína podría ser un buen candidato para vacunación (Becker y col., 1994). Por otra parte, se ha encontrado correlación entre altos títulos de anticuerpos hacia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y resistencia a la reinfección en la esquistosomiasis causada por *S. japonicum* (Waine y col., 1993). Asimismo, se está estudiando la posibilidad de emplear los componentes derivados de *T. solium* que han mostrado capacidad para la inducción de inmunidad, para la eventual producción de vacunas recombinantes eficientes y que puedan ser empleadas en población humana (Johnson y col., 1989; Hawn y col., 1993; Pancre y col., 1994). Como ejemplos al respecto, se cuenta con la paramiosina de *T. solium* (Landa y col, 1993), la cual ha sido utilizada en el modelo murino-*T. crassiceps* con buenos resultados (Laclette comunicación personal), y se están utilizando otras proteínas recombinantes obtenidas a partir de *T. crassiceps* (proteínas de fusión) para conferir inmunidad en cerdos y ratones en contra de la cisticercosis causada por *T. solium* y *T. crassiceps*, respectivamente (Manoutcharian y col., 1996).

## 10.-PREVENCIÓN

Debido a la falta de higiene y medidas sanitarias que imperan en muchas zonas de las ciudades afectadas por la enfermedad, la aplicación de medidas preventivas ha resultado ser una tarea difícil. En algunos países se ha elegido por tanto la ruta del tratamiento en contra de la teniasis por ejemplo, en Ecuador más de 10,000 personas fueron tratadas con cinco mg/kg en una dosis de praziquantel, disminuyendo la prevalencia de teniasis y por consiguiente la de cisticercosis tanto en cerdos como en humanos (Botero y col., 1993). En algunos países socialistas se erradicó al adulto por medio de control masivo con niclosamina (Comite de expertos de la OMS, 1970).

Algunas medidas recomendadas para evitar la infección por *T. solium* son:

a) Campañas educativas a nivel nacional que informen a las personas de los riesgos que implica consumir productos infectados con huevos o metacéstodos del parásito y que den a conocer las medidas profilácticas y terapéuticas que se deben tener para la eliminación del mismo.

b) Establecimiento de leyes sanitarias rígidas con respecto a la eliminación de excretas humanas, así como dotar a la población sobre todo en las zonas endémicas de los sistemas de evacuación necesarios para el cumplimiento de tales leyes (letrinas, drenaje, etc.).

c) Inspección rigurosa de los cerdos en los mataderos para evitar introducir carne infectada al mercado.

d) Campañas para erradicar al parásito por medio de cestocidas dirigidas principalmente a personas de los focos endémicos y que trabajen con el ganado porcino o tengan historial de consumir carne de cerdo mal cocida con el fin de erradicar al adulto.

e) Evitar regar frutas y verduras con aguas negras que pueden estar contaminadas con huevos.

f) Se recomienda cocer la carne a más de 56°C o bien congelarla a -20°C durante 12 horas o a -10°C por cinco días para destruir el metacéstodo. El cerdo salado, salteado o en escabeche no garantiza la eliminación del parásito.

g) Campañas epidemiológicas para conocer la prevalencia real a nivel nacional antes y después de efectuadas las medidas preventivas.

h) Investigaciones en las áreas de diagnóstico, control, prevención y saneamiento ambiental necesarios para la erradicación de la teniasis-cisticercosis.

## II. ANTECEDENTES.

La Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) es una enzima que participa en la ruta metabólica de la glicólisis. La glicólisis es una fuente de ATP que se produce cuando una molécula de glucosa se divide en dos moléculas de piruvato en una serie de 10 reacciones, cada una catalizada por una enzima diferente que tienen lugar en el citosol. Sin embargo, en algunos parásitos como los tripanosomas algunas reacciones de la glicólisis también se llevan a cabo en un organelo llamado glicosoma, donde se localizan las primeras siete enzimas de la glicólisis, incluyendo la TPI. (Kohl y cols., 1994). La glucosa es ampliamente utilizada como combustible en las células, además a partir del piruvato se pueden derivar importantes cantidades de energía libre durante la oxidación posterior en la respiración aeróbica. El papel de la TPI consiste en isomerizar la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la cual es uno de los productos generados a partir de la escisión de la fructosa 1,6-difosfato y que no se metaboliza directamente por glicólisis en su isómero D-gliceraldehído 3-fosfato (D-GAP). La triosa fosfato isomerasa, cataliza la transferencia del hidrógeno pro-R del C1 de DHAP al C2 de D-GAP. Si bien los compuestos DHAP y D-GAP existen en solución como una mezcla de especies hidratadas y libres, la TPI sólo utiliza las formas libres como sustrato. El mecanismo de reacción ha sido muy estudiado por diferentes técnicas tales como mutagénesis dirigida y cristalografía (Wierenga y cols., 1992).

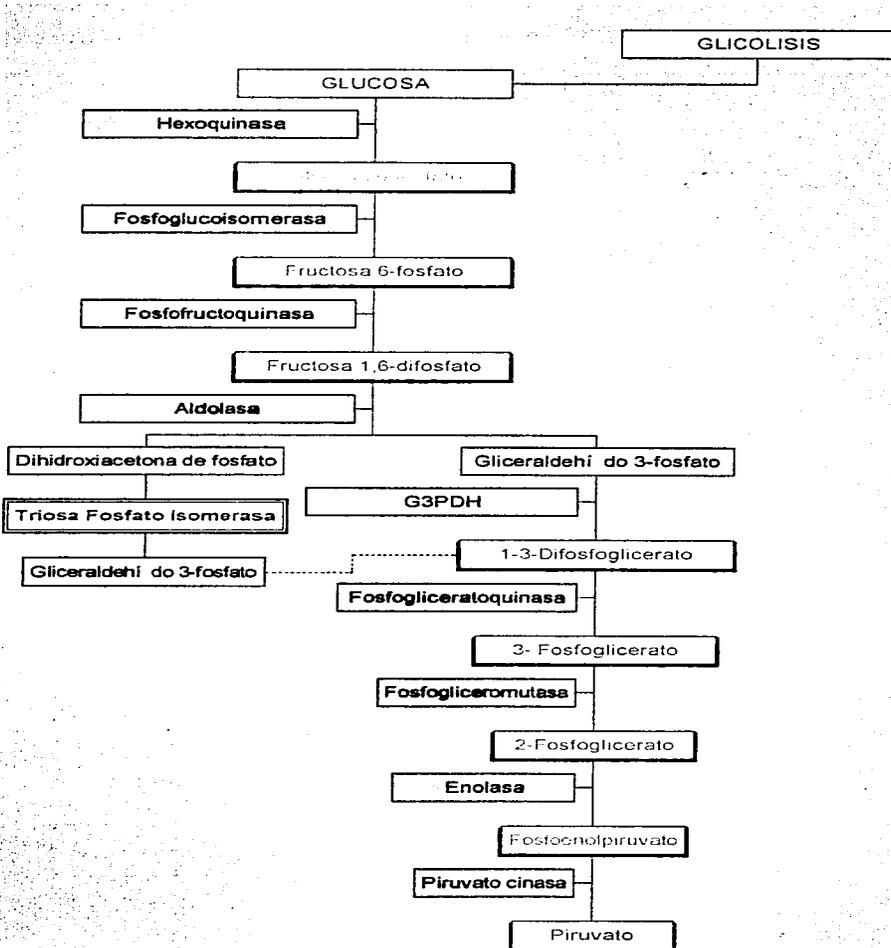
La oxidación de la glucosa a piruvato puede dividirse en dos etapas, una donde la molécula de glucosa es fosforilada, a expensas de dos moléculas de ATP. Este compuesto fosforilado se divide en dos subunidades fosforiladas de tres carbonos que se procesan para producir piruvato con una ganancia neta de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa procesada, aunque se forman cuatro moléculas de ATP solo dos son utilizadas en los procesos de fosforilación de la glucosa y de la fructosa 6-fosfato.

El destino del piruvato varía con la capacidad enzimática de la especie y la cantidad de oxígeno molecular. Los productos finales de las reacciones anaeróbicas son el lactato o el alcohol etílico, pero en presencia de oxígeno molecular el piruvato es descarboxilado y se forma la Acetil- coenzima A (Avers, 1991).

La reacción neta de la transformación de glucosa en piruvato es:



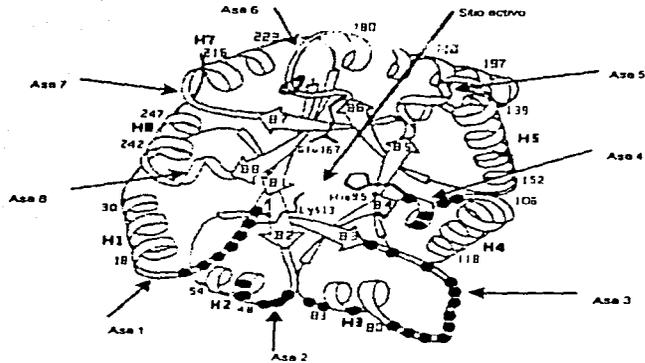
En general esta vía metabólica puede resumirse como sigue:



La TPI ha sido ampliamente caracterizada en diversos organismos en cuanto a su estructura y composición de aminoácidos. Se trata de una enzima dimerica cuyas subunidades pesan aproximadamente 27 kDa y presenta una conformación de ocho subunidades en forma de barril Alfa/Beta, (fig. 4). Esta enzima no utiliza cofactores o iones metálicos y los dos sitios activos de cada subunidad parecen ser cinéticamente independientes. Sin embargo, la actividad catalítica depende de la asociación de las subunidades ya que los dímeros son altamente catalíticos mientras que los monómeros separados no presentan actividad. Esto se ha demostrado por medio de ensayos de renaturalización y de mutagénesis, pero se ha logrado producir una TPI monomérica estable al cambiar 15 residuos del asa tres por otros ocho basándose en múltiples modelos computacionales (Borchert y col., 1994).

