



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA."**

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN
ESTRUCTURAL DEL GEN PARA LA GLUTATIÓN
S-TRANSFERASA DE 25.5kDa DE *Taenia solium*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VÁZQUEZ SOLANO GLADIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA.

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE *Taenia solium* DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICIA, UNAM. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA.

AUNQUE SIENTAS EL CANSANCIO,
AUNQUE EL TRIUNFO TE ABANDONE,
AUNQUE EL ERROR TE LASTIME,
AUNQUE UNA ILUSIÓN SE APAGUE,
AUNQUE IGNOREN TUS ESFUERZOS,
AUNQUE TODO PAREZCA NADA...

¡VUELVE A EMPEZAR!

ANONIMO.

DEDICATORIA A:

Mi mamá:

Ma. Luisa Solano Suárez. Por ser no solo mi mamá sino mi gran amiga la cual siempre ha sido mi cómplice en todo y sobretodo mi gran apoyo. Gracias por apoyar una de mis metas que también es la tuya ya que siempre me impulsabas a seguir a pesar de los obstáculos. Te agradezco el haber y el estar conmigo tanto en los malos y buenos momentos; de la misma manera siempre contarás conmigo. Gracias por el hecho de ser mi mamita.

Mi papá:

Margarito Vázquez Rojas. Por apoyarme de acuerdo a sus posibilidades y porque se que aunque nos contrariamos varias veces siempre contare con su apoyo. Gracias por no truncar mis metas sino al contrario.

Mi hermana:

Ma. Luisa Vázquez Solano. Por que siempre estaremos apoyándonos en los malos y buenos momentos .

Mi abuelita:

Cornelia Suárez Alvarado. ^(†) Tenías razón al decir que no compartirías conmigo el final de este proyecto, pero te agradezco todo el apoyo, cariño..... que me regalaste y el enseñarme a ser fuerte como tu lo eras, aunque no estés presente siempre serás mi nena.

Mi Albertito:

Por que siempre me motivas a seguir adelante sin envidia ni egoísmo, por comprenderme, consentirme y estar siempre al pendiente de mi y de mi familia. Gracias por enseñarme que todo en esta vida tiene solución. Te agradezco que siempre me regales momentos alegres; se también que voy a contar con tu apoyo y amor incondicional.

A mis tíos:

Teresa, Carlos Raúl, Lourdes, Rogelio, Miguel. Gracias por que todos ustedes me han apoyado de alguna manera durante todo este tiempo de mi vida. Se que siempre voy a contar con ustedes así como con mis primos (as)

Agradecimientos a:

El Dr. Abraham Landa piedra por ser el director de esta tesis del cual siempre recibí un gran apoyo desde mi llegada hasta el final del proyecto.

Alicia por la paciencia para enseñarme cada una de las técnicas que utilice y gracias por el apoyo que me brindaste.

La Dra. Lucia ya que despejo algunas de mis dudas para este proyecto.

Mis compañeros: José, Felipe, Ricardo, Alex, Víctor, Iarazet, Anayetzi gracias a cada uno porque hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera muy agradable.

A mis amigas (os):

Sandra, Esmeralda, Brenda, Elsa, Claudia, Brisa, Maritza, Lucia, Juan, Bernardo, Homero, Luis, Javier. A cada uno de ustedes les agradezco que me hayan apoyado durante la carrera y sobretodo que siempre me regalaban palabras que me levantaban el animo y ego. Gracias por todos los momentos juntos como estudiantes.

A todos mis profesores:

Por que contribuyeron a mi formación académica

A quienes conforman el jurado de tesis:

Gracias por compartir sus conocimientos y comentarios en la revisión de este proyecto.

Q.F.B José Oscar González Moreno.

Dr. Abraham Landa Piedra.

M. en C. Raquel Retana Ugalde.

Q.F.B Ma. Lourdes Vega Navarrete.

Q.F.B Jesús Arroyo Rosales

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN
ESTRUCTURAL DEL GEN PARA LA GLUTATIÓN
S-TRANSFERASA DE 25.5kDa DE *Taenia solium*.**

INDICE.	PAG
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES	
TAENIA SOLIUM.....	4
➤ Morfología de <i>T. solium</i>	4
➤ Ciclo biológico de <i>T. solium</i>	8
TENIOSIS.....	10
➤ Epidemiología.....	11
➤ Patogenía y manifestaciones clínicas.....	11
➤ Diagnóstico.....	11
➤ Tratamiento.....	12
CISTICERCOSIS.....	14
➤ Estudios epidemiológicos.....	15
» Cisticercosis humana.....	15
» Cisticercosis porcina.....	15
➤ Patogenía y manifestaciones clínicas.....	15
➤ Diagnóstico.....	16
» Cisticercosis humana.....	16
» Cisticercosis porcina.....	17
➤ Tratamiento.....	18
» Cisticercosis humana.....	18
» Cisticercosis porcina.....	19
ENZIMAS DESTOXIFICANTES COMO MECANISMOS DE DEFENSA DE HELMINTOS.....	20
PAPEL DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN LA LIPOPEROXIDACIÓN.....	23
GENERALIDADES DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GSTs).....	26
NOMENCLATURA DE GSTs.....	29
PRESENCIA DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN DIVERSOS ORGANISMOS.....	31
PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN HELMINTOS.....	31

GENES DE GSTs EN MAMIFEROS.....	33
ESTRUCTURA DEL ADN.....	34
GEN.....	35
CONFORMACIÓN DE LOS GENES.....	35
REGIÓN ESTRUCTURAL DE UN GEN.....	36
CLONACIÓN DE GENES.....	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
HIPOTESIS.....	42
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....	42
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	43
MATERIALES.....	44
MÉTODOS.....	46
METODOLOGÍA GENERAL.....	51
RESULTADOS.....	52
➤ Aislamiento del gDNA y Clonación de la Región estructural del gen de la GST25.5kDa.....	52
➤ Caracterización de la Región Estructural del Gen para la GST25.5kDa.....	54
➤ Southern Blot.....	56
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	58
CONCLUSIÓN.....	61
ANEXO.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN.

Dada la importancia de la teniosis y la cisticercosis producida por *Taenia solium*; y siendo ambos padecimientos un gran problema económico y de salud es necesario no sólo conocer el ciclo biológico para prevenir y controlar a dicho parásito en nuestra población, sino también caracterizar a sus genes y sus productos enzimáticos involucrados en procesos fisiológicos importantes para el parásito. Este trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar la región estructural del gen para la enzima Glutación S-transferasa (GST), proteína que detoxifica especies reactivas de oxígeno.

Se purificó el DNA genómico (gDNA) de la larva *Taenia solium*, el cual fue utilizado para obtener la región estructural del gen de la GST de 25.5kDa; para esto el gDNA se utilizó en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de cDNA previamente obtenida de esta enzima. Se obtuvo un fragmento de DNA de ~1000pb observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este fragmento se clonó en el vector pCRII y con éste se transformaron bacterias *Escherichia coli*. Las bacterias transformadas conteniendo los plásmidos recombinantes (fragmento de interés) se aislaron. Se aisló DNA de cada una de las clonas y se les determinó su secuencia nucleotídica. Los análisis de las secuencias nucleotídicas revelaron que efectivamente este fragmento codifica para la región estructural del gen de la Glutación S-transferasa de 25.5kDa, el cuál fue comparado con su cDNA.

INTRODUCCIÓN.

Taenia solium causa los padecimientos conocidos como taeniosis y cisticercosis constituyendo problemas de salud pública y veterinaria que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza; siendo la carne de cerdo cruda o mal cocida infectada con la larva de este parásito la fuente principal de transmisión de la teniosis y consecuentemente de la cisticercosis. La cisticercosis se encuentra en África, Asia y Latinoamérica; en particular México y Brasil son los países que presentan altas frecuencias.

La contribución que tiene la cisticercosis humana en las tasas de morbilidad y mortalidad es resultado del desarrollo del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC), lo que frecuentemente causa discapacidad física y en ocasiones la muerte. Se ha sugerido que la principal consecuencia de la teniosis en la salud es la desnutrición, aunque aún no se ha demostrado en forma concluyente como con otras parasitosis. En la actualidad se han propuesto elaborar vacunas como alternativa para erradicar la cisticercosis porcina las cuales aún no han sido suficientemente evaluadas; como ejemplo de ello se tienen dos antígenos provenientes de una biblioteca de cDNA de *T. crassiceps*, un antígeno recombinante y tres péptidos provenientes de *T. solium*, así como un complejo antigénico a partir de metacéstodos de *T. solium*.¹

En la búsqueda de eliminar a *T. solium* se ha optado por caracterizar parcialmente al gen que codifica para la enzima Glutación S-transferasa 25.5kDa (GST); enzima que es importante para dicho parásito. Esta enzima pertenece a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, es una enzima dimérica que protege células conjugando el Glutación reducido (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) a xenobióticos endógenos o exógenos como drogas o metabolitos tóxicos producidos por estrés oxidativo. El glutación reducido también es substrato de otras enzimas de defensa como la glutación peroxidasa, y GSTs, que destoxifican aldehídos y peróxidos tóxicos, además de neutralizar especies reactivas oxigenadas. En mamíferos se han descrito seis clases de GSTs solubles las cuales son: alfa, mu, kappa, pi, sigma y teta. Esta clasificación está basada en

las diferencias en su estructura, bioquímica, propiedades inmunológicas y estructura del gen.

Debido a la carencia de citocromo P-450, catalasa, así como a la baja expresión de glutatión peroxidasa; se ha considerado que la enzima GST por su gran abundancia en helmintos es el principal sistema de destoxificación. Por lo que es una de las moléculas selectas para desarrollar una vacuna y drogas nuevas contra las helmintiasis. El disponer de las secuencias completas de los genes que las codifican nos permitirá conocer como estos son regulados. Además de poder producir GSTs recombinantes para estudios bioquímicos básicos e inmunológicos como los ensayos de vacunación.^{2,3,4,5,6}

ANTECEDENTES.

***TAENIA SOLIUM.*^{8,11}**

Clasificación taxonómica:

Reino: Animalia
 Rama: Platyhelminthes
 Clase: Cestoidea
 Subclase: Cestoda
 Orden: Cyclophyllidea
 Género: *Taenia*
 Especie: *solium*

➤ **MORFOLOGÍA DE *Taenia solium*.**

Taenia solium presenta un cuerpo alargado, adaptado a la forma tubular del intestino, dividido en 3 regiones: Escólex, Cuello y Estróbilo.

- » **Escólex o cabeza:** Se localiza en el extremo anterior es una estructura no plana, en la mayor parte de los cestodos es de tipo cuboide; posee 4 ventosas, el cual es un órgano de fijación y puede tener funciones de nutrición y sensoriales, exhibe un rostelo apical proyectable, armado de una doble cadena de 22 a 32 ganchos de dos tamaños distintos.
- » **Cuello:** Después del escólex se presenta esta porción muy pequeña, que todavía no está segmentada, se considera como una región de tejido indiferenciado; da origen a la cadena de proglótidos.
- » **Estróbilo:** Formado por segmentos, llamados proglótidos, cada uno de ellos con uno o más juegos de órganos de reproducción. Su número oscila desde tres hasta varios miles. Los proglótidos van cambiando conforme se van alejando del escólex cambian en tamaño haciéndose más grandes y cambian en las estructuras que contienen, en función de todo esto se dividen en 3 tipos: proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, el elemento fundamental para dividirlos es la evolución de sus órganos reproductores; los proglótidos grávidos son puro útero lleno de huevos; cuyo órganos sexuales se han atrofiado.