Asimismo, se ha determinado que al menos el 22% de los aminoácidos son invariables en las TPIs de los organismos reportados y que la mayoría de estos aminoácidos conservados se encuentran en la región que participa en mantener la estructura del sitio activo. Además, estudios de tipo químico llevan a la conclusión de que al parecer la base principal de la reacción concierne al aminoácido ácido glutámico 165, por lo que probablemente este sea un residuo esencial en el sitio activo para la enzima. Ya que se sugiere que provee la base responsable para la extracción del protón pro-R del DHAP y la inserción del mismo en el carbono dos en la formación de D-GAP (Alber y col., 1981). También existen estudios acerca del papel que juega la TPI en cuanto al desarrollo de los organismos. Al respecto se ha observado que la deficiencia de TPI en organismos heterocigotos con un alelo no funcional (menos de un 50% de lo normal) provoca serias complicaciones en el desarrollo las cuales finalmente derivan en la muerte (Maquat y cols., 1985). Además su deficiencia parece estar implicada en enfermedades autoinmunes en humanos, relacionándose como posible causa de hemólisis por anticuerpos anti-TPI (Ritter, y col 1990, 1994; Hollan y col, 1993).

Por otro lado, en tripanosomiasis y leishmaniasis se ha mostrado que esta enzima cuenta con importantes diferencias en el área inter-subunidades por lo que esta región ha sido considerada como un candidato para la acción de inhibidores selectivos que pueden ser usados para diseñar drogas en contra de estos parásitos (Wierenga y cols., 1991; Hol y col., 1992). En cuanto a estudios de protección utilizando la TPI en contra de enfermedades parasitarias tenemos que la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales (M.1 anti-TPI), así como la inmunización con TPI recombinante inducen un grado de protección entre el 41-49% en contra de la infección causada por el tremátodo *S. mansoni* en ratones. Asimismo, se ha demostrado que la enzima participa en la respuesta inmune de tipo Th1 en la esquistosomiasis (Harn, y col., 1992, Shoemaker, y col., 1992; Reynolds y col., 1993).



**Fig.4.** Esquema de la estructura secundaria de una subunidad de la enzima TPI de Tripanosoma. Las hélices alfa y beta de las 8 unidades ( $\alpha\beta$ ), se muestran con letras B1-B8, H1-H8 y las asas como 1-8. Al centro de la molécula se muestra el sitio activo, así como las posiciones de los residuos catalíticos (L-13, H-95 y G-167). Los 32 puntos oscuros indican residuos colocados en la interfase de la molécula (Eeiereng y col, 1992).

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo pretende contribuir a la caracterización molecular de las enzimas involucradas en la glicólisis de *T. solium*. Por lo que se decidió clonar, y secuenciar el cDNA que codifica para la enzima Triosa Fosfato Isomerasa.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.- MATERIALES

##### a) Reactivos.

Las endonucleasas de restricción, la ARNasa, la ADNasa I, la transcriptasa reversa, así como otras enzimas utilizadas fueron obtenidas comercialmente de las compañías New England Biolabs y Gibco BRL. El vector M13 fue obtenido de New England Biolabs. Los estuches para la realización de la secuencia (Taquence DNA Sequencing) y de marcaje (Random primer DNA Labeling) fueron obtenidos de United States Biochemical Corp y de Amersham Co., respectivamente. El estuche para la amplificación de ADN (PCR) fue de la casa BIOTECSA. La albúmina sérica bovina fracción V, el ADN de esperma de Salmón tipo III fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El ficoll tipo 400 y la polivinilpirrolidona de Pharmacia Inc. Las membranas de nitrocelulosa (NC) de Millipore Corp. Los isotopos  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP y  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP de Amersham Co. El resto de los reactivos fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

##### b) Materiales Biológicos.

Se utilizó una biblioteca de cADN del metacésto de *T. solium* construida en el vector  $\lambda$ gt10. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron la **C<sub>600</sub>hfl<sup>r</sup>** (SupE44, thi<sup>r</sup>, leuB6, lacY1, tonA21, L-(r<sub>n</sub>,m<sub>n</sub>+)mcrA-, hfl-) y la **TG1** (SupE, hsd 5, thi, -(lac-proAB), F'[traD36, proAB-, lacI<sup>r</sup>, lacZ-M15]).

##### c) Síntesis de oligonucleótidos.

Las secuencias **5' KFFVGGNWK** y **3' GIAWVPEYA** fueron utilizadas para diseñar los oligonucleótidos TrepA 5' (AAA-TTT-TTT-GTT-GGG-GGG-AA(CT)-TGG-AA) y TrepB 5' (CCA-ATA-GCC-CAA-ACT-GG(CT)-TC(AG)-TA), respectivamente. Los oligonucleótidos fueron preparados en un sintetizador de ADN (Biosearch modelo 8750 de Pharmacia Inc.). Los sitios para las endonucleasas de restricción Sal I y Sac I fueron incluidos en los oligonucleótidos TrepA y TrepB, respectivamente.

#### 2.- METODOS

##### a) Obtención de cADN a partir de RNA Poli A\* del metacésto de *T. solium*.

Brevemente, 0.5  $\mu$ g de ARN Poli A\* fueron convertidos a cADN por medio de la enzima Transcriptasa reversa (200 unidades). La reacción se llevó a cabo en 20  $\mu$ l de amortiguador para transcriptasa reversa (incluido en el estuche). Este cADN se utilizó para la reacción de PCR.

##### b) Amplificación de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Los oligonucleótidos específicos TrepA y TrepB fueron utilizados para amplificar el fragmento de 450 pb de la TPI de *T. solium*. La reacción se llevó a cabo en 100  $\mu$ l, conteniendo 10  $\mu$ l de la reacción de cADN, 100 pmol de cada oligonucleótido, amortiguador de PCR (apéndice 1 y 3B) y 2.5 U de Taq polimerasa. Las condiciones utilizadas fueron: un ciclo a 95°C, 3 min; 50°C, 2 min; 72°C, 3 min; 29 ciclos a 95°C, 1 min; 50°C, 2 min; 72°C, 3 min, un paso de extensión a 72°C, 10 min y uno de 4°C por 12 h (Sambrook y col., 1989).

### c) Marcaje de sondas radiactivas de ADN.

El fragmento obtenido de la reacción de PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1% en Tris-acetato (TAE 1X) y fue purificado por el método de Vogelstein y Gillespie, 1979 "perlas de vidrio". El marcaje del fragmento se llevó a cabo utilizando el método de Random Primer. Alrededor de 25 ng del fragmento purificado fue diluido hasta 20  $\mu$ l con agua y desnaturalizado a 95°C durante 10 minutos. El fragmento fue enfriado en hielo y sobre éste se le adicionó el amortiguador de marcaje incluido en el estuche, conteniendo 1 mM de los deoxinucleótidos (A, G, T), 50  $\mu$ Ci del radioisótopo  $\alpha$ <sup>32</sup>P-dCTP, oligonucleótidos al azar (random primers) y 1 Unidad de la enzima Klenow e incubado a 30°C por 30 minutos.

La sonda marcada fue separada del radioisótopo no incorporado, pasándola a través de una columna de Sefarosa-4B con un volumen de cama de 10 ml y eluida con amortiguador de TE. Fracciones de 0.5 ml fueron colectadas y usualmente la sonda se obtiene en las fracciones 2 y 3.

### d) Titulación de la biblioteca de cADN:

Una colonia de la bacteria huésped *C<sub>600</sub> hfl<sup>-</sup>* fue inoculada en 50 ml de medio SOB (apéndice 1), e incubada a 37°C toda la noche. Las bacterias fueron centrifugadas 10 min a 600 Xg y resuspendidas en MgSO<sub>4</sub> 10 mM a una concentración de DO<sub>600</sub> = 0.5. 200  $\mu$ l de las bacterias fueron infectadas con 10  $\mu$ l de las siguientes diluciones de fagos en SM: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, 3 ml de medio top-agar fundido a una temperatura de 48°C fueron mezclados con las bacterias infectadas y sembradas en cajas de petri conteniendo medio SOB e incubadas a 37°C toda la noche (Huynh y cols., 1985; Sambrook y cols., 1989). La eficiencia y el título de la biblioteca se determinó contando el número de placas líticas y refiriéndolo como fagos/ml de solución.

### e) Tamizaje y aislamiento de clones positivas

Alrededor de 45,000 fagos de la biblioteca de cADN preparada del metacéstodo de *T. solium*, fueron sembrados en medio SOB sólido en tres cajas petri. La infección se llevó a cabo como ya se describió anteriormente.

Las cajas sembradas fueron incubadas a 37°C hasta que se observaron placas de lisis (aproximadamente ocho horas), entonces fueron cubiertas con membranas de nitrocelulosa por 5 minutos y orientadas con tinta china. A cada caja se le hizo un duplicado colocando otra membrana encima, durante 10 minutos después de quitar la primera. El ADN del fago adherido a las membranas fue desnaturalizado con una solución de NaOH 0.5M, NaCl 1.5M durante cinco minutos y neutralizado con una solución de Tris-HCl 1M y NaCl 1.5M, pH 8 por cinco minutos. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y el ADN en la membrana fue fijado con luz ultravioleta en un UV Spectrolinker (Spectronics Corp.), con las siguientes condiciones 1,200 seg x 100  $\mu$ j x cm<sup>2</sup>.

Las membranas fueron prehibridadas a 50°C por 3-6 horas con agitación en una solución conteniendo: amortiguador de citratos-salina SSC 6X, Denhart's 5X, SDS 0.5% y 100 $\mu$ g/ml de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado a 100°C/5 min (apéndice 1). Transcurrido ese tiempo se cambió la solución por otra similar pero sin el ADN de salmón, se añadió la sonda marcada y las membranas fueron incubadas a 50°C toda la noche. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con una solución de SSC 2X y SDS 0.1% a

50°C durante 10 minutos. También se realizó un lavado final de 55°C por 10 minutos, las membranas se secaron a temperatura ambiente y fueron expuestas sobre películas de rayos X durante 24 horas.

Las clonas positivas del primer tamizaje fueron aisladas del agar y resuspendidas en un ml de medio SM. Posteriormente, se realizó un segundo tamizaje en donde se sembraron 500-1000 fagos de cada una de las clonas positivas, bajo las mismas condiciones que el primario. Finalmente, las clonas que mantuvieron su positividad fueron aisladas en un tercer tamizaje en el que se sembraron aproximadamente 100 fagos de cada una de las clonas. Nuevamente las clonas positivas fueron aisladas y puestas en un ml de SM.

#### **f) Preparación de ADN de clonas de TPI.**

Se infectaron 200  $\mu$ l de bacterias crecidas toda la noche con cada uno de los fagos positivos. Para esta infección se utilizaron  $5 \times 10^6$  fagos y se realizó como ya se mencionó anteriormente. Las células fueron sembradas en SOB-agarosa sólido hasta la lisis total y los fagos fueron recuperados adicionando cinco ml de medio SM en agitación lenta durante una hora. El SM con los fagos fue recuperado de la caja y a esta suspensión se le llamó plate stock. Para la obtención del ADN del fago, 700  $\mu$ l de la suspensión fueron tratados con un volumen igual de polietilenglicol (PEG) al 20% e incubados a 4°C durante una hora. La suspensión fue centrifugada a 10,000 Xg a ta durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ l de SM y fue incubado con dos  $\mu$ l de RNasa A (1 mg/ml) y dos  $\mu$ l de ADNsa-I (100  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos a 37°C. Al término de esta reacción fueron adicionados dos  $\mu$ l de SDS al 10% y dos  $\mu$ l de EDTA 0.5M, pH 8.0 e incubada durante 15 min a 68°C. La mezcla anterior fue extraída con un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1), dos veces con volumen igual de cloroformo y precipitado con isopropanol frío (1:1). La mezcla fue centrifugada a 10,000 Xg durante 10 minutos a 4°C y el precipitado lavado con 100  $\mu$ l de etanol frío al 70%. Finalmente el precipitado fue secado y resuspendido en 30  $\mu$ l de TE.

El fragmento de cADN de cada una de las clonas de interés fue obtenido por medio de la PCR utilizando oligonucleótidos específicos que flanquean las regiones alrededor del sitio EcoRI del vector  $\lambda$ gt10. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando como templado 100 ng del ADN extraído y 100 pm de cada oligonucleótido. Para este PCR se emplearon las condiciones siguientes: un ciclo de 1.30 min a 94°C; 30 ciclos de 15 seg a 94°C; 25 seg a 55°C, 30 seg a 72°C. un paso de extensión de 3 min a 72°C y un paso de 12 hrs a 4°C. Los fragmentos fueron analizados en un gel de agarosa al 1%.

#### **g) Reacciones de digestión con endonucleasas.**

Todas las reacciones de digestión fueron realizadas a 37°C durante 3 horas en un volumen de 100  $\mu$ l y se emplearon los amortiguadores recomendados por la casa comercial para cada enzima. Las reacciones fueron concentradas por precipitación con 1/10 del volumen de reacción de acetato de sodio 3M, pH 5.3, 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y congeladas a -70°C durante 30 min. El precipitado fue obtenido por centrifugación a 10,000 Xg durante 10 min y secado. El precipitado fue resuspendido en amortiguador de carga y corrido en geles de agarosa. Las bandas de ADN fueron recuperadas del gel y purificadas por la

técnica "perlas de vidrio" de Vogelstein y Gillespie, 1979. El ADN fue eluido de las perlas de vidrio durante 30 minutos a 37°C con amortiguador TE.

#### **h) Reacciones de ligación.**

10 ng del ADN del vector y 100 ng del inserto fueron ligados por medio de la enzima T4 ADN ligasa. Esta reacción se llevó a cabo incubando el vector junto con el inserto, amortiguador de ligasa (comercial) y una unidad de la enzima. La reacción total (20 µl) fue incubada a 16°C durante 14 horas y terminada incubando la mezcla de ligación a 65°C durante 10 min.

#### **i) Clonación en M13**

Las ligaciones (7 µl) fueron transformadas con 200 µl de células TG1 competentes y plaqueadas en medio SOB sólido en presencia de IPTG y β-Gal (Apéndice 3D). Las transformaciones fueron incubadas durante toda la noche a 37°C y las placas con fenotipo Lac- (blancas) fueron aisladas para la preparación de su templado.

La preparación de templado consistió en colocar una placa blanca en medio líquido SOB (cinco ml) conteniendo 50 µl de TG1 de un cultivo de toda la noche e incubarlo durante ocho horas. Luego tres ml de cada cultivo fueron centrifugados a 10,000 Xg durante un minuto y el precipitado bacteriano desechado. Al sobrenadante obtenido se le adicionaron 600 µl de una solución de polietilenglicol al 20% y NaCl al 2.5%, se agitó en vortex y se dejó incubando durante 30 min a ta. Al término se centrifugó a 10,000 Xg durante 10 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 100 µl de TE y fue extraído con fenol/cloroformo y precipitado como ya se describió anteriormente. Finalmente, el precipitado obtenido de la centrifugación a 4°C fue secado y resuspendido en 25 µl de TE. El tamaño y la concentración del templado fueron determinados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El inserto dentro de los templados fue identificado por medio de la PCR empleando oligonucleótidos para la región que flanquea los sitios de clonación del vector M13.

#### **j) Reacción de secuencia**

La reacción se llevo a cabo utilizando tres µl (0.5 µg) del templado, dos µl del amortiguador de reacción, un µl del iniciador y siete µl de agua. Esta mezcla fue incubada por dos min a 70°C, enfriada a 30°C y mantenida en hielo. Entonces se le adicionaron dos µl del Labeling mix, 0.5 µl del α-dATP-<sup>35</sup>S y dos µl de la enzima Taq Polimerasa, diluida 1:8 en su amortiguador de dilución. Todo fue mezclado e incubado a 45°C durante cinco min. Al término, cuatro µl de la mezcla fueron adicionados a cuatro tubos eppendorf conteniendo cuatro µl de un dideoxinucleótido específico (ddA, ddC, ddG, ddT) e incubados por cinco min a 70°C. Finalmente, la reacción fue terminada adicionando cuatro µl del amortiguador de término, el cual lleva los colorantes azul de bromofenol y cianol xileno como marcadores de corrida.

Las reacciones fueron corridas en geles de acrilamida al 6% de cuatro mm de espesor (apéndice 3F), tres µl de las muestras fueron cargados. Se tomaron de referencia los colorantes del amortiguador de término, definiendo que un azul en el frente del gel equivalía a una corrida corta y que un verde en el frente del

gel equivala a una corrida larga. Los geles fueron fijados en ácido acético al 10% durante 20 minutos, secados a 70°C durante una hora y expuestos sobre placas de rayos-X durante 12 horas. Las secuencias de ácidos nucleicos fueron analizadas por medio de programas computacionales (Predict 7 y PCGENE de Intelligent Inc).

#### **k) Southern blot**

Aproximadamente 10 µg de ADN genómico fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción (EcoRI, Hind III, Xho I y Bam HI). Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1%. El fragmento de 450 pb de la TPI de *T. solium* amplificado con los oligonucleótidos TreptA y TreptB y el marcador de peso molecular (λH3) fueron utilizados como marcadores de tamaño. Al término de la corrida el gel fue desnaturalizado y neutralizado por una hora cada vez, utilizando las mismas soluciones empleadas para los tamizajes. El ADN contenido en el gel fue transferido a una membrana de Nitrocelulosa por difusión durante 24 horas en amortiguador SSC 5X. La membrana fue lavada con una solución de SSC 5X durante 5 Min a tem. Amb. y el ADN fijado a la membrana con luz UV, siguiendo las mismas condiciones usadas para el tamizaje. Finalmente, la membrana fue prehibridada e hibridada como ya se describió anteriormente.

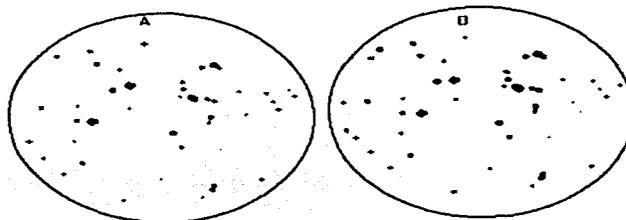
#### IV. RESULTADOS

##### 1.- OBTENCIÓN DE LA SONDA.

Un fragmento de 450pb fue amplificado a partir de un cADN del metacéstodo de *Taenia solium*, empleando como iniciadores los oligonucleótidos diseñados TreptA y el TreptB por PCR. Este fragmento fue clonado en M13 y secuenciado. Esto nos permitió confirmar que el fragmento amplificado presentaba gran homología con las TPI ya reportadas. Este fragmento fue purificado y utilizado para tamizar las bibliotecas de ADN del metacéstodo de *T. solium*.

##### 2.- TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA CONTRUÍDA EN $\lambda$ GT10.

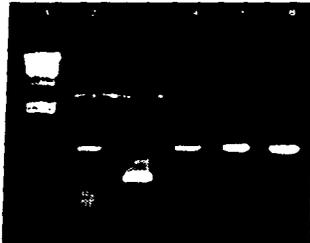
La biblioteca empleada para el tamizaje fue construída con la población total de fragmentos de cADN y denominada biblioteca de cADN. La sonda de 450pb fue marcada con  $\alpha^{32}$ P-dCTP y utilizada para el tamizaje. De los 45,000 fagos tamizados se obtuvieron cinco clonas positivas (**Fig. 5**).



**Fig. 5.** Autorradiografía del tamizaje terciario de la clona 1.1 (1.1 kb) obtenida de la biblioteca de cADN del metacéstodo de *T. solium*. La placa positiva utilizada se señala con flechas en la imagen autoradiográfica de la membrana original (A), así como del duplicado (B).

El tamaño de los insertos de las clonas fue obtenido por digestiones realizadas con la endonucleasa de restricción EcoRI, debido a que este sitio estaba en los adaptadores que se utilizaron en la construcción de la biblioteca de cADN. También se extrajo el ADN de las cinco clonas obtenidas. Este ADN fue utilizado como templado en PCR para amplificar y verificar el tamaño del inserto.

Los insertos obtenidos de cuatro clonas presentaron tamaños de aproximadamente 1.1 kb y una clona presentó un inserto de 0.7 kb (Fig. 6).



**Fig. 6.** Amplificación por PCR de los insertos de las clonas positivas. La imagen muestra un gel de agarosa al 1% con los fragmentos de PCR obtenidos del ADN de las clonas positivas. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular del fago  $\lambda$  digerido con la endonucleasa Hind III, 2) Clona 1.1, 3) Clona 2.1, 4) Clona 2.3, 5) Clona 3.1, 6) Clona 3.2

### 3.- MAPA DE RESTRICCIÓN DEL FRAGMENTO DE cADN.

A los fragmentos de 1.1 Kb se les realizó digestiones sencillas y dobles utilizando las enzimas de restricción Alu I, BamHI, EcoRI, Hae III, HindIII, Sal I, Sau III, Pst I, XhoI, XbaI. Solamente las endonucleasas de restricción que se mencionan cortaron los fragmentos de 1.1 kb: Alu I (2 veces), EcoRI (1 vez), Hae III (una vez) Sau III (3 veces), Bam HI (una vez) y Kpn I (una vez). El mapa de restricción (Fig. 7) se elaboró a partir de estos datos. Estos cortes fueron confirmados por el análisis de la secuencia del fragmento y los datos se utilizaron para subclonar el fragmento en el vector M13 para su secuenciación. Finalmente, se escogieron dos de las clonas con tamaño de 1.1 kb, debido a que todas presentaban el mismo mapa de restricción. Además de que probablemente contenía la secuencia codificadora completa de la TPI.