Los órganos reproductivos femeninos y masculinos están presentes en cada segmento. La fertilización puede ocurrir dentro de un solo proglótido, o entre proglótidos del mismo o diferente gusano (Ver figura 1,2,3).^{7,8,9,10}

Toda la cadena de la tenia incluyendo el escólex puede tener una longitud de 2 a 7 metros, hasta el caso extremo de medir entre 15 a 18 metros de longitud y cerca de 1,000 proglótides; son de los parásitos más largos en el intestino del hombre, aunque son muy delgados, esto permite que se doble varias veces en la luz intestinal (Ver figura 4).^{7,12,13,14}

El resultado de la unión de las células de ambos sexos es el huevo, que se produce en grandes cantidades, hasta 200,000 o más por aparato genital femenino por día. Esto se debe a que un porcentaje pequeñísimo de los huevos o larvas serán capaces de infectar a un nuevo huésped y el parásito debe asegurar el ciclo.⁷

El huevo es una estructura esférica que mide un promedio de 40 micras, tiene una capa externa que generalmente se pierde, es decir, no siempre se observa; en el interior se localiza el embrión que recibe el nombre de oncósfera o también hexacanto, porque tiene 6 ganchos; este huevo es idéntico al de *Taenia saginata*, por lo que si llegamos a ver huevos en la materia fecal lo único que podemos diagnosticar es teniosis, pero no podemos decir de qué especie se trata por su semejanza entre las dos especies; en tanto que si se observa proglótidos o el escólex se puede determinar la especie (Ver figura 5).¹⁵

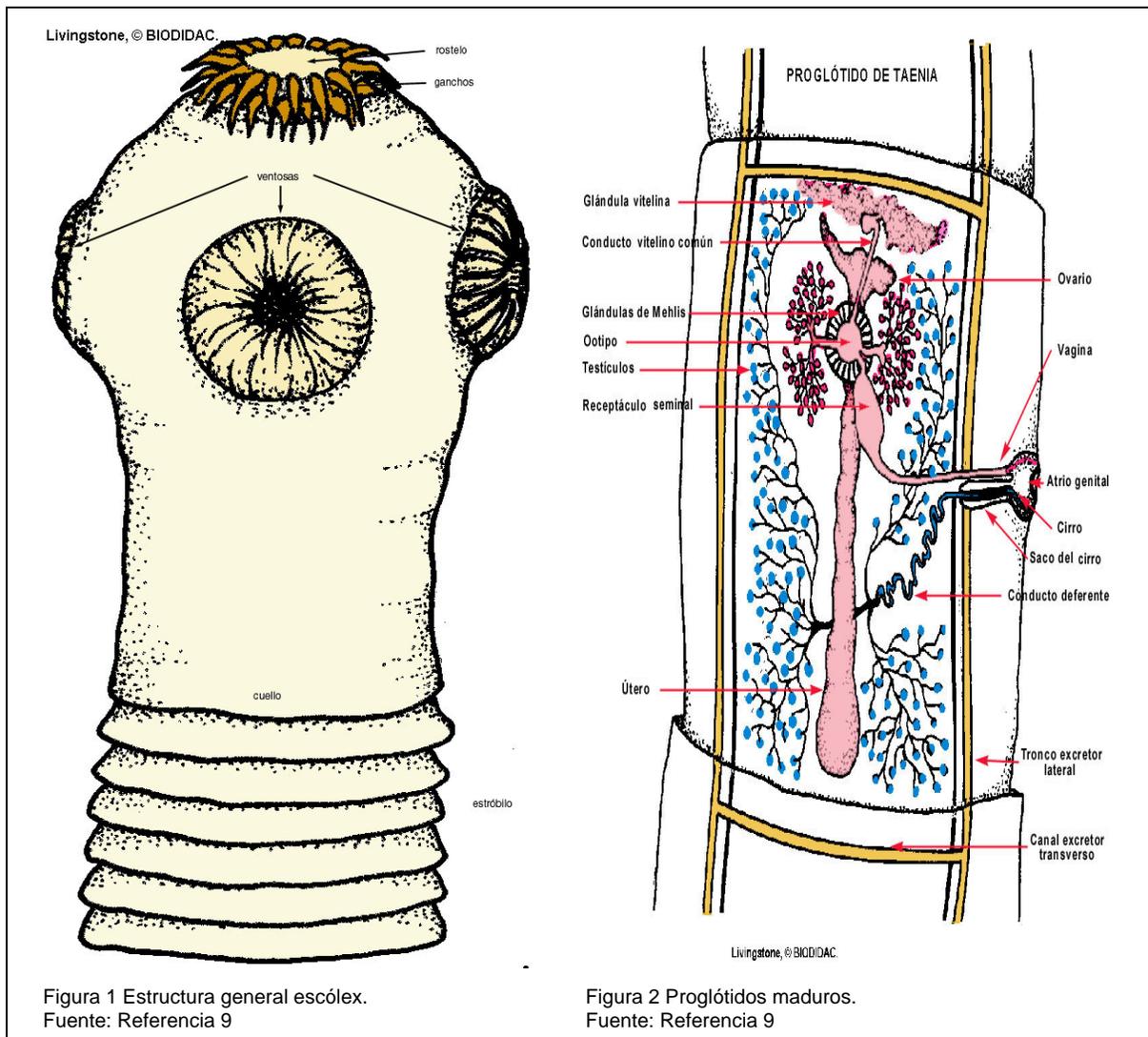
El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios del escólex. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones laterales. Algunos de los neuropéptidos de importancia en la transmisión de estímulos son la serotonina y la acetilcolina.

La osmoregulación y la excreción dependen de un sistema protonefridial con dos pares de canales laterales y conexiones transversas.

Los cestodos carecen de sistema digestivo, en su lugar, poseen una superficie externa de gran importancia fisiológica, el tegumento, un sincicio anucleado cubierto de extensiones citoplásmicas, variables en tamaño y número, conocidas

como microtricas (comparadas con las microvellosidades intestinales), que amplifican el área de absorción del gusano.

El tegumento contiene enzimas, sistemas específicos para el transporte de moléculas y iones, es un órgano de protección, auxiliar en la locomoción y sitio de transferencia metabólica. El elemento más externo del tegumento es el glicocálix, una cubierta protectora que inactiva algunas enzimas del huésped y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos. Una característica común a los cestodos es la presencia de cuerpos calcáreos. Debajo del tegumento se ubica una capa de músculos longitudinales y circulares, no estriados (Ver figura 6).^{8,9,10}



ANTECEDENTES.

***TAENIA SOLIUM.*^{8,11}**

Clasificación taxonómica:

Reino: Animalia
 Rama: Platyhelminthes
 Clase: Cestoidea
 Subclase: Cestoda
 Orden: Cyclophyllidea
 Género: *Taenia*
 Especie: *solium*

➤ **MORFOLOGÍA DE *Taenia solium*.**

Taenia solium presenta un cuerpo alargado, adaptado a la forma tubular del intestino, dividido en 3 regiones: Escólex, Cuello y Estróbilo.

- » **Escólex o cabeza:** Se localiza en el extremo anterior es una estructura no plana, en la mayor parte de los cestodos es de tipo cuboide; posee 4 ventosas, el cual es un órgano de fijación y puede tener funciones de nutrición y sensoriales, exhibe un rostelo apical proyectable, armado de una doble cadena de 22 a 32 ganchos de dos tamaños distintos.
- » **Cuello:** Después del escólex se presenta esta porción muy pequeña, que todavía no está segmentada, se considera como una región de tejido indiferenciado; da origen a la cadena de proglótidos.
- » **Estróbilo:** Formado por segmentos, llamados proglótidos, cada uno de ellos con uno o más juegos de órganos de reproducción. Su número oscila desde tres hasta varios miles. Los proglótidos van cambiando conforme se van alejando del escólex cambian en tamaño haciéndose más grandes y cambian en las estructuras que contienen, en función de todo esto se dividen en 3 tipos: proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, el elemento fundamental para dividirlos es la evolución de sus órganos reproductores; los proglótidos grávidos son puro útero lleno de huevos; cuyo órganos sexuales se han atrofiado.

Los órganos reproductivos femeninos y masculinos están presentes en cada segmento. La fertilización puede ocurrir dentro de un solo proglótido, o entre proglótidos del mismo o diferente gusano (Ver figura 1,2,3).^{7,8,9,10}

Toda la cadena de la tenia incluyendo el escólex puede tener una longitud de 2 a 7 metros, hasta el caso extremo de medir entre 15 a 18 metros de longitud y cerca de 1,000 proglótides; son de los parásitos más largos en el intestino del hombre, aunque son muy delgados, esto permite que se doble varias veces en la luz intestinal (Ver figura 4).^{7,12,13,14}

El resultado de la unión de las células de ambos sexos es el huevo, que se produce en grandes cantidades, hasta 200,000 o más por aparato genital femenino por día. Esto se debe a que un porcentaje pequeñísimo de los huevos o larvas serán capaces de infectar a un nuevo huésped y el parásito debe asegurar el ciclo.⁷

El huevo es una estructura esférica que mide un promedio de 40 micras, tiene una capa externa que generalmente se pierde, es decir, no siempre se observa; en el interior se localiza el embrión que recibe el nombre de oncósfera o también hexacanto, porque tiene 6 ganchos; este huevo es idéntico al de *Taenia saginata*, por lo que si llegamos a ver huevos en la materia fecal lo único que podemos diagnosticar es teniosis, pero no podemos decir de qué especie se trata por su semejanza entre las dos especies; en tanto que si se observa proglótidos o el escólex se puede determinar la especie (Ver figura 5).¹⁵

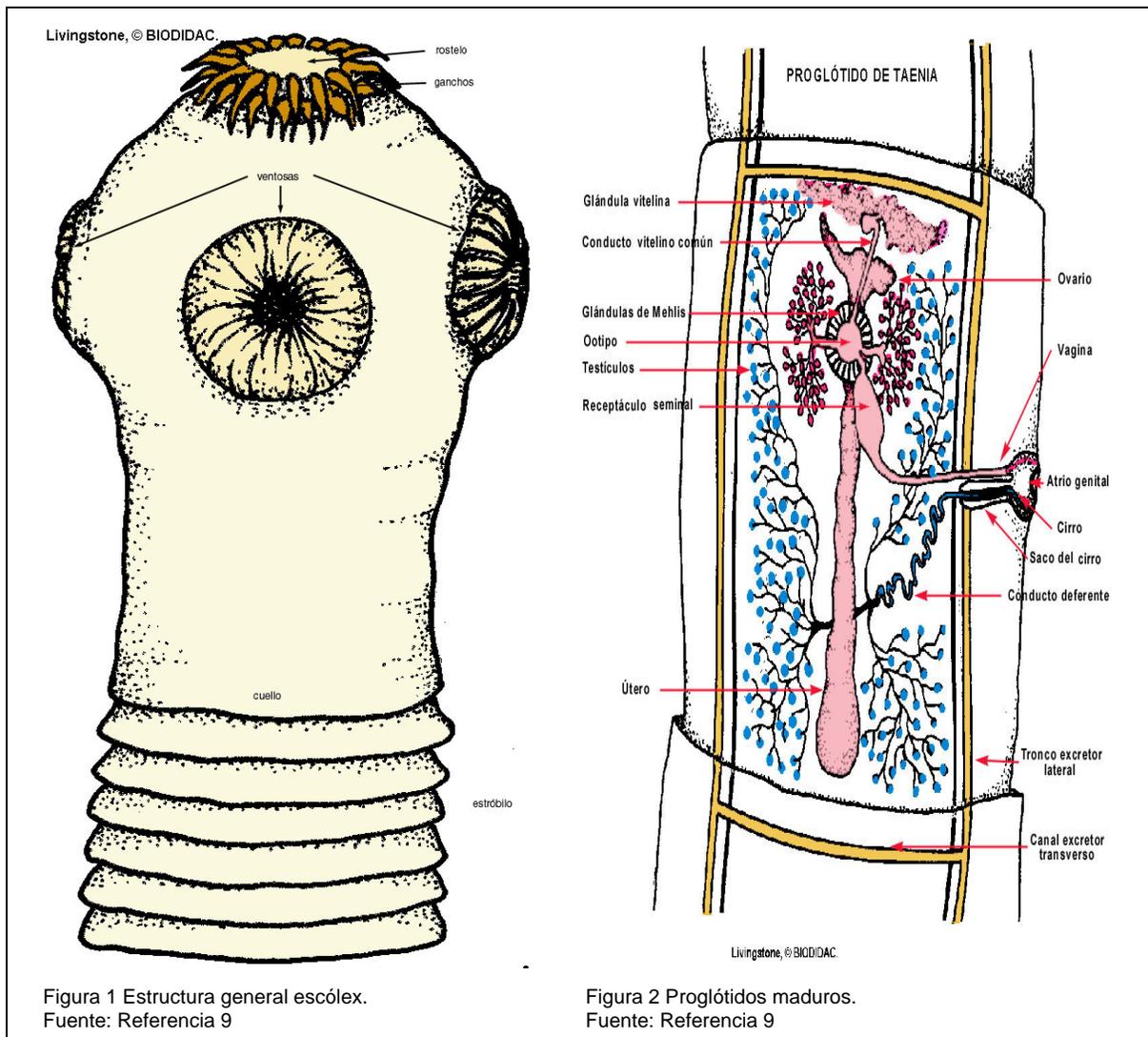
El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios del escólex. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones laterales. Algunos de los neuropéptidos de importancia en la transmisión de estímulos son la serotonina y la acetilcolina.

La osmoregulación y la excreción dependen de un sistema protonefridial con dos pares de canales laterales y conexiones transversas.

Los cestodos carecen de sistema digestivo, en su lugar, poseen una superficie externa de gran importancia fisiológica, el tegumento, un sincicio anucleado cubierto de extensiones citoplásmicas, variables en tamaño y número, conocidas

como microtricas (comparadas con las microvellosidades intestinales), que amplifican el área de absorción del gusano.

El tegumento contiene enzimas, sistemas específicos para el transporte de moléculas y iones, es un órgano de protección, auxiliar en la locomoción y sitio de transferencia metabólica. El elemento más externo del tegumento es el glicocálix, una cubierta protectora que inactiva algunas enzimas del huésped y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos. Una característica común a los cestodos es la presencia de cuerpos calcáreos. Debajo del tegumento se ubica una capa de músculos longitudinales y circulares, no estriados (Ver figura 6).^{8,9,10}



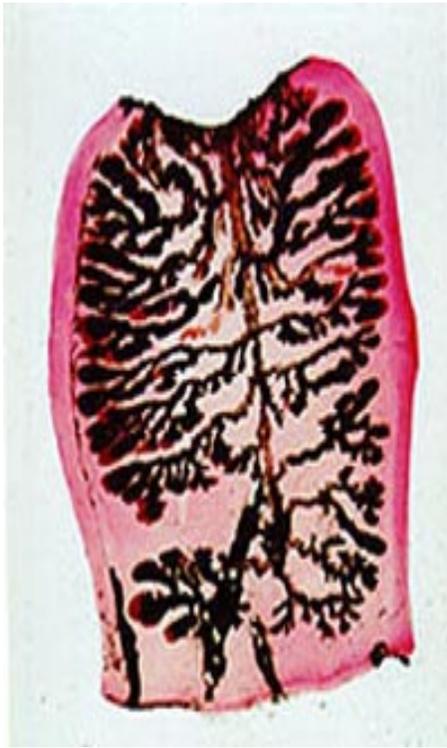


Figura 3 Proglótidos grávidos de *T. solium*



Figura 4 *T. solium* adulto



Figura 5 Huevo de *T. solium*

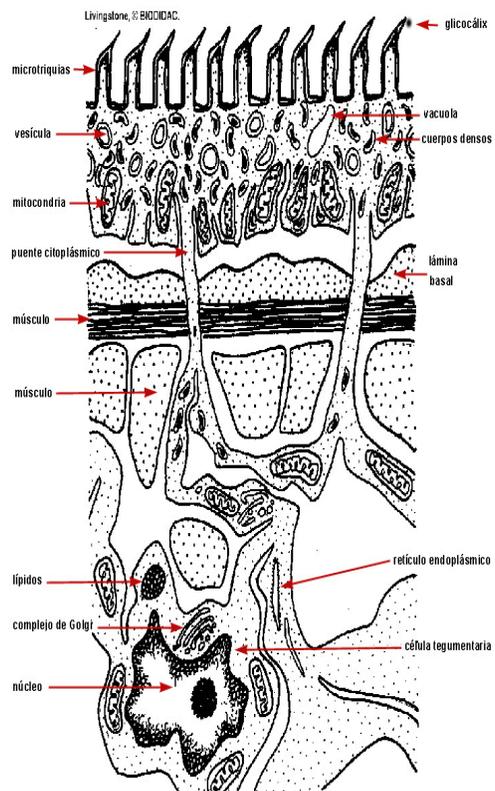


Figura 6 Tegumento de *T. solium*

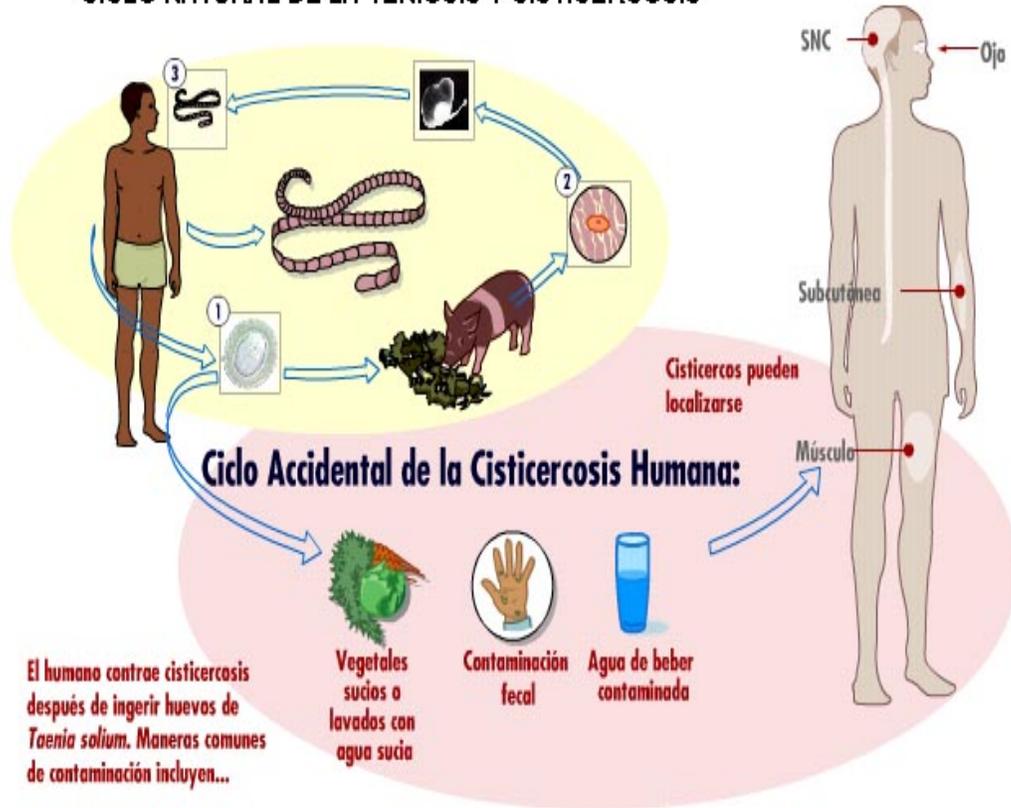
CICLO BIOLÓGICO DE *Taenia solium*.

Su ciclo biológico muestra tres estadios, embrión, larva y adulto y es de tipo paurometábolo, puesto que los adultos con relación a las larvas que salen del huevo, son más grandes, tienen genitales desarrollados y presentan algunas modificaciones en su morfología externa.⁷

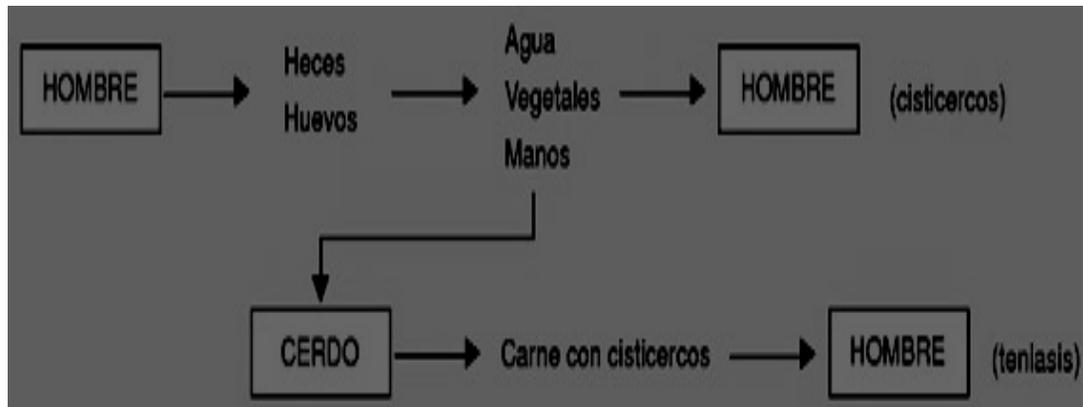
El hombre es el hospedero definitivo del gusano adulto; habitualmente existe un parásito y de ahí el nombre común de solitaria. La *Taenia* puede infectar al humano hasta por 25 años. El hospedero intermediario es el cerdo y desafortunadamente también el hombre.^{12,13,14}

La forma infectante o de transmisión para dar origen al padecimiento teniosis es la carne de cerdo mal cocida con cisticercos, la carne al ser ingerida parcialmente por el hombre llega al estómago, liberándose el cisticerco en el intestino delgado a nivel de yeyuno, donde evagina su escólex adhiriéndose a la mucosa en la pared intestinal con ayuda de sus ventosas y de sus ganchos, para así transformarse en un parásito adulto; después de 5 a 12 semanas comienza a originar huevos, y la cadena estrobilar se encuentra ya completa y con ello liberándose proglótides grávidos o huevos al medio ambiente; los huevos al ser ingeridos por cerdos o humanos pasan al estómago y por acción del jugo gástrico y en el intestino por las sales biliares su embrióforo se rompe y libera el embrión u oncósfera de su cubierta, una vez liberada está atraviesa la pared intestinal para llegar hasta los vasos sanguíneos para viajar por la circulación, siendo llevada a músculo estriado preferentemente, tejido y órganos, en donde de 12 a 15 semanas se transforma en cisticerco (Ver esquemas 1,2).^{7,15}

CICLO NATURAL DE LA TENIOSIS Y CISTICERCOSIS



Esquema 1 Ciclo biológico de *Taenia solium*.

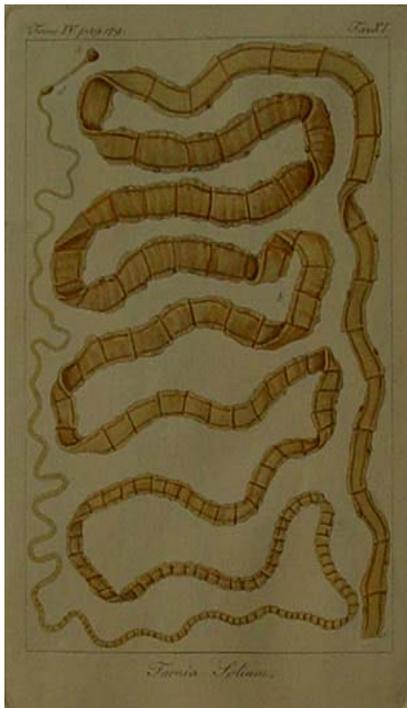


Esquema 2 Muestra el resumen del ciclo de los padecimientos de taeniosis y cisticercosis observándose en los cuadros el hospedero definitivo (hombre) y hospedero intermediario (cerdo).

TENIOSIS.

La teniosis es una infección producida por los helmintos de la familia Taenidae en su fase adulta. Existen dos especies que afectan a los humanos: *Taenia solium* y *Taenia saginata*, mismas que requieren dos hospederos intermediarios (cerdo y res). Es muy importante tener en cuenta que la teniosis por *T. solium* es transmitida por alimentos de ganado porcino, y que la única forma para adquirirla es comer carne con cisticercos mal cocida.

El portador puede permanecer infectado por varios años. Aproximadamente cuatro meses después de la infección la tenia adulta libera diariamente con las heces del portador alrededor de 300 000 huevos con capacidad de infectar a seres humanos y a cerdos causando un grave riesgo al individuo que tiene teniosis por *Taenia solium* ya que por un proceso de autoinfección interna puede adquirir cisticercosis. (Ver figura 7 y 8)



Figuras 7 y 8 *Taenia solium* adulto provoca el padecimiento teniosis solo en su hospedero definitivo el humano al lado derecho se muestran los huevos que provocan la enfermedad cisticercosis tanto en cerdos y humanos estos últimos hospederos accidentales.