### 4.- SECUENCIA DE LA *Taenia solium* TPI (TTPI).

El análisis computacional de la secuencia nucleotídica de la clona de 1.1 kb (Fig. 8), mostró la presencia de un marco abierto de lectura que comienza en el codón ATG en la posición marcada como 1 y que continúa hasta la posición 251, donde se encuentra el codón de terminación TAA. La estructura primaria de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica indicó que la proteína consiste de 250 aminoácidos con un peso molecular 27,167 y un punto isoelectrónico de 6.66. Cabe mencionar que las posiciones subrayadas sobre la secuencia corresponden a las regiones que se utilizaron para diseñar los oligonucleótidos empleados para amplificar la sonda de 450 pb. Asimismo, se observó que los residuos de aminoácidos que conforman la región del sitio activo 165-AYEPVWAIGTG-175

(región que cubre a el sustrato característico de las TPi's) se mantiene conservado. Además, otros aminoácidos que participan en el sitio activo se mantienen sin cambio (Asn 10, Lys 14, His 94 y Glu 167).

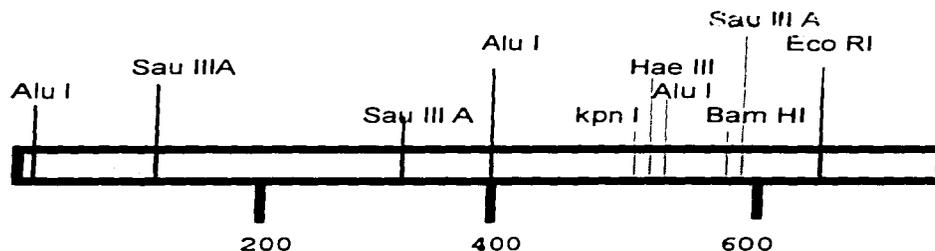
Por otro lado, se muestran algunos análisis computacionales de la secuencia de aminoácidos deducida (**Fig 9**). Estos análisis sugieren que alrededor del 54% de la proteína se estructura en  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada. Además, no se encontró una secuencia líder para secreción (Cármenes y cols., 1989) y se vió que no existe ningún dominio claramente hidrofóbico (según el método de Kyte & Doolittle, 1982), característicos de proteínas de membrana. En contraste la secuencia deducida posee bastantes dominios hidrofílicos a lo largo de toda la molécula (según el método de Janin, 1978 y de Emimi, 1985). Otro tipo de análisis de la secuencia deducida es la presencia de un posible sitio de glicosilación del tipo N en el residuo 14 (Garnier y cols., 1978). Finalmente, cabe mencionar que el fragmento total de cADN de 1.1 kb tiene una composición de bases de: A = 26.2%; T = 25.6%; G = 25.3% y C = 22.9%.

#### 5.- HOMOLOGIA DE LA TTPI CON OTRAS TPi's.

La secuencia obtenida de aminoácidos traducida de la secuencia nucleotídica de TTPI fue comparada con las secuencias de TPi de otros organismos reportados tales como humano, *Schistosoma mansoni*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zea mays*, *Leishmania mexicana* y *Escherichia coli* (Maquat y cols., 1985, Shoemaker y cols., 1992, Alber y cols., 1982, Furth y cols., 1974, Kohl y cols., 1993, Pichersky y cols., 1984) (**Fig 10**). La alineación muestra que la TTPI tiene una homología de un 73.6% con la TPi de humano, 58.4% con *S. mansoni*, un 57.2% con *S. cerevisiae*, un 73.6% con el maíz, un 45.4% con *L. mexicana* y un 54.4% con *E. Coli*. Cabe mencionar que esta proteína cumple con el modelo estructural que adoptan del barril alfa/beta, típico de estas enzimas.

#### 6.- ANALISIS TIPO SOUTHERN BLOT.

La **Fig 11**, muestra los resultados del análisis tipo Southern, en esta figura se aprecia el reducido número de bandas obtenidas al digerir el ADN genómico con cada endonucleasa de restricción utilizada. Para el caso de la endonucleasa Bam HI, se aprecian dos bandas de aproximadamente ocho y 10 Kb. Para el caso de Xho I solo se aprecia una banda de aproximadamente de 18 Kb. Para EcoRI se observan cuatro bandas de aproximadamente cuatro, seis, nueve y 15 Kb. Finalmente en el carril correspondiente a Hind III se observan bandas de cuatro, siete y nueve Kb. Cabe mencionar que no existen sitios para las endonucleasas Xho I ni Hind III sobre la región codificadora de la TTPI de acuerdo a la secuencia que se presentó, por lo que la presencia de varias bandas en Hind III sugiere la presencia de intrones.



Alu I	(11, 402, 546)
Sau III A	(97, 321, 579)
Hae III	(510)
Eco RI	(620)
BamHI	(578)
Kpn I	(517)

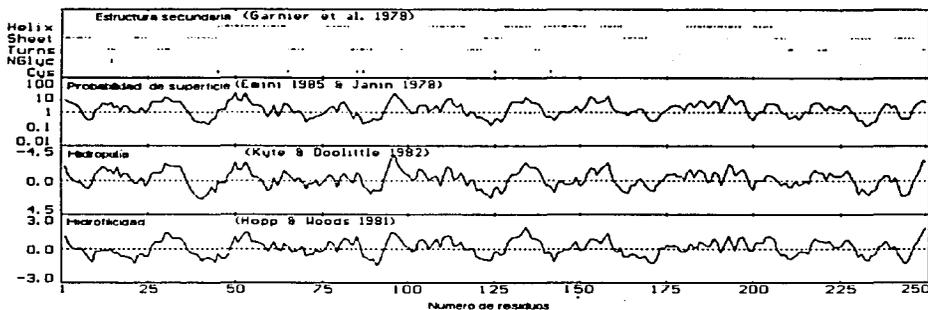
**Fig 7.** Mapa de restricción de las clonas de 1.1Kb. Las enzimas que cortan el fragmento se señalan en la figura y las posiciones de los cortes se señalan en el cuadro. Enzimas que no cortan son Hind III, Nhe I, Pst I, Xho I.

```

1  ATG ACG CGT AAG CTG TTT GTC GGT GGC AAC TGG AAG ATG AAT GGC
   M   T   R   K   L   F   V   G   G   N   W   K   M   N   G
46 AGT TAT AGC CAC ATC AAC ACT TTT TTT GAT ACC CTT CAA AAG GCT
   S   Y   S   H   I   N   T   F   F   D   T   L   Q   K   A
91 GAT ACA GAT CCC AAT GCC GAT ATC GTA ATT GGT GTT CCC GCT TGC
   D   T   D   P   N   A   D   I   V   I   G   V   P   A   C
136 TAC CTG AAG TAT GCT CAG GAT AAG GCT CCC AAA GGC ATT AAA ATT
   Y   L   K   Y   A   Q   D   K   A   P   K   G   L   K   I
181 GCT GCG GAA AAT TGT TAC AAA GTT GGC TCT GGT GCA TTC ACA GGT
   A   A   E   N   C   Y   K   V   G   S   G   A   F   T   G
226 GAA ATC AGT ACT GAA ATG ATA AAA GAC TGT GGA TGT GAA TGG GTC
   E   I   S   T   E   M   I   K   D   C   G   C   E   W   V
271 ATA CTT GGT CAC TCT GAG CGT CGC CAC ATT TTC GGC GAG TCT AAC
   I   L   G   H   S   E   R   R   H   I   F   G   E   S   N
316 GAG TTG ATC GGG GAG AAG GTA AAA CAT GCT CTT GAT TCC GGT CTT
   E   L   I   G   E   K   V   K   H   A   L   D   S   G   L
360 AAT GTC ATT CCT TGC ATT GGC GAA CTG CTC TCG GAA CGT GAA GCT
   N   V   I   P   C   I   G   E   L   L   S   E   R   E   A
406 GGT AAA ACC AAC GAC GTT TGC TTC GCT CAA ATG GAT GCC ATT GCC
   G   K   T   N   D   V   C   F   A   Q   M   D   A   I   A
451 AAA AAC GTT CCT TCA AAG GAA GCC TGG GAC AAA GTT GTC ATT GCT
   K   N   V   P   S   K   E   A   W   D   K   V   V   I   A
496 TAC GAG CCC GTT TGG GCC ATC GGT ACC GGC AAG ACC GCG ACG CCG
   Y   E   P   V   W   A   I   G   T   G   K   T   A   T   P
540 GCT CAA GCT CAA GAG GTT CAC AAG GTT GTT CGC GAC TGG ATC CGC
   A   Q   A   Q   E   V   H   K   V   V   R   D   W   I   R
585 AAG CAT GTG GAC GCC GGA ATT GCC GAC AAA GCC AGA ATT CTC TAC
   K   H   V   D   A   G   I   A   D   K   A   R   I   L   Y
631 GGT GGC TCT GTG ACG GCT TCC AAC GCC AAG GAC TTG GGT GCT CAA
   G   G   S   V   T   A   S   N   A   K   D   L   G   A   Q
676 CCT GAC GTG GAT GGA TTC CTT GTT GGT GGC GCC TCC TTG AAA CCC
   P   D   V   D   G   F   L   V   G   G   A   S   L   K   P
721 GAC TTC ATT ACC ATT ATA AAC GCA AGA AGA TAA
   D   F   I   T   I   I   N   A   R   R   -

```

**Fig. 8.** Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos de la región codificadora de las clonas de cDNA 1.1 Kb del metacétodo de *T. solium*. La secuencia presenta un marco abierto de lectura que comienza con el codón ATG que codifica para el aminoácido metionina (M) en la posición número uno y termina en el codón de término TAA en la posición número 754. Los aminoácidos empleados para diseñar los oligonucleótidos que sirvieron para amplificar la sonda de 450 pb se indican en letra negra.



**Fig. 9.** Análisis computacionales de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. La proteína presenta alrededor del 50% en estructura de  $\alpha$ -hélice y un 30% en  $\beta$ -plegada. También muestra una gran cantidad de dominios hidrofílicos y ningún dominio claramente hidrofóbico, así como la ausencia de una secuencia líder para secreción.