➤ **Epidemiología.**

La frecuencia de infecciones de *T. solium* informadas en México provienen de estadísticas oficiales las cuales notificaron alrededor de 13 000 casos anuales en los años de 1986 a 1990, y a partir de 1991 se reportaron alrededor de 8 000 casos anuales de *Taenia sp.* Así mismo las frecuencias más altas para *Taenia sp.* se presentan en el grupo de 5 a 14 años (35.3%), seguido por el de 1 a 4 años de edad, sin diferencias significativas por sexo, en cambio, los estudios epidemiológicos informan que el parásito adulto se presenta en todas las edades y que alcanza su pico en grupos de 16 a 45 años.¹

➤ **Patogenía y manifestaciones clínicas.**

A pesar del gran tamaño de las tenias, desde el punto de vista fisiopatogénico, podemos decir que prácticamente no produce daño, ya que sólo está adherida a la pared intestinal; la irritación que llega a producir en la pared intestinal es prácticamente nula y en realidad lo que está haciendo es robar nutrientes, tomándolos de la luz intestinal antes de que lleguen a la pared y se absorban para utilidad del organismo humano. La clínica de la teniosis es bastante inespecífica y en la mayor parte de los casos pasa inadvertida. Las manifestaciones que llegan a producir son, sensación frecuente de cansancio, así como de somnolencia sensación de incomodidad digestiva por lo que diagnosticarla clínicamente no es posible; los síntomas que pueden atribuirse a la teniosis son dolor abdominal, diarrea y cefalea. Se ha señalado que eventualmente pueden presentarse cuadros de suboclusión intestinal y en forma excepcional colecistitis por penetración del parásito a las vías biliares. También puede, llegar a suceder que cuando un proglótido se introduce en la luz del apéndice, irritando sus paredes se convierte en apendicitis verminiosa.

➤ **Diagnóstico.**

La teniosis generalmente es asintomático, y su diagnóstico se realiza identificando los proglótidos grávidos y escólex en materia fecal, los cuales deben ser observados al microscopio para la identificación de la especie; o bien, por el

análisis de los huevos mediante técnicas coproparasitológicas de sedimentación y flotación, cuya sensibilidad no es mayor de 60%. En etapas tempranas de la enfermedad, es posible la detección de anticuerpos; también se puede recurrir a un ELISA para detección de coproantígenos, con una sensibilidad del 100% y especificidad de 95%, mismo que no distingue especie, aspecto muy importante, ya que el portador de *T. solium* es el principal factor de riesgo en la adquisición de cisticercosis; otra opción es el tamizado de heces el cual consiste en tener tamices o coladeras, con malla de alambre de diferente diámetro, cada tamiz se embona uno sobre otro colocando el tamiz más grueso hasta arriba y el más fino hasta abajo, después se coloca encima la evacuación de 24 horas; el principio de tamizado es que todo objeto mayor al espacio que hay en la malla no pase, los proglótidos de *Taenia* no pasan la malla, como algunos otros helmintos grandes como *Ascaris lumbricoides*, de esta manera aislamos proglótidos de *Taenia* y el último tamiz sirve para aislar el escólex.

Los huevos no son de utilidad para este objetivo, ya que los huevos de *T. solium* y *T. saginata* son indistinguibles. Un método habitual para diferenciar las especies consiste en la tinción de tinta china de proglótidos grávidos a través de la apertura genital lateral para contar las ramas uterinas primarias que en *T. saginata* posee más de 12 y *T. solium* 10 o menos. También se están desarrollando nuevas variantes diagnósticas; entre ellas se encuentran los anticuerpos monoclonales dirigidos a atacar antígenos específicos que puedan diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata*. Se han obtenido secuencias repetidas específicas de ADN para emplearlas en el diagnóstico por hibridación y se ha iniciado el estudio de anticuerpos locales y sistémicos en la teniosis, los que quizá también podrían ser utilizados para el diagnóstico. Estas pruebas diagnósticas aún están en etapa experimental y no se encuentran disponibles en el mercado.^{1, 15,16,17}

➤ **Tratamiento.**

La droga de elección es la niclosamida que actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero. No tiene acción en contra de los huevos ni contra los cisticercos. Se

ha sugerido que el medicamento puede exponer al paciente al riesgo de contraer cisticercosis, pues destruye los proglótidos y libera los huevos dentro de la luz intestinal, por lo que la administración de un laxante una o dos horas después del tratamiento es obligada, así como la disposición adecuada de excretas. El praziquantel es la segunda droga de elección. No se conoce bien su mecanismo de acción; se sugiere que lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva interfiriendo con los canales iónicos principalmente del calcio. Es bien tolerada, tiene una toxicidad baja y mínimos efectos secundarios, con una eficacia del 100%. El albendazol es la tercera droga de elección, sobre todo en menores de cinco años de edad. Es bien tolerada y produce efectos secundarios mínimos y actúa sobre los parásitos adultos y los cisticercos. La ventaja de este medicamento es que no sólo actúa contra la *Taenia sp.*, sino también contra la mayor parte de otros cestodos y nemátodos frecuentes. Su desventaja es que debe administrarse durante tres días consecutivos. En individuos con cisticercosis cerebral esta droga siempre va acompañada con medicamentos supresores de la respuesta inmune. Después del tratamiento para portadores del parásito adulto es indispensable tener la certeza de que se ha resuelto el problema, aislando el escólex por medio de un tamizado usando materia fecal del paciente de las siguientes 48 horas, si el escólex no se aísla, en un par de meses tendremos nuevamente una *Taenia* completa.

En la búsqueda de tratamientos efectivos y su mecanismo de acción, actualmente se están llevando a cabo investigaciones orientadas al estudio de la cinética y los mecanismos intracelulares y moleculares del proceso de evaginación de la tenia; de su adhesión al intestino; del papel del pH y de los iones sodio, calcio y magnesio en el proceso de evaginación y de la longevidad de los huevos en diferentes medios y soluciones.^{1,7,17,18,19}

CISTICERCOSIS.

La cisticercosis es la enfermedad parasitaria producida por la forma larvaria del género *Taenia*, se ha mencionado que la teniosis se adquiere por la ingestión de carne de cerdo con cisticercos y que el hombre es el único hospedero que puede alojar al parásito adulto, de manera que éste es la única fuente de infección que causa la cisticercosis en el hombre y cerdo. Este padecimiento se encuentra en muchos sitios en el mundo, uno de ellos es México. La cisticercosis se desarrolla después de ingerir huevos de *T. solium*, por contaminación de alimentos o bebidas con heces humana; dichos huevos liberan el embrión para llegar a circulación y de ahí distribuirse en cualquier tejido, preferentemente elige 4 localizaciones que son en forma descendente: tejido celular subcutáneo y músculo; sistema nervioso central u ojo, después en cualquier sitio como corazón, hígado, pulmón y cavidad abdominal raramente llegan y se desarrollan en médula espinal.² Al llegar el cisticerco a los tejidos, produce daño, esto depende de acuerdo con el número de cisticercos y al tejido en que se localice. La estructura del cisticerco tiene forma ovoide, una cubierta o envoltura a manera de un saco color blanco nacarado u opalescente, su interior está lleno de líquido transparente, normalmente contiene un escólex, posee una glándula que segrega proteínas y enzimas proteolíticas con las que el parásito se ayuda a formar una cápsula inflamatoria en los órganos mencionados. (Ver figura 9)



Figura 9 Muestra la larva de *T. solium* en su membrana, alojada en músculo de cerdo.

➤ **Estudios epidemiológicos.**

» **Cisticercosis humana**

Los primeros estudios para conocer la frecuencia de neurocisticercosis se realizaron en hospitales y en series de necropsias. En los estudios hospitalarios, México señala que hasta 43.3% de los casos eran asintomático, y 80% fueron hallazgo de autopsia. Actualmente las estadísticas oficiales informan un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100,000 habitantes. No existen diferencias por sexo y el grupo más afectado es el de 15 a 44 años de edad. ^{1,15,18,19,20}

» **Cisticercosis porcina**

Los estudios epidemiológicos de la cisticercosis porcina han mostrado que a mayor edad, mayor tasa de cisticercosis, con un pico máximo a los 11 meses, probablemente como consecuencia de la mayor exposición al parásito, se ha demostrado que a partir de los dos meses ya se encuentran cisticercos en hígado, y de los cuatro a seis meses de edad, en músculo. Se ha encontrado que un mayor número de lechones de dos meses se infecta en la época de sequía cuando hace mucho calor. Este hecho sería útil para planear una campaña de prevención. Se ha demostrado que las pruebas inmunodiagnósticas en suero no detectan enfermedad sino exposición al parásito, por lo que su utilidad en estudios epidemiológicos es trascendental para detectar los focos de transmisión en donde se pueden aplicar las medidas de prevención y control. ^{1,15,18,19,20}

Patogenía y manifestaciones clínicas.

El periodo entre la infección inicial y la aparición de los síntomas es muy variable; éste puede ser de algunos meses o de varios años. El cuadro clínico depende de si la cisticercosis es subcutánea, muscular u ocular. Cuando afecta al SNC las manifestaciones dependen del número, localización y estado evolutivo del parásito; las más comunes son epilepsia de inicio tardío y cefalea. Su localización más común es la subaracnoidea, seguida de la parenquimatosa. Patogénicamente la cisticercosis tiene muchas posibilidades diferentes de daño, desde no producir

daño hasta generar la muerte, un cisticerco en el tejido celular subcutáneo como en tejido muscular no produce ningún problema, se manifiesta sólo porque se siente una tumoración, en general mientras el cisticerco está vivo no hay daño, cuando el cisticerco muere se rompe la cubierta o membrana y se libera todo el material que ahí está contenido; ese material es un inmunógeno muy importante; a consecuencia de la liberación de esos productos viene un proceso inflamatorio intenso que se traduce en sintomatología y más si son demasiados cisticercos, la viabilidad de estos se estima en aproximadamente 5 años, posteriormente mueren y se liberan estos productos; si un sólo cisticerco que está en el parénquima y en un lugar importante para el cerebro, produce una alteración neurológica que se traduce en datos clínicos como paresia, parálisis, movimientos involuntarios, etcétera, o simplemente en cefaleas constantes; o si se localiza un sólo cisticerco en los conductos del tránsito del líquido cefalorraquídeo, mientras el líquido pase no hay problema, pero cuando el cisticerco es mayor que el orificio ocluye a éste y al tapar los agujeros de Luschka o de Magendi, es suficiente para producir un daño terrible y hasta fatal; al obstruir mecánicamente el tránsito de líquido cefalorraquídeo, se presentan otros mecanismos como irritativos o inflamatorios; por esta razón se dice que no se puede hablar de la clínica de la cisticercosis porque no es una sino que pueden ser muy diferentes.^{1,15,18,20,21}

➤ **Diagnóstico.**

» **Cisticercosis humana**

Actualmente el diagnóstico se debe apoyar con estudios de imágenes: la tomografía computarizada (TC), así como la resonancia magnética (RM). Esta última es considerada como la técnica de elección en la práctica clínica, ya que es más sensible que la TC para diagnóstico de neurocisticercosis activa. Desafortunadamente estas técnicas de imagen no son accesibles para la mayor parte de la población que padece la enfermedad; por ello se están desarrollando pruebas diagnósticas, económicas y prácticas, orientadas a la identificación de anticuerpos del cisticerco. La técnica que actualmente ha mostrado mayor sensibilidad (99%) y especificidad (99%) es una basada en la

inmunoelectrotransferencia (IET). Si la prueba es utilizada en líquido cefalorraquídeo existe la certeza de que se trata de neurocisticercosis, pero si se realiza en suero, un resultado positivo no necesariamente indica la enfermedad, sino el contacto con el parásito; por ello se están evaluando ensayos que determinan la presencia de antígeno parasitario para distinguir entre las infecciones activas y las inactivas o la exposición al parásito. En la actualidad se usan 3 clases de antígenos, el antígeno somático completo que consiste en hacer un machacado de cisticercos para obtener las proteínas solubles llamada antígeno somático completo; el antígeno somático incompleto constituye fracciones semipurificadas a partir de antígeno somático completo, una de estas fracciones más efectivas en el diagnóstico es la fracción de glicoproteínas obtenidas por medio de una cromatografía con la lectina de *Lens culinaris*, y el antígeno de secreción/excreción compuesto de las proteínas que el parásito secreta o excreta en medios de cultivo. Cuando es antígeno somático completo y da positivo, nos sugiere que el cisticerco ha muerto y ha liberado los productos antigénicos y se han producido anticuerpos específicos para ésta; cuando solamente tenemos anticuerpos positivos para excreciones y secreciones quiere decir que los cisticercos están vivos, ya que los antígenos que están liberando son productos de su metabolismo, por eso es muy importante saber qué tipo de antígenos estamos usando para hacer la prueba y además que tipo de antígeno se puede usar para valorar si el cisticerco ésta o no vivo; si aumenta el número de anticuerpos en el antígeno completo somático lo más probable es que estén muriendo los cisticercos.

» ***Cisticercosis porcina***

El diagnóstico se puede realizar antemortem (en pie) o posmortem (en la canal). El diagnóstico antemortem se lleva a cabo con un examen visual y con la palpación de la lengua en búsqueda de cisticercos. Con este método sólo puede ser detectado un pequeño número de animales afectados. En el último quinquenio, se han estudiado pruebas diagnósticas como el ELISA y la IET, y se ha encontrado que esta última tiene una sensibilidad y especificidad de hasta 100% . El diagnóstico posmortem se realiza generalmente en rastros, para lo que se hacen

cortes en los músculos y vísceras en búsqueda de cisticercos; aun cuando se realiza la inspección en forma esmerada, algunas infecciones leves llegan a pasar desapercibidas, generalmente cuando hay menos de 10 cisticercos.^{1,15,18,20,21}

➤ **Tratamiento.**

» ***Cisticercosis humana***

El tratamiento de la cisticercosis es difícil desde el punto de vista quirúrgico, este se realiza sólo cuando es accesible quitar los cisticercos sin provocar daño al paciente. En la cisticercosis ocular, éste debe ser quirúrgico y temprano con extirpación limpia de todo el parásito vivo. Cualquier tratamiento que cause la muerte del parásito conduce a la reacción inflamatoria y serias lesiones en el ojo.

Los cisticercos subcutáneos también deben extirparse quirúrgicamente y al abrir la pieza quirúrgica puede identificarse a simple vista la larva. Es recomendable mantener al paciente en observación y llevar a cabo reacciones serológicas cada 4 meses, pues la permanencia de la reacción serológica es índice de que el paciente tiene otros cisticercos además del que se extirpó, y si es positivo en el líquido cefalorraquídeo indica que hay cisticercos en el sistema nervioso central. La cisticercosis del sistema nervioso central puede tratarse con analgésicos sedantes y anticonvulsionantes. En casos graves, la administración de esteroides antiinflamatorios generalmente logra una respuesta favorable, estos son empleados por periodos prolongados. El tratamiento quirúrgico de la cisticercosis del SNC es variable según la localización de los parásitos, cuando el cirujano manipula los parásitos, puede ocasionar cuadros agudos de hipertensión intracraneal postoperatoria que con frecuencia ocasiona la muerte del paciente, por lo que sólo está indicado intervenir directamente para extirpar los parásitos, cuando éstos son focos epileptógenos o están ocluyendo orificios de circulación de líquido cefalorraquídeo. De lo contrario, lo más adecuado es hacer simplemente drenaje de líquido cefalorraquídeo para resolver el problema de hipertensión intracraneal, dejando que con el tiempo se calcifiquen los cisticercos y cese la hipertensión. El medicamento que se usa es el praziquantel medicamento que ha demostrado categóricamente que si funciona en algunas

cisticercosis, dependiendo probablemente del sitio del parásito, y que tan vascularizado está el afectado y que facilidad tenga o no el medicamento de llegar adonde está el cisticerco; por lo que en algunas cisticercosis hay un éxito total, y en otras no. Se están probando algunos otros como el metrifonato, el cual ya se desechó, el fluobendazol, el cual tiene problemas para que atraviese la barrera hematoencefálica y el albendazol que ha demostrado ser tan útil como el praziquantel.

» **Cisticercosis porcina**

El tratamiento de la cisticercosis porcina puede realizarse con drogas como los bencimidazoles como el albendazol o fluobendazol, así como con el praziquantel. Estudios recientes han mostrado que con sólo un día de tratamiento es factible curar esta enfermedad siempre y cuando se permita que la reacción inflamatoria destruya al parásito, lo que sucede en dos meses aproximadamente. En la actualidad, la medida aceptada mundialmente es el decomiso de carne. Se han propuesto otras alternativas de intervención que aún no han sido suficientemente evaluadas, como es el caso de vacunas contra la cisticercosis porcina; como ejemplo de ello se tienen dos antígenos provenientes de una biblioteca de cDNA de *T. crassiceps*, un antígeno recombinante y tres péptidos provenientes de *T. solium*, así como un complejo antigénico a partir de metacéstodos de *T. solium*.^{1,15,18,20,21}

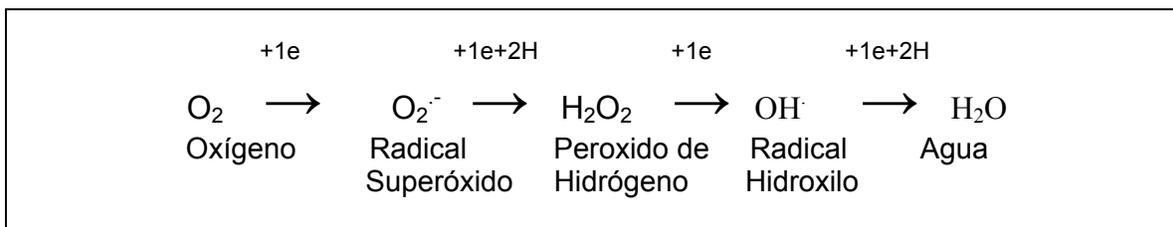
ENZIMAS DESTOXIFICANTES COMO MECANISMO DE DEFENSA DE HELMINTOS.

Como es sabido, varios helmintos permanecen en su hospedero por tiempo indefinido, lo cual logran gracias a la capacidad que tienen de evadir los mecanismos de defensa que presenta el hospedero en contra de ellos; uno de estos mecanismos es la utilización de enzimas antioxidantes que le permiten metabolizar los radicales de oxígeno.²⁴

Los radicales de oxígeno son especies químicas que poseen un electrón desapareado considerados como fragmentos de moléculas generalmente muy reactivas (ejemplo átomo de hidrógeno H·, triclorometilo CCl₃·, superóxido O₂⁻, hidroxilo OH·, peroxilo, alcoxilo RO₂·, RO·, óxidos de nitrógeno NO·, NO₂·).⁵⁶

Los radicales libres se producen de manera normal en el metabolismo aeróbico pero también como respuesta a la presencia de agentes extraños; como por ejemplo en algunas células del proceso inflamatorio al llevar a cabo el fenómeno llamado estallido respiratorio, en el cual se libera radicales de oxígeno después de la fagocitosis; en la membrana citoplásmica de los neutrófilos (macrófagos) al ser estimulada por una partícula extraña; el sistema membranal NADPH oxidasa es activado. El NADPH producido por la vía de las pentosas fosfato, es tomada del citoplasma y oxidado a NADP⁺, con la reducción resultante del oxígeno a radical superóxido ($2O_2 + NADPH \rightarrow O_2 + NADP^+ + O_2^{\cdot-}$), posteriormente este experimenta una dismutación enzimática catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) *in vivo* hacia peróxido de hidrógeno; este no es un radical libre, pero es considerado una especie reactiva de oxígeno. El peróxido de hidrogeno posee una estructura covalente sin carga, se mezcla fácilmente con agua, y es tratada por la célula como una molécula de agua rápidamente difundida por las membranas citoplasmáticas. Una vez dentro, el peróxido de hidrógeno podrá reaccionar con Fe²⁺ y posiblemente Cu⁺, para formar el radical hidroxilo este radical es una de las especies más reactivas conocida hasta el momento, pues puede reaccionar con casi cualquier molécula biológica.

La reacción general de las especies reactivas de oxígeno puede representarse como sigue:



Estas especies reactivas de oxígeno (EROs) son capaces de causar daño a membranas lipídicas, carbohidratos o dañar proteínas y ácidos nucleicos si logran entrar en contacto con ellos. Como ejemplo los hidroperóxidos lipídicos formados por el radical hidroxilo y los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas pueden convertirse en carbonilos citotóxicos, ambas entidades químicas pueden tener efectos adversos más agresivos, sobre las biomoléculas mencionadas.^{24,25,57,58,59,60,61,62,63}

Sin embargo, los organismos poseen un sistema antioxidante que por diversos mecanismos de defensa que comprenden la captura de los productos intermediarios, la prevención de su formación, inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones, limitan los niveles de moléculas reactivas oxidantes permitiendo la homeostasis de los mismos.⁶¹

Un antioxidante se define como aquella sustancia que, presente en bajas concentraciones comparada con los sustratos oxidables retarda o previene significativamente la oxidación de esos sustratos; el sistema de antioxidantes se han clasificado como:

- Primarios: Neutralizan radicales libres o limitan la actividad de los mismos originando moléculas menos perjudiciales, llamadas de tipo enzimático como, Superóxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa, Catalasa.
- Secundarios: Captan radicales libres evitando las reacciones en cadena ejemplo: vitaminas A, E, C, Ácido úrico.
- Terciarios: Degradan, reparan o reemplazan las biomoléculas dañadas ejemplo;
 - » Enzimas reparadoras de lípidos principalmente de membranas como son la fosfolipasa, acetiltransferasa, glutación peroxidasa y la glutación transferas;

- » Enzimas reparadoras de proteínas como proteinasa, proteasa, peptidasa;
- » Enzimas reparadoras de ADN como Exo y endonucleasas, ADNpolimerasa, ADNligasa.^{61,62}

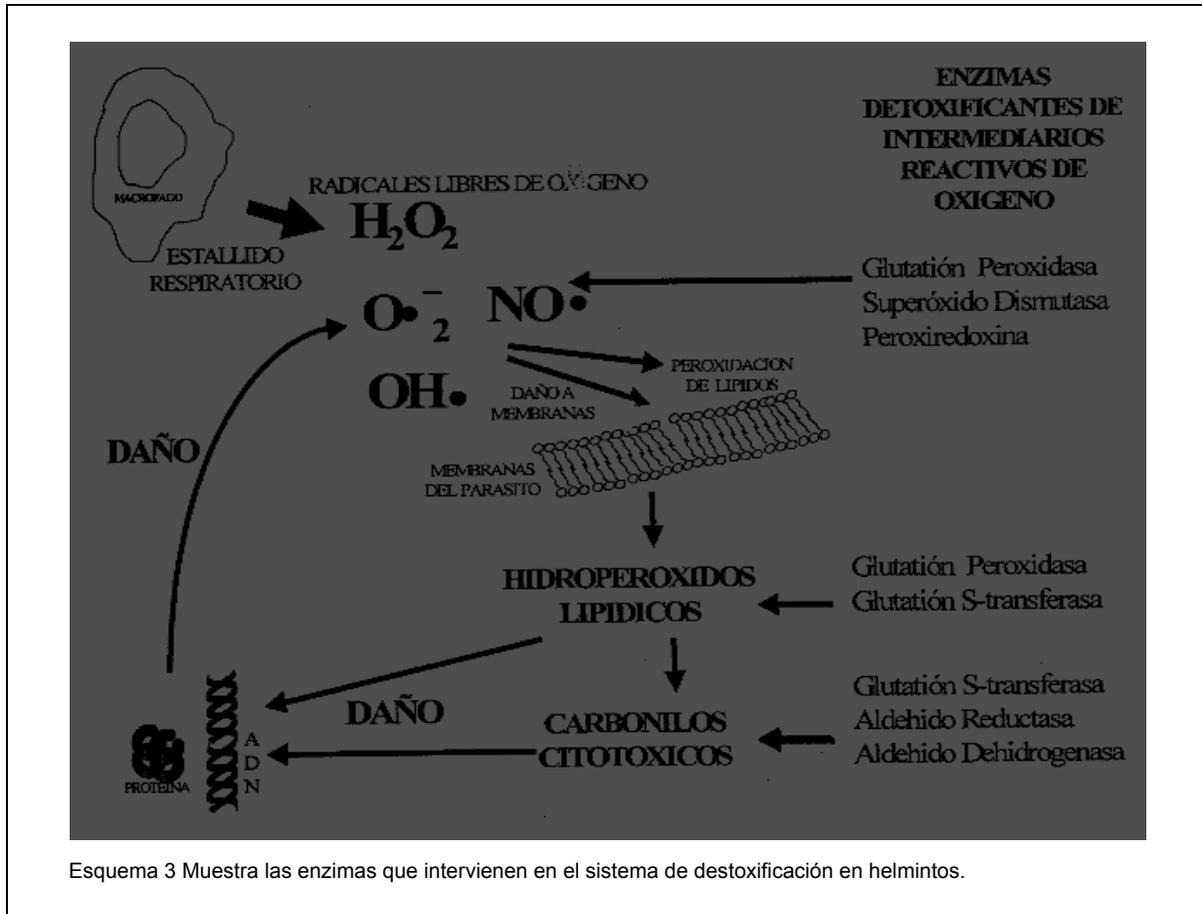
En caso de que el sistema de defensa sea incapaz de contrarrestar la generación de radicales se presenta el estrés oxidativo, el cual se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y el sistema antioxidante, a favor de los primeros.⁶¹

Para los helmintos los ambientes de oxígeno son realmente pobres, sin embargo se encuentran expuestos al estrés oxidativo por los diversos mecanismos de defensa que monta el hospedero en contra de ellos, como es la liberación de EROs por parte de algunas células de inmunidad como ya se señaló (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos).²⁵

A partir de fines de la década pasada se han empezado a caracterizar enzimas de helmintos que están involucradas en la protección del parásito contra radicales libre derivados del metabolismo del oxígeno del hospedero, entre ellas la Superóxido dismutasa, Glutación peroxidasa, Glutación S-transferasa, Glutación reductasa, Peroxirredoxina. Esto con el fin de evaluar su potencial como antígenos efectivos en esquemas de protección.²⁴

Como se observa en el esquema 3, las enzimas parasitarias del sistema de detoxificación de EROs actúan a diferentes niveles, la Superóxido dismutasa (SOD) actúa sobre el radical Superóxido (O_2^-) convirtiéndolo en Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) que es metabolizado por la Glutación peroxidasa (GPx) o por la Peroxirredoxina.