<b>Ts</b>	--MTRKLFVGGNWKMGNSYSHINTFFDTLQKADTD--PNADIVI GVPACYLKQAQDKAP-	55
<b>Hs</b>	-APS..F...N.K...RKKNLGELIS...G.KVP--ADTEV.CIG.TA..DF.RQ.LD-	56
<b>Zm</b>	-MG...F...N.KC...TTDQVEKIVK..HEGOVPPSDVVEV.VSP.YVF.PVVKSQLR-	57
<b>Ce</b>	-...F...N.K...DYASVDGIVTF.NASADN--SGV.V.VAP..P.A..KS.LK-	55
<b>Sm</b>	MSGG..F...N.K...RDDNDKLLKL.SE.HF.--D.TEVL.AP.GVF.HEIRKSLK-	57
<b>Sc</b>	-MAR..TF...NFKL...KOS.KEIVER.WT.SIP--E.VEV..CP.T.D.SVSLVKK	56
<b>Tb</b>	-MSKPOPIAAN.KC...QOSLELI.LFNSTSIH--HDVQC.VASTFVH.AMTKERLSH	57
<b>Ec</b>	---MRHPL.M.N.KL...RHMVHELVS.N.R.ELAG-VAGCAVA.AP.EM.IDM.KRE.EG	56
<b>Ts</b>	KGIKIAAENCYKVGSGAFTGEISTEMIKDCGCEWVILGHSERRHIFGESNELIGEKVKHA	115
<b>Hs</b>	QK.AAG.Q...TN...PG...AT...V...D...Q...A...	116
<b>Zm</b>	QEFHV..Q..W.KKG...V.A..LVNL.VP...H...ALL...FV.D..AY..	117
<b>Ce</b>	A.VLV..Q...PK...PA...L.L...H...V...DA..A..TV..	115
<b>Sm</b>	KE.HV..Q...SK...PA..R.I..D...H...N...D...A...Q...	117
<b>Sc</b>	PQVTVG.Q.A.LKA...N.VDQ...VGAK...H...SY.H.DDKF.AD.T.F.	116
<b>Tb</b>	PKFV..Q.AIAKS...V.LPIL.F.VN.IV..H...AYY..T..IVAD..AA.	116
<b>Ec</b>	SH.MLG.Q.VNLNL...T.AA.L..I.AOYI.I.H...TYHK..D...AK.FAVL	116
<b>Ts</b>	LDSGLNVPICIGELLSEREAGKTNDEVCFAQMDAIKKNVPSKEAWDKVVIAYEFPVWAIGTG	175
<b>Hs</b>	.NE..G..A...K.D...I.EK.V.E.TKV..DD.K---D.S...L.YEFPVWAIGTG	172
<b>Zm</b>	.SQ..K..A.V.T.EQ...S.M..VA..TK...EKIK---D.SN..V.YEFPVWAIGTG	172
<b>Ce</b>	.EA.IK.VF...K.E...H.K.N.R.LQ..YDKGV---ENI...YEFPVWAIGTG	172
<b>Sm</b>	.AE..S..A...T...SN..EE..VR.LK...NKIK.ADE.KR..V.YEFPVWAIGTG	175
<b>Sc</b>	.GQ.VG..L...T.E.KK...L..VER.LN.VLEE.K---D.TH..V.YEFPVWAIGTG	172
<b>Tb</b>	VA..FM..A...T.Q...S.R.AV.VLT.IA...KLLKA-D.A...YEFPVWAIGTG	174
<b>Ec</b>	KEQ..TPVL...TEA.N...EE..AR.I..VL.TQG-AA.FEGA...YEFPVWAIGTG	174
<b>Ts</b>	KTATPAQAQEVHKKVVRDWRIRKHVDAGIADKARILYGGSVTASNADLGAQPVDVDFLVGG	235
<b>Hs</b>	...Q..E...EKL.G.LKSN.SDAV.QOT..I...GATC.E.AS...I...	232
<b>Zm</b>	.V...ASL...LKTNASPEV.EST..I...A.C.E.A...I...	232
<b>Ce</b>	...SGE...EWI.AFLKEK.SPAV..AT..I...D..A.V.KK..I...	232
<b>Sm</b>	.V...Q...NFL.K.FKTHAPN.VDE.I..I...A.C.E.AQ.HD...	235
<b>Sc</b>	LA...ED..DI.ASI.KFLASKLGDKA.SEL...ANG...VTFKDKA...	232
<b>Tb</b>	.V...Q...A.ALI.S.VSSKIG.DVRGEL...NGK..RT.YQ.R..N...	234
<b>Ec</b>	.S...A...FI..H.A...N...EQVI.Q...N...AE.FY...I..A...	234
<b>Ts</b>	ASLKPDPFITIINARR-----	250
<b>Hs</b>	...E.VDL...KQ-----	247
<b>Zm</b>	...E..D...ATVKSA-----	251
<b>Ce</b>	...VK...Q-----	247
<b>Sm</b>	...E.TE.CK..SR-----	251
<b>Sc</b>	...E.VD...S.H-----	247
<b>Tb</b>	...E.VD..K.TQ-----	249
<b>Ec</b>	...ADAFAV.VKAAEAAKQA-----	255

**Fig 10.** Alineación de aminoácidos de la TTPI con otras TPI's reportadas. Abreviaturas: (Ts) *Taenia solium*, (Hs) *Homo sapiens*, (Sm) *Schistosoma mansoni*, (Ec) *Escherichia coli*, (Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, (Ce) *Caenorhabditis elegans*, (Zm) *Zea mays*, (Tb) *Trypanosoma brucei*. El símbolo (-) indica que no hay aminoácidos, y los puntos (.) indican que hay homología exacta entre los aminoácidos de *T. solium* y los de las otras especies. Los aminoácidos del dominio catalítico que cubre al sustrato, así como otros aminoácidos que participan en el sitio activo, se muestran en letras negritas.



**Fig. 11.** Análisis tipo Southern de muestras de 10  $\mu$ g de ADN genómico de *T. solium* digerido con diferentes endonucleasas de restricción: 1) Fragmento de 450 pb obtenido por PCR con los oligos TrepA y Trep B, 2) Bam HI, 3) Xho I, 4) Eco RI, 5) Hind III. La membrana de nitrocelulosa fue hibridada con el cADN completo que codifica para la TPI de *T. solium*.

## VI. DISCUSIÓN

La cisticercosis en humanos si bien no esta considerada como la enfermedad parasitaria más importante en México, tiene importantes repercusiones en el ámbito social-económico tanto en salud humana como en la porcicultura (Flisser, 1990). Se ha observado que los factores epidemiológicos de la enfermedad (crianza rudimentaria del hospedero intermediario, inadecuadas instalaciones sanitarias, fecalismo al aire libre y facilidad de transmisión de los desechos por medio de ventarrones, así como la falta de higiene personal), constituyen un serio riesgo de infección para la población general (Schantz y cols., 1993)

Además de esto los resultados de los tratamientos para la neurocisticercosis son a menudo insatisfactorios debido a que los daños provocados por los parásitos en el cerebro en ocasiones son permanentes y no en todas las manifestaciones clínicas las drogas resultan efectivas. Además, aunque se tienen implementadas campañas de prevención, las mismas resultan muy difíciles de llevar a cabo en los países en desarrollo que no cuentan con el suficiente subsidio económico para adquirir infraestructura y materiales adecuados para el tratamiento de aguas negras, así como para la crianza controlada del ganado porcino. Por otro lado, las campañas educativas requieren tiempo para que se establezcan en la población y más aún para que se observen resultados satisfactorios. Debido a lo antes mencionado resulta muy importante contar con métodos alternativos de protección que minimicen el riesgo de contraer la infección. Las investigaciones enfocadas a protección (vacunación) y al desarrollo de nuevas drogas se han intensificado y ahora se cuenta con diversos estudios en donde se han identificado importantes candidatos no solo en contra de la cisticercosis, sino en contra de otras parasitosis causadas por helmintos.

Uno de estos candidatos es la triosa fosfato isomerasa, la cual es una enzima de la glicólisis involucrada en la conversión de la dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato, lo que aporta un suplemento de energía en forma de dos moléculas de ATP. Por otra parte, esta enzima es importante en el desarrollo de los organismos ya que si falta se generan graves complicaciones neuromusculares que pueden derivar en la muerte (Maquat y cols., 1985). La TPI es una de la enzimas que catalíticamente es muy activa y muchos piensan que es el modelo ideal para los estudios estructurales, así como para actividades enzimáticas ya que su estructura está bien caracterizada. La TPI es un ejemplo típico de la conformación ( $\alpha/\beta$ ) común en muchas enzimas (Sun y cols., 1992). La TPI se encuentra en muy poca concentración en los organismos, por ejemplo en el caso de *Leishmania mexicana* se reporta que a partir de 10 litros de cultivo de promastigotes se obtiene alrededor de 200 ug de enzima con un 60% de pureza (Kohl y cols., 1994). Por tal motivo, ahora se emplean las técnicas de la biología molecular para obtener mayores cantidades de esta enzima recombinante y eliminar la limitante de la cantidad de material para experimentación. Además el conocer la secuencia nucleotídica y de aminoácidos resulta muy importante en este tipo de enzimas con alto grado de homología, ya que se pueden aprovechar las disimilitudes en el diseño y prueba de inhibidores selectivos o bien en estudios de divergencia evolutiva.

La estrategia utilizada en esta tesis fue la de diseñar sondas específicas aprovechando la similitud de las secuencias de aminoácidos de las TPI's descritas en otros organismos. Para esto, se eligieron dos regiones altamente conservadas de la secuencias de diferentes TPI's, a partir de las cuales se diseñaron oligonucleótidos que fueron utilizados para amplificar un fragmento de la enzima de *T. solium*. Este fragmento fue utilizado para tamizar una biblioteca de cADN del metacéstodo de cual se aislaron 5 clonas una de 0.7 kb y otras 4 clonas de aproximadamente 1.1 Kb cuyo patrón de restricción es semejante. Esto parece sugerir que estas clonas son derivadas de un mismo mARN, esta apreciación concuerda con algunos datos bibliográficos en donde se describe que esta enzima es codificada por un gen de copia única (Kohl y col., 1994).