Si se forma hidroperóxidos lipídicos la Glutación S-transferasa (GSTs) y la Glutación peroxidasa forman la segunda línea de defensa, pero si se forman carbonilos citotóxicos entran en juego enzimas del tercer nivel, entre ellas la Glutación S-transferasa, Glutación reductasa y Aldehído reductasa.²⁴



PAPEL DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN LA LIPOPEROXIDACIÓN.

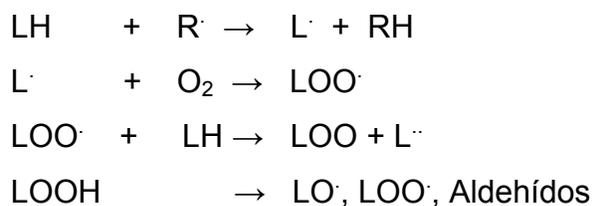
Los parásitos, como los mamíferos y otros organismos, están en contacto con una gran variedad de moléculas tóxicas como radicales o especies reactivas de oxígeno producidas por el metabolismo endógeno normal, por agentes farmacológicas y o elementos efectores de la respuesta inmune del hospedero como el mencionado estallido respiratorio de macrófagos y otras células.²⁴ Estas moléculas pueden causar lipoperoxidación consideradas como una de las reacciones más dañinas de los radicales libres a las moléculas lipídicas ya que estas son probablemente las más susceptibles; los hidroperóxidos lipídicos pueden ser transformados a carbonilos citotóxicos, causando severos daños a los componentes de las estructuras celulares que eventualmente matan al parásito.⁵⁶

En mamíferos, la línea principal de defensa contra estos compuestos es un grupo de enzimas oxidativas, muchas de estas oxidaciones son dependientes del citocromo P-450 y citocromo b₅.²⁴

En platelmintos parásitos y nemátodos, el citocromo P-450 está ausente. La protección ocurre a tres niveles, en el primero, superóxido dismutasa y peroxidasa remueven los radicales libres antes del proceso de lipoperoxidación. La segunda línea de defensa contra la lipoperoxidación es por parte de las enzimas dependientes de Glutati3n, la Glutati3n peroxidasa y la Glutati3n S-transferasa. El nivel final de protecci3n es directamente contra carbonilos citot3xicos y entre otras, la enzima Glutati3n S-transferasa inactiva estos compuestos.²⁸

En helmintos (*Echinococcus multilocularis*, *Moniezia expansa*, *Schistocephalus solidus*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Onchocerca volvulus*) se ha encontrado que la enzima GST, presenta actividad espec3fica con al menos un hidroper3xido lip3dico y un carbonilo citot3xico. Esto indica que las GSTs de helmintos parásitos est3n involucradas en la segunda y tercera l3nea de defensa contra los da3os causados por la lipoperoxidaci3n.^{24,28}

La lipoperoxidaci3n es un proceso que da3a directamente a la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares por la producci3n de aldeh3dos reactivos. Las membranas son fuentes ricas de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son f3cilmente atacados por los radicales libres (radicales oxidantes OH). El proceso general de peroxidaci3n de lípidos es el siguiente:



Donde LH es el ácido graso polinsaturado blanco (objetivo) y R· es el radical oxidante de iniciaci3n, L· es un radical ácido graso y LOO· es un radical ácido

graso peroxil, LOOH son hidroperóxidos lipídicos y LO \cdot es un radical lipídico alcoxil.⁵⁶

Cuando el radical hidroxil (OH \cdot) es formado adyacente a la membrana es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno (H \cdot). A pesar de que el radical OH \cdot es entonces inactivado a un radical ácido graso ha sido formado (L \cdot), el cual después de un nuevo arreglo molecular (dieno conjugado) puede reaccionar con el oxígeno formando el radical ácido graso peroxil (LOO \cdot). Los radicales peroxil son los transportadores de la reacción en cadena, y pueden oxidar otra moléculas de ácidos grasos poliinsaturados e iniciar nuevas cadenas produciendo hidroperóxidos lipídicos (LOOH) los cuales pueden formar peróxidos cíclicos y pueden fragmentarse en presencia de iones metálicos de transición o en reacciones análogas con H₂O₂ y producir así mas radicales lipídicos (peroxil y alcoxil) especialmente aldehídos, en ausencia de iones metálicos los aldehídos como el malondialdehído (MDA) puede provocar daño en el ADN.^{56,62,63}

Los aldehídos generalmente se forman cuando los hidroperóxidos lipídicos son fragmentados y muchos de ellos son biológicamente activos, particularmente una clase conocida como hidroxialquenos, el compuesto más común es el 4-hidroxinonenal. La acumulación de hidroperóxidos lipídicas en las membranas desorganiza su función y puede provocar un colapso; los radicales peroxil y los aldehídos citotóxicos pueden causar un severo daño a las proteínas de la membrana, inactivando receptores y enzimas ligadas a la membrana.⁵⁶ Así mismo una extensa peroxidación de lípidos tiene mayor implicación sobre las membranas celulares causando pérdida de la fluidez, caída del potencial de membrana, incremento en la permeabilidad de H⁺ y otros iones y la eventual ruptura de la membrana que lleva a la liberación de contenido celular, y por consecuencia a muerte de la célula.⁶²

GENERALIDADES DE LA GLUTATIÓN S –TRANSFERASA (GSTs).

Las glutatión S-transferasas (GSTs; EC 2.5.1.18)) son una superfamilia de enzimas multifuncionales, que promueve la inactivación, degradación y excreción de una amplia diversidad de xenobióticos (mutágenos, carcinógenos, medicamentos así como endobióticos derivados del metabolismo basal y/o de la respuesta inmune), de origen endógeno o exógeno de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular.^{22, 25}

Las GSTs catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre de la cisteína de Glutatión reducido ó GSH (γ -Glu-Cys-Gly) sobre centros electrófilicos de compuestos orgánicos hidrofóbicos que pueden ser proveídos de un átomo de carbono, nitrógeno o azufre. Estos conjugados se hacen más solubles, facilitándose su eliminación de las células. Dicho ataque también es facilitado por la ionización del GSH (disociación de sus protones por la enzima) a su forma de tiolato. El grupo tiol del GSH cuando está unido a la enzima, tiene un pKa de 6.3, en contraste con el pKa de 9.2 del GSH en solución, indicando que el GSH unido a la enzima está altamente ionizado.^{22,26}

La reacción general que cataliza la enzima GST es la siguiente:



La función de la enzima es primero unir al substrato hacia el Glutatión (GSH) ya unido se activa el sitio de la proteína, y se activa el grupo sulfidril del GSH, por lo que sigue un ataque nucleofílico de GSH sobre el substrato electrofílico (RX).^{64,65,66}

Algunos de los substratos para las GSTs son: el carcinógeno epoxido de benzopyrina (BPDE), 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) considerado el sustrato universal de las GSTs, 1,2-dicloro-4-nitrobenzoceno (DCNB), 4-hidroxinon-2-enal (HNE).^{24,64}

El Glutatión al poseer un papel importante en la defensa antioxidante se encuentra en abundancia en las células en cantidades de 1-5mM. Existen diversas

condiciones por lo que la cantidad de GSH en la célula decae, por ejemplo, la presencia de metales pesados, concentraciones altas de glucosa presencia de EROs. Entre las enzimas que utiliza GSH como cofactor se encuentran no solo GST sino también Glutati6n Peroxidasa y Glutarredoxinas.²⁵

Las GSTs se han clasificaci6n en funci6n de su reactividad inmunol6gica, tipo de estructura primaria, afinidad por sustratos, secuencias de amino6cidos, localizaci6n cromosomal, sensibilidad a diversos inhibidores y estructura terciaria. Con esta informaci6n se han dividido en las clases: Alfa, Beta, Kappa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta y Zeta (Ver figura 10).^{22,24,66}

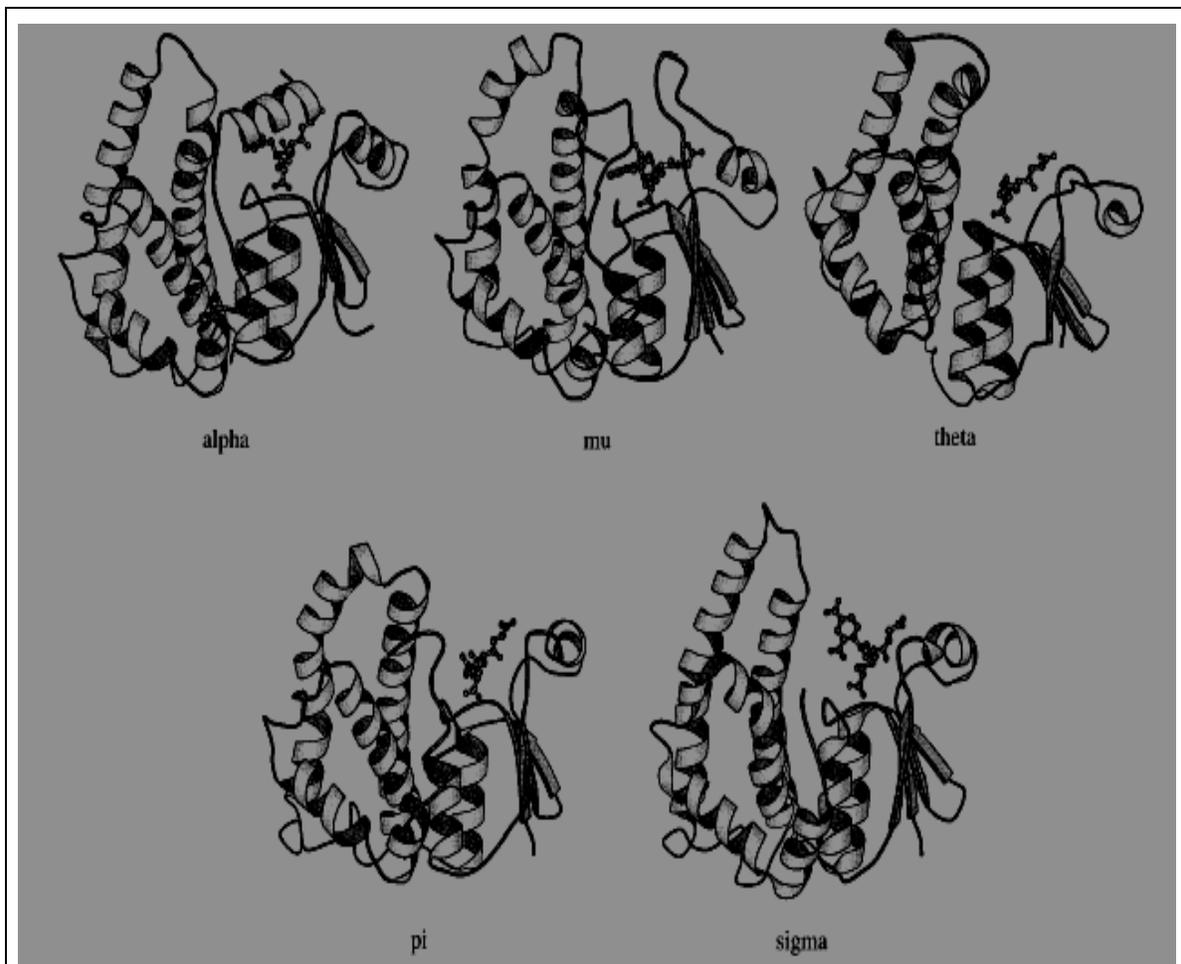


Figura 10 Diagrama en cinta de la estructura tridimensional de las clases alfa, mu, teta, pi y sigma de glutati6n transferasa formando complejo con Glutati6n reducido (GSH) y los sustratos *S*-benzylglutathione, (9*S*,10*S*)-9-(*S*-glutathionyl)-10-hydroxy-9,10-dihydrophenanthrene, *S*-hexylglutathione, glutathione sulfonate, y 1-(*S*-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzene, respectivamente.

Las Glutación S-transferasas se encuentran en los organismos eucariontes, desde protistas hasta plantas y animales. Se localizan principalmente en dos áreas, las membranas y el citosol, siendo las GST citosólicas más abundantes que las microsomales.^{25,26}

Una característica importante de la superfamilia de las GSTs es la existencia de distintas formas con diferente peso molecular y dentro de ellas pueden existir isoformas, las cuales poseen el mismo peso molecular pero presentan diferencias en su estructura primaria y como consecuencia, diferencias en sus estructuras secundarias y terciaria.²⁴

La estructura molecular de las GSTs se presentan como homodimeros o heterodimero. Cada subunidad cuenta con dos dominios. El dominio 1 amino terminal (1-80 residuos). Este dominio es muy conservado, en el se encuentra el sito de unión para GSH ("sito G") y se conecta con el dominio 2 por una pequeña secuencia de unión (Ver figura 11) .

El dominio 2 (del residuo 87 al 210) empieza en el carboxilo terminal de la secuencia de unión y consiste de cinco α -hélices en el caso de las clases Pi y Mu, y seis α -hélices en el caso de la clase Alfa; el número de hélices en el dominio 2 varía dependiendo de la clase de GST. El dominio en el carboxilo terminal es poco similar entre las tres clases de mamíferos a comparación de el dominio amino terminal. La diferencia en el dominio carboxilo terminal puede ser el responsable de los diferentes substratos específicos entre las tres clases.^{22,65}

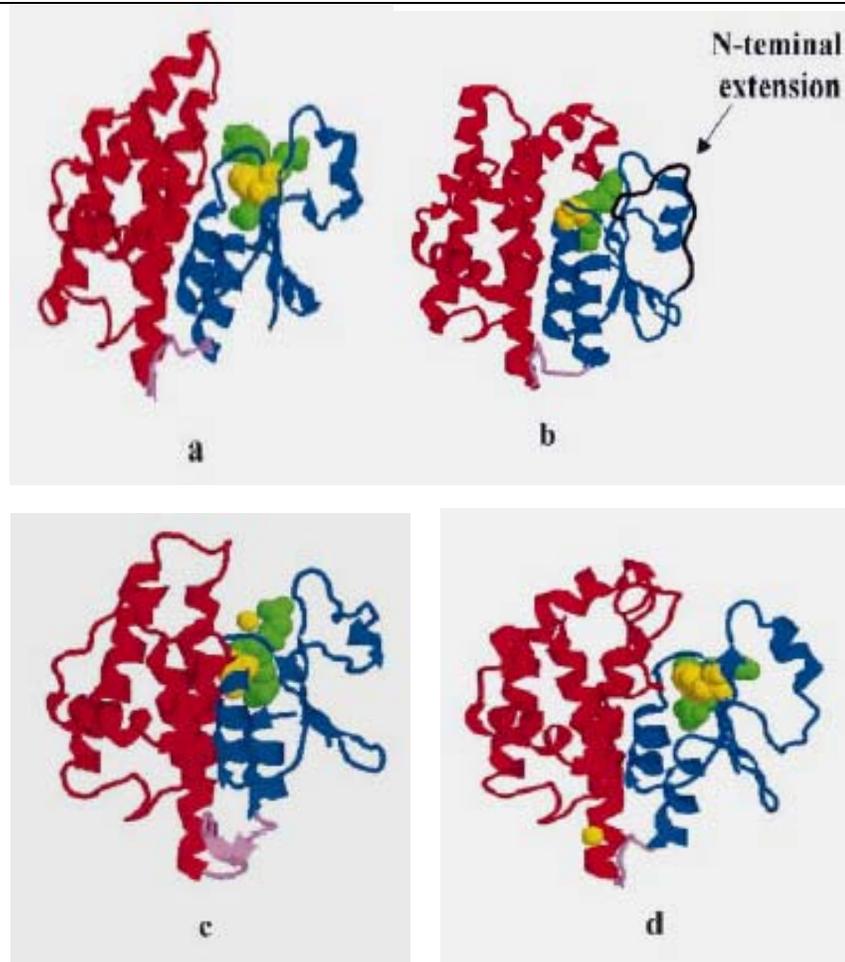


Figura 11 Estructura tridimensional individual de las subunidades de GST, mostrando el dominio 1 amino terminal (N-terminal) en color azul y el dominio 2 carboxilo terminal en color rojo. Los residuos catalíticamente esenciales (tirosina en a y d; cisteína en b y c) se observan de color amarillo presentando la unión con el cual la proteína fue co-cristalizada se muestra en verde. Los dos dominios unidos por una pequeña secuencia de unión se muestra en violeta. En el esquema (a) muestra la clase Sigma del calamar, (b) la clase Omega de humano, (c) clase Beta bacteriana (*Proteus mirabilis*), (d) clase Mu *Fasciola hepatica*.

<http://www.BiochemJ.org/bj/360/bj3600001add.htm>

NOMENCLATURA DE GSTs.

La nomenclatura para identificar cada GST de otras especies es la siguiente:

se coloca la primera letra de la especie precedido por "GST" (h para humano, r para rata, etc), después con letras mayúsculas se denota la clase (A, M, P, K, T o S para alfa, mu, pi, kapa, teta o sigma), posteriormente con números arábigos se designa las subunidades o subfamilias (1,2,3...) finalmente con un guión y con letras minúsculas se designa las variantes alelicas de los genes (a, b, c...).

las enzimas GST funcionales existen como proteínas dimericas, y solamente las subunidades de la misma clase pueden formar heterodímeros (ejemplo; la subunidad alfa puede dimerizarse con otra subunidad tipo alfa, pero no con la subunidad mu o pi).

Ejemplo: hGSTM1a-1a; se refiere a una proteína homodimérica en donde ambas subunidades tienen específicamente variante alelica "a" de los humanos, y es una proteína de clase mu y con una subfamilia 1 otro ejemplo es: rGSTA1-2 se refiere a una rata heterodimérica de clase alfa compuesta de una subunidad de clase alfa y una subfamilia (1) y una subunidad de clase alfa de subfamilia 2.^{64,65,66}

Las GSTs nativas se han logrado obtener a homogeneidad por métodos bioquímicos de purificación como fraccionamiento salino, cromatografías de intercambio iónico, filtraciones en geles y cromatofoco, además, como muchas isoenzimas de GSTs se unen a derivados de glutatión inmovilizados en resinas inertes, entonces pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad. Las matrices de afinidad más comunes son la S-hexylglutathione sefarosa y Glutatión sefarosa.^{22,27} (Ver figura 12)

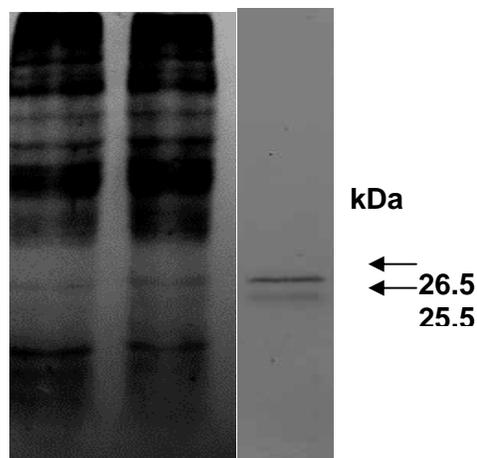


Figura 12 Gel de poliacrilamida mostrando las fracciones de GST de *Taenia solium* purificada con GSH-SEFAROSA

PRESENCIA DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN DIVERSOS ORGANISMOS.⁶⁵

En mamíferos se han descrito cuatro clases de GSTs solubles las cuales se ordenaron como: Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Theta (θ), pero el avance en los conocimientos permitió reconocer la existencia de Zeta (ζ), Omega (ω) Sigma (δ) y Kappa (κ), las cuatro primeras son citosólicas.^{2,25,29} Se considera que al menos 20 enzimas GST se encuentran en el hombre. Para la GST alfa, cinco genes diferentes codifican las formas A1, A2, A3, A4 y A5. A1 y A2 se expresan principalmente en el hígado. La clase mu (GSTM) también se expresa en el hígado. Además de las formas hepáticas, se han identificado subunidades M2, M3, M4 y M5 que se expresan en tejidos extrahepáticos. La clase Pi (GSTP) se expresa en varios tejidos extrahepáticos. La clase Teta (GSTT) presenta dos productos génicos expresados en el hígado.² Pueden detoxificar los derivados de compuestos tóxicos exógenos (xenobióticos) y endógenos (endobióticos), incluyendo los mutágenos, carcinógenos y otras sustancias químicas nocivas. En plantas las GST se describieron como Phi (ϕ), Tau (τ) en insectos se detallo la clase Delta (δ) y en bacterias la clase Beta (β). Los pesos moleculares de las subunidades de GSTs solubles en mamíferos varían entre 23 y 26 kDa; también se ha descrito una forma soluble de 13 kDa en hígado de rata.²³

PRESENCIA Y LOCALIZACION DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN HELMINTOS.⁶⁵

En helmintos no hay una clasificación establecida de la GSTs, por lo que, cuando se caracteriza bioquímica o genéticamente una forma de GST de parásitos es practica común tratar de asignarle una clase de GSTs de mamíferos.²⁴ No obstante a varias GST de diversas especies tienen mucha semejanza y pueden agruparse dentro de una misma clase. Por ejemplo, aunque la clase Theta se ubique dentro de la clasificación de insectos (como *L. cuprina*) o plantas (*A. thaliana*) poseen GSTs que comparten las características de la clase Theta de mamíferos y por lo tanto han sido clasificadas como tal.²⁵ En el mismo sentido una

GST recombinante purificada del céstodo *Echinococcus multilocularis* muestra clara homología en su secuencia con la clase mu.^{24,28}

Los helmintos tienen un sistema enzimático de detoxificación limitado. En diversas especies estudiadas no se ha encontrado el complejo citocromo P-450, y en algunas de ellas no se detecta la catalasa. Pese a ello, normalmente cuentan con alguno(s) de los sistemas detoxificantes encargados de controlar los primeros ataques producidos por la explosión reactiva (ER) o el metabolismo oxidativo. Por lo que varios autores postulan que GST es el principal sistema de detoxificación en helmintos ya que tienen un potencial para neutralizar los derivados de las toxinas exógenas como los antihelmínticos. Por ejemplo el metrifonato, el cuál se ha demostrado que es metabolizado por una GST de *S. masoni*. Se propone que la GST puede ser secretada por el organismo; algunos ejemplos son: en *Schistosoma mansoni* GSTs de 28 kDa son exportadas a la superficie del parásito y se sugiere que su síntesis se realiza en tegumento en células protonefridiales, en *Fasciola hepática*, la GST está asociada a la lámina del epitelio intestinal, el parénquima, el tegumento y el tejido muscular, en el céstodo *Echinococcus granulosus*, la GST de 24 kDa está presente en el parénquima, *Taenia solium* la GST está en tegumento, sistema protonefridiales y dispersa en la parénquima de la pared del metacéstodo. Como las GSTs de mamíferos las GSTs de helmintos se clasifican en 3 superfamilias; la primera incluye a las GSTs de 28 kDa de *Schistosoma*; la segunda comprende GSTs de 26 kDa de *Schistosoma*, *Fasciola hepática* 26/26.5, *Moniezia expansa* y *Schistocephalus solidus* y la tercera superfamilia incluye a GSTs expresadas por nematodos parásitos.^{22,23}

En *T. solium* se han caracterizado dos GST una de clase mu de 25.5 kDa con una secuencia N-terminal: MAPTLAYWD y la otra GST de 26.5 kDa, con la secuencia N-terminal es MNKYKFAYWN. Tales datos sugieren la presencia de dos GST distintas. Además se demuestra que la GST de 26.5 kDa es más abundante que la GST de 25.5 kDa.^{27,30}

Las GST representan en *T. solium*, el 3-4% de la proteína soluble total, indicando su alto nivel de expresión y lo necesario que es para la célula en el proceso de detoxificación.²⁵

GENES DE GSTs.