La secuencia de nucleótidos realizada en dos clonas de cADN que contienen el fragmento de 1.1 kb, resultaron idénticas. El análisis de la secuencia nucleotídica presentó un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 27,167 Da. Asimismo, la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica presentó una homología que va del 50 al 70% con otras TPIs ya reportadas. Este resultado apoya la hipótesis de que las TPI's provienen de una enzima ancestral que ha divergido en las especies (Reis y col., 1993). Además, los resultados aportaron que los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de la enzima son idénticos a los de otras especies ya reportadas, tales como los aminoácidos K-13, H-95, la región YEPVWAIGTG que participan en la catalisis de la unión al grupo fosfato del sustrato y los aminoácidos D-15 y N-71 que son sitios de deamidación posiblemente involucrados en la formación del dímero (Maquat y col., 1985). Otros análisis computacionales mostraron que no hay claros dominios hidrofóbicos característicos de membranas pero sí bastantes dominios hidrofílicos a lo largo de toda la molécula, reforzando la idea que se trata de una enzima soluble. Por otro lado, esta enzima presenta la estructura secundaria clásica de barril con hélices alfa-beta ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> común de las TPI's y otras enzimas. También cabe mencionar que existe un posible sitio de glicosilación del tipo N en el residuo 14 (Garnier y col., 1978) y la presencia de seis cisteínas. Hasta la fecha no se sabe si estas cisteínas están involucradas en la interacción entre ambos dímeros. Otro dato importante fue que la TTPI presentó un punto isoeléctrico de 6.6, lo cual resulta importante para la purificación de este tipo de enzimas pues hay que resaltar que el punto isoeléctrico varía entre las especies. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, así como otras características generales tales como el tamaño de la proteína, la semejanza estructural, etc. concuerdan con otras TPI's ya descritas hasta el momento. Finalmente los análisis de hibridación con ADN genómico y ARN, apoyan la sugerencia de que solo hay un gen codificante para esta enzima en el metacéstodo de *Taenia solium*.

La TPI es considerada como un antígeno protector en la esquistosomiasis causada por *S. mansoni* y *S. japonicum* ya que confiere una protección experimental del 40% en ratones y se perfila junto con otras proteínas (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la glutatión S-transferasa) como uno de los antígenos candidatos para la realización de una vacuna en contra de la esquistosomiasis (Harn y col., 1992). Además, en otras parasitosis ha sido utilizada como blanco para diseñar drogas en contra de ella y algunos estudios son muy alentadores en este aspecto pues si bien no es posible atacar directamente las regiones que son conservadas, se han identificado regiones o

aminoácidos no conservados que son importantes en mantener la estructura o bien en la actividad de la enzima. Esto resulta muy importante pues algunos de ellos podrían resultar ser el blanco de drogas que actuarían de manera específica disminuyendo la actividad o alterando la estructura de la enzima sin perturbar a las enzimas homólogas de otras especies que tengan residuos diferentes en esa posición (Gómez-Poyou y cols., 1995).

Finalmente, el patrón tan simple de bandas del análisis de hibridización tipo Southern sugiere que la TPI en *T. solium* es codificada por un gene de copia unica. Es importante mencionar que esta proteína es muy poco abundante en los tejidos, pero que su actividad enzimática es muy grande. Los resultados del tamizaje de la biblioteca de cADN mostraron que alrededor del 0.5% de los mensajeros totales del cisticercoson son ARN mensajero de TPI. Lo que sugiere que la transcripción en este gene está regulada por un promotor fuerte y que su transcrito es muy estable y fácil de traducir. Asimismo, análisis de tipo Northern (Dato no incluido en esta tesis), muestra un transcrito de aproximadamente 1.2 Kb que concuerda con el tamaño de la proteína.

En resumen el trabajo aquí presentado el cual fue la clonación y secuenciación del cADN que codifica para la Triosa Fosfato Isomerasa de *T. solium*, es uno de los primeros trabajos que se realizan con el objetivo de caracterizar una enzima del ciclo glicolítico de un céstodo. Una razonable comprensión de como el cisticercoson lleva cabo este proceso nos ayudara a entender mejor como es el metabolismo de estos organismos.

Es importante mencionar que la información aquí contenida puede ser la base de tratamientos farmacológicos y/o inmunológicos en contra de este parásito en el que se exploten las diferencias entre los organismos.

Como continuación del proyecto se pretende realizar una caracterización molecular, bioquímica e inmunológica de esta proteína con el objetivo de evaluar si esta enzima podría ser el blanco para el diseño de nuevas drogas, así como para el desarrollo de una vacuna.

## VII. APÉNDICES

### 1.- Medios de cultivo, soluciones y amortiguadores

<b>MEDIO SOB</b>	
Bacto-triptona	20.0 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
NaCl	0.5 gr.
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O a concentración final de	10.0 mM.
KCl	2.5 mM.

<b>MEDIO LURIA BERTANI</b>	
Bacto-triptona	10.0 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
NaCl	10.0 gr.

<b>MEDIO SM</b>	
NaCl	5.8 gr.
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.0 gr.
Tris-HCl 1M pH 7.5	50.0 ml.
Gelatina al 2%	5.0 ml.

Los componentes se disuelven y se aforan a un litro. El pH de todos los medios se ajusta a 7.0 y se esterilizan en autoclave por 20 Min a 15 Lb de presión en ciclo líquido. El Mg<sup>++</sup> y K<sup>+</sup> se esterilizan por filtración a través de membranas con poros de 0.22 µm de diámetro.

Para medios sólidos se les adiciona bacto agar o agarosa a una concentración final de 1.5% y para top agar a una concentración final de 0.75%.

Para el fago Lambda, a los medios se les adiciona 0.02% de maltosa, el cual es un inductor del gen lambB que codifica para el receptor del fago.

<b>SOLUCIÓN SSC 20X 1 L.</b>	
NaCl	3.0 M.
Citrato de Na 3 H <sub>2</sub> O	0.3 M.
Ajustar a pH 7.0	

<b>SOLUCIÓN DE DENHARDT'S 50X (0.5 L)</b>	
Ficoll 400	5.0 gr.
Polivinilpirrolidona	5.0 gr.
BSA fracción V	5.0 gr.

La solución se filtra por 0.22 µm y se guarda a -20°C.

<b>AMORTIGUADOR TAE 50% (1 L)</b>	
Tris base	242.0 gr.
Acido acético glacial	51.7 ml.
EDTA (0.5M, pH 8)	100.0 ml.

<b>AMORTIGUADOR TE pH 8.0</b>	
Tris-Cl pH 8.0	10 mM.
EDTA (pH 8.0)	1 mM.

<b>AMORTIGUADOR PARA PCR 10X (5 ml)</b>	
MgCl <sub>2</sub> 1 M	75.0 ul.
Tris-HCl pH 8.4 1M	500.0 ul.
KCl 1 M	2.5 ml.
Gelatina 20 mg/ml	25.0 ml.
H <sub>2</sub> O	1.95ml.

## 2.-Gel de acrilamida para secuencia de ADN al 6%

Urea	45.0 gr.
H <sub>2</sub> O desionizada	21.0 ml.
Acrilamida 40%-BIS 2%	18.0 ml.
Persulfato de amonio al 10%	800.0 ul.
Temed	30.0 ul.

La solución se vacía en vidrios para cámara de electroforesis para DNA con separadores de 0.4 mm de espesor.

## 3.-Técnicas generales

**a.-**La extracción y purificación del ADN del cisticerco fueron realizadas mediante la técnica de extracción y purificación por gradiente de cloruro de cesio.

### **b.-**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 100 µl conteniendo, amortiguador para PCR a concentración final de 1X, un pmol/µl de iniciador (primer), 0.2 mM dNTP's, 0.5 U Taq polimerasa, 100 ng de ADN genómico y agua cbp, bajo las condiciones descritas anteriormente.

### **c.-**Preparación de células competentes con CaCl<sub>2</sub>

Una colonia de células de la cepa TG1 se siembra en 5 ml de SOB y se incuba a 37°C toda la noche. 0.5 ml de este cultivo se siembran en 50 ml de medio hasta una D.O. a 600 nm=0.5. El cultivo se centrifuga a 3,500 rpm durante 10 Min., y el paquete celular se resuspende en una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0.1M (20 ml) y se incuba durante 30 min. Finalmente las células son nuevamente centrifugadas y resuspendidas en una solución similar, pero conteniendo 20% de glicerol estéril. Las células competentes se almacenan a -70°C en alícuotas pequeñas y se descongelan en hielo antes de usar.

**d.-Selección de clonas positivas con IPTG y  $\beta$ -Gal.**

Aproximadamente 200  $\mu$ l de células competentes, se mezclan con 10  $\mu$ l de la ligación y se incuban durante 1 hora a 4°C; a continuación se le da un choque térmico a la mezcla incubando a 42°C durante 2 min y se transfiere el tubo a hielo. Se siembra el 10 y el 50% de la mezcla en SOB sólido adicionando 3 ml de TOP-agar, 15  $\mu$ l de IPTG 0.1M, 75  $\mu$ l de  $\beta$ -Gal en dimetilformamida al 2% y se mantienen 15 min a ta. Finalmente se incuban a 37°C de ocho a 12 horas. Se seleccionan las clonas blancas y se difunden por dos horas a temp. amb. con agitación constante en 1.0 ml de SM. En esta suspensión se guardan a 4°C, hasta su titulación.

**e.-Titulación de Fagos.**

Se realizan diluciones en SM  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$ . Se toman 10  $\mu$ l de cada dilución y se incuban durante 15 min con 250  $\mu$ l de células TG1 crecidas a D.O a 600 nm=0.5 a 37°C. Se siembran en medio SOB sólido con TOP-agar (3 ml) y se incuban a 37°C durante 8 horas. Se cuentan las placas de lisis y se ajusta el número a la dilución correspondiente.

**f.-Purificación de ADN por el método de perlas de vidrio.**

El ADN se corre en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, la banda se corta del gel y se incuba con yoduro de sodio a 37°C hasta que la agarosa se disuelva. Al término se le añaden dos  $\mu$ l de perlas de vidrio, se agita en vórtex y se incuba en hielo durante dos horas, agitándose de vez en cuando. Posteriormente se centrifugan durante 12 segundos, se desecha el sobrenadante, se resuspende en 500  $\mu$ l de yoduro, se centrifuga otra vez y se resuspende rápidamente en la solución de lavado. El lavado se realiza tres veces bajo las mismas condiciones. El ADN se eluye en TE.

**4.- Glosario de términos médicos**

**Aracnoiditis.** Inflamación de la aracnoides

**Ataxia.** Falta o irregularidad de la coordinación, especialmente de los movimientos musculares, sin debilidad o espasmos de éstos.

**Edema.** Acumulación excesiva de líquido seroalbuminoso en el tejido celular, debido a diversas causas: disminución de la presión osmótica del plasma por disminución de las proteínas; aumento de la presión hidrostática en los capilares por insuficiencia cardíaca; mayor permeabilidad de las paredes capilares u obstrucción de las vías linfáticas.

**Encefalopiosis.** Supuración o abscesos del ancéfalo.

**Ependimitis.** Inflamación del epéndimo (membrana que tapiza los ventrículos del cerebro: epéndimo ventricular) y el conducto central de la médula espinal (epéndimo espinal).

**Hidrocefalia.** Acumulación de líquido en el encéfalo por aumento de su producción en los plexos coroideos de los ventrículos o por disminución de su resorción. La enfermedad se caracteriza por aumento del volumen de la cabeza, con prominencia de la frente, debilidad mental por atrofia del cerebro y convulsiones.

**Hipertensión endocraneana.** Aumento de la presión vascular o sanguínea.

**Papiledema.** Edema de la papila óptica

**Pseudohipertrofia.** Aumento del volumen de un órgano por desarrollo del tejido conjuntivo o adiposo, quedando invariable o sujeto a regresión el elemento parenquimatoso. La muscular se debe a una proporción excesiva de grasa en el tejido.

## REFERENCIAS

- Acevedo-Hernández A.** 1989. Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Flisser A y Malagón F. (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Limusa. México p251.
- Alber T; Banner DW; Blouin AC; Petsko GA; Phillips D; Rivers PS; Wilson IA** 1981. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of Triose-phosphate isomerase. Phil Trans R Soc Lond B293 p 169-171.
- Baker D G; Bryant JD; Urban JF; Lunney JK** 1994. Swine immunity to selected parasites. Vet Immunol Immunopathol 43 (1-3) p127-133.
- Balloul JM; Spndermeyer P; Dreyer D; Capron M; Grzych JM; Pierce RJ; Carvallo D; Lecocq JP; Capron A** 1987a. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. Nature 326 p149-153
- Borchert TV; Pratt K; Zeelen JP; Callens M; Noble MEM; Opperdoes FR; Michels PAM; Wierenga RK** 1993. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. Eur J Biochem. 211 p703-710.
- Borchert TV; Abagyan R; Jaenicke R; Wierenga RK** 1994. Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. 91 p1515-1518.
- Botero D; Tanowitz HB; Weiss LM; Wittner M** 1993. Taeniasis and Cysticercosis. Infect Dis Clin North Am Sep. 7(3) p683-97.
- Boulanger D; Reid GDF; Sturrock RF; Wolowczuk Y; Balloul JM; gREZEL d; Pierce RJ; Otiemo MF; Guerret S; Grimaud JA; Butterworth AE; Capron A** 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol 13 p473-490.
- Cal y Mayor Sauz** 1983. La inmunoterapia en la sintomatología de la cisticercosis cerebral. Salud Pública de México. 25(2) p201-4.
- Contreras MC; Slinas P** 1990. Comparación del rendimiento de la reacción de hemaglutinación indirecta y de la reacción de fijación del complemento en el diagnóstico de la cisticercosis. Bol Chil Parasitol. 45 p39-47.
- Correa D; Sandoval MA; Harrison LJS; Parkhouse RME; Plancarte A; Meza-Lucas A; Flisser A** 1989. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and

polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. Trans Royal Soc Trop Med Hyg Apr. 83 p814-16.

**Creasy** JL; Alarcon JJ 1994. Magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. Topics in Magnetic Resonance Imaging. 6(1) p59-69.

**Chang** KH; Kim WS; Cho SY; Han MC; Kim CW 1988. Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis Am J Neuroradiol. 9 p125-30.

**Cho** SY; Kim SI; Kang SY 1986. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in serological diagnosis of human neurocysticercosis using paired samples of serum and cerebrospinal fluid. Korean J Parasit. 24 p25-41.

**Cho** SY; Kang SY; Kim SI 1987. Analysis of antigen specificity using monoclonal and polyclonal antibodies to *Cysticercus cellulosae* by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique. Korean J Parasit. 25 p159-67.

**Cho** SY; Kong Y; Kim SI; Kang SY 1992. Measurement of 150 Kda protein of *Taenia solium* metacestodes by antibody-sandwich ELISA in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. Korean J Parasit Dec. 30(4) p299-307.

**Choromanski** L; Estrada JJ; Kuhn E 1990. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. J Parasitol. 76(1) p69-73-

**Damonte** V 1983. Desconocimiento de la epidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México. 25(3) p301-5.

**Davis** LE; Kornfeld M 1991. Neurocysticercosis: neurologic, pathogenic, diagnostic and therapeutic aspects. Eur Neurol. 31 p229-40.

**Díaz** JF; Verastegui M; Gilman RH; Tsang V; Pilcher JB Gallo C; Garcia HH; Torres P; Montenegro T; Miranda E 1992. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*T. solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. Am J Trop Med Hyg 46(5) p.610-15.

**Estrada** JJ; Kuhn R 1985. Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. Journal of the Neurological Sciences. 71 p39-48.

**Faust** EC; Russell PF; Jung RC 1981. Parasitología clínica. De. Salvat. México. p530-36.

**Feldman M; Plancarte A; Sandoval M; Wilson M; Flisser A 1990.** Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and resum) for the diagnosis of neurocysticercosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. (in press).

**Felleisen R; Gottstein B 1993.** *Echinococcus multilocularis*: molecular and immunochemical characterization of diagnostic antigen II/3-10. Parasitology Sep. 107 (Pt 3) F335-42.

**Flisser A 1988.** Neurocysticercosis in Mexico. Parasitology Today. 4 p131-37

**Flisser A; Plancarte A; Correa D; Rodriguez-del-Rosal E; Feldman M, Sandoval M; Torres A; Meza A; Parkhouse RME; Harrison LJS; Wilson M; Avila G; Allan J; Craig PS; Vallejo V; Ortiz D; Garcia E; McManus DP 1990.** New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. Ann Parasitol Hum Comp. 65 suppl 1 p95-98.

**Flisser A 1990.** Cysticercosis. Parasitology. 12(3) p50-4.

**Gallie GJ; Sewell MMH 1972.** The survival of *Cysticercus bovis* in resistant calves. Vet Rec 91 p481.

**Gallie GJ; Sewell MMH 1974.** The serological response of three month old calves to infection with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and their resistance to reinfection. Tropical animal Health and Production 6 p163

**Gallie GJ; Sewell MMH 1976.** Experimental immunisation of six month old calves against infection with the cysticercus stage of *Taenia saginata*. Tropical Animal Health and Production 8 p233.

**Garcia HH; Herrera G; Gilman RH; Tsang V; Pilcher JB; Díaz J; Candy EJ; Miranda E; Naranjo J 1994.** Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. Amm J Trop Med Hyg. 50(2) p152-7.

**Garnier J; Osguthorpe D; Robson D 1978.** Analysis of accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular protein. J. Mol. Biol. 120 p97-120.

**Gómez-Poyou A; Saavedra-Lira E; Becker Y; Zubillaga RA; Rojo-Domínguez A; Pérez-Monfort R 1995.** Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action - studies with triosephosphate isomerase. Chemistry & Biology. 2 P847-855.

**Gottstein B; Tsang V; Shantz PM 1986.** Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. Am J Trop Med Hyg. 35(2) p308-13.

**Grogl M; Estrada J; MacDonald G; Kuhn R** 1985. Antigen-antibody analyses in Neurocysticercosis. J Parasit. 7(4) p433-42.

**Harn DA; Gu W; Oligino LD; Mitsuyama M; Gebremichael A; Richter D** 1992. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of Schistosome Triose-phosphate isomerase. 148 (2) p562-567

**Harrison LJ; Delgado J; Parkhouse RM** 1990. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *taenia solium* with DNA probes. Parasitology Jun. 100 Pt 3 p459-61.

**Hawn TR; Tom TD; Strand M** 1993. Molecular cloning and expression of SmlrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin, calreticulinn, and OvRa1. J Biol Chem. 268 (11) p7692-8.

**Hayunga EG; Sumner MP; Duncan JF Jr; Chakrabarti EK; Webert DW** 1992. Production of anti-idiotypic antibodies as potential immunoreagents for the serological diagnosis of bovine cysticercosis. Ann NY Acad Sci Jun. 653 p178-83.

**Hol WGJ; Wierenga RK** 1992. Crystallographic investigations of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*: Potention starting points for the design of new sleeping sickness drugs, in: The design of drugs to macromolecular targets (Beddell CR., de) p211-247.

**Hollan S; Fujii H; Hirono A; Hirono K; Karro H; Miwa S; Harsanyi V; Gyodi E; Inselt-Kovac SM** 1993. Hereditary triosephosphate isomerase (TPI) deficiency: two severely affected brothers one with and one without neurological symptoms. Hum Genet 92 (5) p486-490.

**Johnson KS; Harrison JG; Lightowers MW; O'Hoy KL; Cogle WG; Dempster RP; Lawrence SB; Vinton JG; Heath DD; Rickard MD** 198. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature 9. 338(6216) p585-7.

**Joseph-McCarthy D; Rost LE; Komives EA; Petsko GA** 1994. Crystal structure of the mutant yeast triosephosphate isomerase in wivh the catalytic base glutamic acid 165 is changed to aspartic acid. Biochemistry. 33 p2824-2829.

**Katti MK; Chandramukhi A** 1990. Comparative evaluation of cysticercal antigens and immunoassays in the diagnosis of neurocysticercosis. Ann Trop Med Parasitol. 85(6) p605-15.

**Kim SI; Kang SY; Cho SY; Hwang ES; Cha CY** 1986. Purification of cystic fluid antigen of *Taenia solium* metacestodes by affinity

chromatography using monoclonal antibody and its antigenic characterization. Korean J Parasit. 24 p145-58.

**Kohl L;** Callens M; Wierenga RK; Opperdoes FR; Michels PAM 1994. Triose-phosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. Eur. J. Biochem. 220 p331-338.

**Kong Y;** Kang SY; Cho SY; Min DY 1989. Cross-reacting and specific antigenic components in cystic fluid from metacestodes of *Echinococcus granulosus* and *Taenia solium*. Korean J Parasit. 27 p131-39.