Todos los genes de las clases Alfa de GST caracterizado en el ADN genómico tienen aproximadamente 11-12 kb de largo y están compuestos de siete exones. los genes para hGSTA1 y A2 se localizan en el cromosoma 6p12, los genes aislados para la clase Mu de ratas, ratones y humanos contienen aproximadamente 5 kb de largo y en humanos se encuentran en el cromosoma 1p13.3. La GST de clase Pi aparece contenido únicamente en 1 o 2 genes distintos en la mayoría de las especies. En humanos, GSTP1 se localiza en el cromosoma 11q13, con cuatro variantes alelicas.⁶⁴

CONCLUSIÓN.

- Se obtuvo la región estructural del gen para la enzima Glutación S-Transferasa de 25.5 kDa de *T. solium*.
- El cestodo *T. solium* al igual que los organismos eucariontes, presenta genes que están conformados por secuencias codificantes (exones), secuencias no codificantes (intrones) y presentan la región donador/aceptor para el corte y empalme clásica de los mismos (5´ - GT...AG - 3´).
- La región estructural del gen para la Glutación S-Transferasa consta de 6 exones y 5 intrones.
- La región estructural está organizado en 6 exones que corresponden a un RNAm de 657pb y codifican para una proteína de 219 aminoácidos.
- La secuencia de la región estructural del gen consta de 1201 bases nucleotídicas.
- El gen para la GST de 25.5 kDa es de copia única en el genoma del parásito.

ANEXO.

SOLUCIÓN DE LISIS: 0.1M EDTA, 0.05M TRIS-HCL, pH 8.0, 0.5% sarcosil.

RNAasa 10 mg/ml

Proteínasa K 25 mg/ml

SOLUCIÓN 1: 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25mM TRIS, pH 8.0

SOLUCIÓN 2: 0.2M NaOH y 1% SDS (Para 5 ml: 4.4 ml de agua, 100 μ L de NaOH 10N y 0.5 μ L de SDS 10%)

SOLUCIÓN 3. NH₄Ac 7.5M

BIBLIOGRAFIA.

1. <http://www.insp.mx/salud/39/393-9.html>
2. <http://www.sedet.es/sedet/pdf/prevOncologiatxt.pdf>
<http://search.netscape.com/ns/boomframe.pdf>
3. <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>
4. Emilia Ortiz Salmerón, Mario Lo Bello y Luis García Fuentes. Glutación S-Transferasa P1-1 humana y Glutación Reducido, Estudio Termodinámico de su Interacción. España: Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería.
5. <http://search.netscape.com/ns/boomframe.jsp?.htm>
6. N. Vibanco-Pérez. L. Jiménez. G. Mendoza-Hernández. A. Landa. Characterization of a recombinant mu-class glutación S-transferasa from *Taenia solium*. January. Parasitol Res. (2002) 88:398-404
7. Gallegos Román José Alberto. Obtención de Preparaciones Semipermanentes de Parasitos Intestinales Para Crear la Coproteca de la Clínica Multidisciplinaria Los Reyes de la F.E.S. Zaragoza UNAM. México: 2004: 40-46, 50-56
9. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/cestodos/img/cestodBIO.jpg>
10. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/cestodos/img/tegunentoBIODIDAC.jpg>
11. Carroll Faust Ernest, Farr Rusell Paul. Parasitología Clínica. México: Editorial Salvat Editores, 1987:530-536
12. <http://www.sciencedirect.com/science?>
13. Sarti Elsa. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. México: Rev. Salud Pública de México, (1997) 39:225-231
<http://www.insp.mx/salud/39/393-9.html>
14. López Moreno S. Héctor. Cestodiasis tisulares: Participación de los linfocitos cooperadores 1 y 2. Revisión. http://www.insp.mx/salud/44/442_10.pdf
15. Cabello Romero Raúl. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 2ª edición. México: Editorial Medica Panamericana S.A de C.V., 2000: 685-691

16. Jiménez Pierre Cesar Octavio. Frecuencia de Parasitosis Intestinal en niños de una escuela primaria de la Colonia Guadalupe del Moral en Iztapalapa. México: F.E.S Zaragoza, 1990:1,2
17. A. Pumarola. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª edición. Editorial Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. de C.V., Salvat, 1994: 805.
18. Biagi Francisco. Enfermedades Parasitarias. 2ª edición. México: Editorial La prensa Médica Mexicana, 1986: 199-211
19. W. Koneman Elmer, Stephen D. Allen, William M. Tanda. Diagnostico Microbiológico. Texto y atlas a color. 5 ta edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana, 1999: 1075-1078
20. Wolfgang K. Joklik. Zinsser. Microbiología. 20a edición. México: Editorial Medica Panamericana, 1998: 1603-1604
21. Henry Bernard John. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. México: Editorial Salvat Editores, 1994: 1195.
22. Plancarte Crespo Agustín, M.C. Purificación y Caracterización bioquímica de la Glutación S-transferasa de 26.5 kDa de *Taenia solium*. México: Postgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de ciencias, 2004: 20-30
23. Díaz Vilchis Adelaida. Purificación y Caracterización parcial de la enzima Glutación S-transferasa de *Taenia solium*. México: Facultad de ciencias, 1997: 8-12
- 24 Norberto Vibanco. La enzima glutación s-transferasa de *Taenia solium* su caracterización y evaluación en protección. México: Doctorado en ciencias C.U.; Biomedicas entidad Facultad de Medicina, 2000: 13-21
- 25 Torres Rivera Anayetzin. Aislamiento y Caracterización del ADNc que codifica para la isoforma de la Glutación S-Transferasa de 26.5kDa de *Taenia solium*. México: Facultad de Química, 2004: 23-28
- 26 Wilhelm Hansberg Torres. Biología de las especies de oxígeno reactivas. México: Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 2002: 26-33
<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>
- 27 Vibanco-Pérez Norberto, Jiménez L., Landa Piedra A. Characterization of glutathione S-Transferase of *Taenia solium*. January of Parasitol, (1999) 85(3): 448-453
- 28 Vibanco-Pérez Norberto, Landa Piedra A. Glutathione S-Transferase in helminth parasites. Revista Latinoamericana de Microbiología, (1998) 40 (3 y 4): 73-85

29 T. Herbert Manoharan, Andrew M. Gulied[†], Ralph B. Puchalski, Amy L. Servais, and William E. Fahl. Structural Studies on Human Glutathione S-Transferase π . *The Journal of Biological Chemistry*, (1999) Vol 265, No. 26: 18940-18945

30 Vibanco-Pérez Norberto, Jiménez L., G. Mendoza-Hernández, A. Landa. Characterization of a recombinant mu-cass glutathione S-transferase from *Taenia solium*. January. *Parasitol Res.* (2002) 88:398-404

31 "Transcripción." *Enciclopedia® Microsoft® Encarta 2001*. ©1993-2000 Microsoft Corporation.

32 <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp41.htm>

33 <http://es.wikipedia.org/wiki/Gen>

34 "Gen." *Enciclopedia® Microsoft® Encarta 2001*. ©1993-2000 Microsoft Corporation.

35 http://es.wikipedia.org/wiki/Gen#Tipos_de_genes

36 "Gen," *Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2004*
<http://es.encarta.msn.com>

37 Eldon John Gardner, Michael J. Simmons, D. Peter Snustad. *Principios de Genética*. 4ta. Edición. México: Limusa Wiley, 2000:358-386

38 Luque Cabrera José, Ángel Herráez Sánchez. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid-España: Editorial Haracourt, 2001

39 "Genética." *Enciclopedia® Microsoft® Encarta 2001*.

40 "Biología molecular." *Enciclopedia® Microsoft® Encarta 2001*.

41 Tecnología del ADN recombinante II.mht

42 "Clonación de genes." *Enciclopedia® Microsoft® Encarta 2001*

43 <http://wwweducaciónmedica.com.mx/>

Dr. Scope. 12 CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA CARDIOVASCULAR. Copyright © 2003. Derechos Reservados. Diseño y Programación: [Educación Médica Continua](#)

44. Panderó Arturo. *Biología Molecular*. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000

- 45 Robet H. Tamarin. Principios de Genetica. 4ta edición. Barcelona: Editorial Reverte,1996:262-271,325-329
- 46 Eberhard Passarge. Genética Texto y Atlas. 2da edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana, 2004
- 47 Lewin Benjamín. Genes VII. septima edición. España: Editorial Marbán, 2001
- 48 Balbas Paulina y Lorente Argelia. La Biosíntesis de la Proteínas por DNA recombinante. Mexico: Editorial Editores, 2000: Cap. 6 183-195
- 49 Maxine Singer, Paul Berg. Genes y Genomas. Barcelona-España: ediciones Omega, 1993:20-34
- 50 Dr Lothar Träger. Lo esencial de la biología Molecular. España: ediciones Manual Moderno, 1973
- 51 J.M. Walter. E. B. Gringold. Biología Molecular y Biotecnología. Zaragoza-España: Editorial Acriba, 1988
- 52 Balbas Paulina. De La Biología Molecuar a la Biotecnología. México: Editorial Trillas, 2002:83-111, 170-221
- 53 Alcamo Edward I. DNA Technology. 2ª edición. New York, U.S.A: Editorial Harcourt, 2001:22-25, 56-66, 157-159
- 54 P.C Winter and G. I. Hickey & H. L. Fletcher. Instant Notes in Genetics. New York: Scientific Publishers Springer, 1998: 6-20
- 55 Dr. Prakash Chandra, Dr. Walter Appel, Dr. TH. Wieland. Metodos de Biología Molécular. Para bioquimicos, médicos, veterinarios y biólogos. Zaragoza-España: Editorial Acriba
- 56 Arellano Pimentel Beatriz Elena. Niveles de antioxidantes totales en relación con el proceso de osteoporosis en una población gerontológica. México: F.E.S Zaragoza, 2001: 38-52
- 57 Dr. Bellanti A. Joseph. Inmunología. 3ª edición. México: editorial Interamericana,1986:18-28, 231-240, 282-286, 339-344
- 58 Horton H. Robert. Bioquímica. México: editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, 1995: 15.25-15.27
- 59 Rojas-Espinosa Óscar. Inmunología (de memoria). 2ª edición. México: editorial Medica Panamericana, 2001: 23-28, 320-333

60 Abbas K. Abul, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober. Inmunología celular y molecular. 4ª edición. Madrid-España: McGraw-Hill Interamericana, 2002: 268,292-294,320,367-370, 497, 520

61 Rosado Pérez Juana. Influencia del envejecimiento sobre el estrés oxidativo y el proceso de inflamación crónica en pacientes con diabetes mellitas tipo II. México: F.E.S Zaragoza UNAM, 2004: 12-15

62 González Flores Nelly. Relación de los niveles de antioxidantes totales, Superóxido dismutasa y Glutathión peroxidasa con el estado de salud de una población de ancianos. México: F.E.S Zaragoza UNAM, 2003: 5-40

63 Beristain Pérez Sarai Ada. Influencia del lugar de residencia sobre el estrés oxidativo en una población de adultos mayores. México: F.E.S Zaragoza UNAM, 2004: 9-19

64 Eaton L. David, Bammler K. Theo. Concise Review of the Glutathione S-Transferases and their Significance to Toxicology. Toxicological Sciences, (1999) 49:156-164

65 Sheehan David. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. (2001) 360:1-16

66 Armstrong N. Richard. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. Res. Toxicology. (1997) 10:2-18