**Kong Y;** Cho SY; Kim SI; Kang SY 1992. immunoelectrophoretic analysis of major component proteins in cystic fluid of *Taenia solium* metacestodes. Korean J Parasit. 30(3) p209-18.

**Laclette JP;** Ornelas Y; Merchant MT; Willms K 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: Flisser A; Willms K; Laclette JP; Larralde C; Ridaura C; Beltrán F (eds). Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives. Academic press NY p3375

**Laclette JP;** Landa A; Arcos L; Willms K; Davis AE; Shoemaker CB 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). Mol Biochem Parasitol. 44 p287-296.

**Landa A;** Laclette JP; Nicholson-Weller A; Shoemaker CB 1993. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). Mol Biochem Parasitol. 60 p343-48.

**Larralde C;** Laclette JP; Owen CS; Madrazo Y; Sandoval M; Bojalil R; Sciutto E; Contreras L; Arzate J; Díaz ML; Govezensky T; Montoya RM; Goodsaid F 1986. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and Hemagglutination test. Am J Trop Med Hyg. 35(5) p965-73.

**Larralde C;** Montoya RM; Sciutto; Díaz ML; Govezensky T; Coltorti E 1989. Deciphering western blots of tapeworms antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am J Trop Med Hyg. 40(3) p282-90.

**Larralde C;** Padilla A; Hernández M; Govezensky T; Sciutto E; Gutierrez G; Tapia-Conyer R; Salvatierra B; Sepúlveda J 1992.

Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México. 34(2) p197-210.

Lee JH; Kong Y; Ryu JY; Cho SY 1993. Applicability of ABC-ELISA and Protein A-ELISA in serological diagnosis of cysticercosis. The Korean Journal Parasitology March. 31(1) p49-56.

Lightowers MW; Mitchell GF; Bowtell DDC; Anders RD; Rickard MD; 1984. Immunization against *Taenia taeniformis* in mice: studies on the characterization of antigens from oncospheres. Int. j. Parasit 14 p321-333.

Lightowers MW 1990. Cestode infections in animals: immunological diagnosis and vaccination. Rev Sci Tech. 9 (2) p463-487.

Lloyd S; Soulsby EJJ 1976. Passive transfer of immunity to neonatal calves against metacestodes of *Taenia saginata*. Vet Parasit 2 p355.

Maquat LE; Chilcote R; Ryan PM 1985. Human triose-phosphate isomerase cDNA and protein structure. J. Biol. Chem. 260 p3748-3753.

Mazzotti L; Dávalos A; Martínez MR 1965. Infecciones naturales y experimentales por *Cysticercus cellulosae* en diferentes especies de mamíferos. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. 25 p151.

McManus DP; Bowles J; Leggat G; García-Zepeda E 199. Some recent advances in the molecular characterization of *Echinococcus* and *T. solium*. Southeast Asian J Trop Med Public Health Dec 1. 22 p256-61.

Michel P; Callies P; Raharison H; Genin C; Roux J 1992. La cisticercose à Madagascar: mise au point diagnostique et thérapeutique. Dakar-Médical. 37 (2) p.191-7.

Molinari JL; Meza R; Juárez B; Palacios S; Tato P 1983. *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. Exper. Parasitol 55 p340-357.

Monroy A; Gómez J; Ramírez A; Carrillo G 1992. Reconocimiento por inmunoelectrotransferencia de antígenos de *T. solium* y su larva. Rev Lat-Amer Microbiol. 34 p33-8.

Montenegro T, Gilman RH; Castillo R; Tsang V; Guevara A; Sanabria H; Verastegui M; Sterling C; Miranda E 1994. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *T. solium*, *E. granulosus* and *H. nana*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo Jul-Aug. 36(4) p.327-34.

Morakote N; Nawacharoen W; Sukonthasun K; Thammasonthi W; Khamboonruang C 1992. Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of

neurocysticercosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health Mar. 23(1) p77-81.

**Müller N; Gottstein B; Vogel M, Flury K; Seebeck T 1989.** Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol Biochem Parasitol. 36 p 151-160.

**Murrel KD; Rhoads ML 1988.** Application of biotechnology methods to the study of cestodes. Southeast Asian J Trop Med Marc. 19(1) p35-40.

**Nascimento E; Costa JO; Guimaraes MP; Tavares CA 1995.** Effective immune protection of pigs against cysticercosis. Vet Immunol Immunopathol. 45(1-2) p127-37.

**Nascimento E; Tavares CA; Lopes JD 1987.** Immunodiagnosis of human cysticercosis (*T. solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. J Clin Microbiol Jul. 25(7) p1181-5.

**Nava JS 1983.** La cisticercosis del sistema nervioso central. Salud Pública de México. Mar-Abr. 25(3) p297-305.

**Nickbarg EB; Davenport RC; Petsko GA; Knowles JR 1988.** Triosephosphate isomerase: Removal of a putatively electrophilic histidine residue results in a subtle change in catalytic mechanism. Biochemistry. 27 p5948-5960.

**Osborn PJ; Heath OD 1981.** Immunization of lambs against Echinococcus granulosus using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. Res Vet Sci 33 p133-133.

**Padilla A 1994.** Cisticercosis humana: Epidemiología y análisis de antígenos por western blot. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Facultad de Ciencias UNAM.

**Pancre V; Wolowczuk I; Guerret S; Copin MC; Delanoye A; Capron A; Auriault C 1994.** Protective effect of rSm28GST specific T cells in schistosomiasis role of gamma interferon. Infect Immun 62 (9) p3723-30.

**Rajasekariah GR; Rickard MD; Mitchell GF 1980.** Density-gradient separation of *Taenia pisiformis* oncospheres. Journal of Parasitology 66 p355-356.

**Reis MG; Davis RE; Singh H; Skelly PJ; Shoemaker CB1993.** Characterization of the *Schistosoma mansoni* gene encoding the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase. Mol Biochem Parasitol 59 (2) p235-242.

**Reynolds SR; Dahl CE; Harn DA 1993.** T and B determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni*

experimental vaccine Triose.phosphate isomerase. J Immunol. **152** p 193-200.

**Rickard MD; Adolph AJ** 1976. Vaccination of calves against *Taenia saginata* infection using a "parasite free" vaccine. Vet Parasitol **1** p389-392.

**Rickard MD; Brumley JL** 1981. Immunization of calves against *Taenia saginata* infection using antigens collected by in vitro incubation of *T. saginata* oncospheres or ultrasonic desintegration of *T. saginata* and *T. hydatigena* oncospheres. Res Vet Sci **30** p94-103.

**Rhoads ML; Zarlenga DS; Al-Yaman FM** 1991. A recombinant immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health Dec. **22** p268-70.

**Rishi AK; McManus DP;** 1988. Molecular cloning of *Taenia solium* genomic DNA and characterization of taeniid cestodes by DNA analysis. J Parasitol **97** p161-76.

**Rosas N; Sotelo J; Nieto D** 1986. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. Archives of Neurology. **43** p353-6.

**Sambrook J; Fritsch EF; Maniatis T** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn. Cold Sprong Harbor Laboratory press. NY

**Sciutto E; Fragoso G; Trueba L; Lemos D; Montoya RM; Diaz ML; Govezensky T; Lomel C; Tapia G; Larralde C** 1990. Cysticercosis vaccine: cross-protective immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. Parasite Immunol **12** p697-701.

**Sciutto E. Fragoso G; Diaz ML; Valdez F; Montoya PM Govezensky T; Lomeli C; Larralde C** 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. Parasitol Res **77** p243-246.

**Schantz PM; Cruz M; Sarti E; Pawlowski Z** 1993. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. Bulletin of PAHO **27** (4) P397-403.

**Schenone H; Villarroel F; Rojas A; Ramirez R** 1982. En: Flisser A; Willms K; Lacleite JP; Larralde C; Ridaura SC; Beltrán F, (Eds) Cysticercosis: Presents State of Knowledge and Perspectives. Academic Press NY..

**Shoemaker C; Gross A; Gebremichael A; Harn D** 1992. CDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen Triose-phosphate isomerase. Proc Natl Acad Sci. **89** p1842-1846.

**Smith DB; Johnson KS** 1988. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene 67 p31-40.

**Sorvillo FJ; Waterman SH; Richards FO** 1992. Locally acquired and travel related infections and detection of intestinal tapeworm carriers in Los Angeles County. Am J. Trop Med Hyg. 47 p356.

**Sotelo J; Guerrero V; Rubio F** 1985. Neurocysticercosis: A new classification based on active and inactive forms. Arch Intern Med. 145 p442.

**Sun A-Q; Yüksel Ü; Rao GSJ; Gracy RW** 1992. Effects of active site modification and reversible dissociation on the secondary structure of triosephosphate isomerase. Archives of Biochemistry and Biophysic 295(2) p421-428

**Tsang V; Brand JA; Boyer AE** 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis human cysticercosis (*T. solium*). J Infect Dis Jan. 159(1) p50-9.

**Villagrán-Urbe J; Olvera-Rabiela JE** 1989. La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México. En: Flisser A y Malagón F. (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Limusa. México p97-105.

**Vogel M; Gottstein B; Müller N; Seebeck T** 1988. Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. Mol Biochem Parasitol. 31 p117-26.

**White AC; Tato P; Molinari JL** 1992. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. Infect Agents Dis. 1 p185-93.

**Wierenga RK; Noble MEM; Vriend G; Nauche S; Friessmann** 1991. Refined 1.83 Å structure of trypanosome triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulfate. J.Mol.Biol. 220 P995-1015.

**Wierenga RK; Noble MEM** 1992. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. J. Mol. Biol. 224 p1115-1126.

**Wilson M; Bryan RT; Fried JA; Ware DA; Schantz PM; Pilcher JB; Tsang V** 1991. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. J Infect Dis. 164 p1007-9.

**Xu ZB; Liu D** 1992. Significance of western blot in diagnosis of cysticercosis cellulosae. Cin Med J Dec. 105(12) p1004-8.

**Yong TS; Yeo IS; Seo JH; Chang JK; Lee JS; Kim TS; Jeong GH** 1993. Serodiagnosis of cysticercosis by ELISA-inhibition test using monoclonal antibodies. The Korean Journal of Parasitology Jun. 31(2) p149-56.

**Wang CY; Zhang HH; Ge LY** 1992. A Mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. Hybridoma Nov. 11(6) p 825-27.

**Zarlenga DS; Rhoads ML; Al-Yaman FM** 1994. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. Mol Biochem Parasitol. 67 p215-23.