



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

**CARACTERIZACIÓN DEL ADN
COMPLEMENTARIO QUE CODIFICA PARA
UNA TIORREDOXINA (TRX) CITÓSOLICA DE**

Taenia solium

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ESTEBAN OMAR GUZMÁN RUIZ



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ABEL GUTIERREZ RAMOS

VOCAL: Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

SECRETARIO: Profesor: ABRAHAM LANDA PIEDRA

1er. SUPLENTE: Profesor: JOSE CORDERO HERNANDEZ

2° SUPLENTE: Profesor: FELIPE VACA PANIAGUA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LAB. BIOLOGÍA MOLECULAR
DE *Taenia solium* FACULTAD DE MEDICINA. UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ESTEBAN OMAR GUZMÁN RUIZ
(nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por dejarme terminar mis estudios, permitiéndome seguir creciendo como persona, mejorando mi proyección al éxito tanto en la vida, como en mi desarrollo profesional.

Agradezco a esta gran institución universitaria, tanto como a mi facultad por la educación y amistades que logre acoger dentro y fuera de las aulas. Aprendiendo de ellas valores y conceptos dignos de compartir con los que me rodean.

A mi familia que me acompaña a cada momento, mi Papá Lorenzo Guzmán, mi Mamá Guadalupe Ruiz, mis hermanos Adriana y Luis. “Gracias de todo corazón”

Agradezco el apoyo de todo el laboratorio de Biología molecular de *Taenia solium*, en la elaboración de esta tesis, por su apoyo y paciencia al instruirme en la metodología, sobre todo al Dr. Abraham en dejarme participar en su proyecto, que este rinda grandes frutos en el futuro. A Víctor, Felipe, Ricardo, Oscar, Vera, Alicia y Lucia por apoyarme y asesorarme en este trabajo. Pase buenos tiempos en el laboratorio.

A Elda por apoyarme en toda mi carrera, alentándome a echarle ganas y acompañarme en toda esta trayectoria de logros, gracias por estar a mi lado.

Por último pero no menos importantes a mis amigos José Luis, Raúl, Gonzalo, Vicky y Mauricio por darme esos buenos consejos para que culminara este pasó en mi vida.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE GENERAL	4
INDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 TAENIA SOLIUM	11
2.1.1 GENERALIDADES DEL PARÁSITO	11
2.1.2 MORFOLOGÍA	11
• GUSANO ADULTO	11
• CISTICERCO	13
2.1.3 CICLO DE VIDA	13
2.2 CUADRO CLÍNICO	14
2.2.1 TAENIOSIS	14
2.2.2 CISTICERCOSIS	15
2.3 DIAGNOSTICO	15
2.3.1 TAENIOSIS	15
2.3.2 CISTICERCOSIS	16
2.4 TRATAMIENTO	17
2.5 MECANISMOS DE EVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	18
3. ESTRÉS OXIDANTE	19
3.1 ESPECIES REACTIVAS Y RADICAL LIBRE	19
3.2 ANTIOXIDANTES	21
3.2.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	21
3.2.2 ANTIOXIDANTES NO-ENZIMÁTICOS	22
4. LAS TIORREDOXINAS	22
4.1 ESTRUCTURA	24
4.2 ISOFORMAS DE LA Trx	26
5. HIPOTESIS	27
6. OBJETIVO	27
7. MATERIAL Y MÉTODOS	28
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO	28
7.2 REACTIVOS	28
7.3 OBTENCIÓN DE LA SONDA	29
7.4 PCR	29

7.5 MARCAJE RADIOACTIVO	30
7.6 TAMIZAJE PARA EL AISLAMIENTO DE CLONAS.....	30
7.7 PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE FAGOS	31
7.8 LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	32
7.9 PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	32
7.10 SECUENCIACIÓN	33
7.11 SOUTHERN BLOT	34
8. RESULTADOS	35
9. DISCUSIÓN.....	40
10.CONCLUSIÓN	43
11.BIBLIOGRAFIA.....	46
ANEXO I (SOLUCIONES).....	44
ANEXO II (ENZIMAS DE RESTRICCIÓN)	45
ANEXO III (COMPARACION ESTRUCTURAL DE TrxTs VS TrxEc)	45
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Morfología de <i>T. solium</i>	12
Figura 2. Huevo de <i>T. solium</i>	12
Figura 3. Cisticerco	13
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	14
Figura 5. Especies reactivas de oxígeno.....	20
Figura 6. Sistema de reducción TrxR/NADPH	23
Figura 7. Estructura tridimensional de Trx oxidada.....	25
Figura 8. Mecanismo de reducción de proteínas con Trx.....	25
Figura 9 Sonda Trx.	35
Figura 10 Tamizaje.	36
Figura 11 Secuencia nucleotídica del ADNc.....	37
Figura 12 Alineamiento múltiple, secuencias de Trx	38
Figura 13 Southern blot.....	39
TABLA 1 Porcentajes de identidad.....	38

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
α	Alfa
β	Beta
CAT	Catalasa
CC	Cisticercosis
Cys	Cisteína
DsbA	Proteína bacterial disulfuro isomerasa
ER	Especies reactivas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
GPx	Glutación peroxidasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
GST	Glutación transferasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
kDa	kilo daltons
Mr	Masa molecular relativa
μm	micrómetro
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido en su forma reducida
NC	Neurocisticercosis
NO[•]	Óxido nítrico
O₂	Oxígeno
O₂^{•-}	Radical Superóxido
OH[•]	Radical Hidroxilo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
Prx	Peroxirredoxinas
S₂	Disulfuro
SH₂	Ditiol
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido Dismutasa
<i>T. solium</i>	<i>Taenia Solium</i>
TN	Taeniosis
Trx, Trx-1	Tiorredoxina citósolica
TrxR	Tiorredoxina reductasa
Trx-S₂	Tiorredoxina forma oxidada
Trx-SH₂	Tiorredoxina forma reducida

RESUMEN

Las infecciones por *T.solium* (*Taenia solium*) son comunes en países en desarrollo y constituyen un problema de salud hasta la fecha. Las condiciones sociales, económicas y culturales son un factor fundamental; aún más cuando se tiene convivencia con personas con TN (taeniosis) o se ingieren animales que están infectados con este parásito. Se han presentado nuevos casos de TN y CC (cisticercosis) en países donde se daba como erradicada esta infección, debido a la migración de personas en busca de una vida mejor. Por lo que esta parasitosis se ha convertido en una infección cosmopolita.

El estudio de este parásito ha tomado bastante importancia dentro de la comunidad científica, ya que se ha visto que los tratamientos actuales van disminuyendo su efectividad y la respuesta inmune no es suficiente para combatir al parásito.

T. solium cuenta con varios mecanismos de defensa como enzimas antioxidantes capaces de eliminar o inactivar las ERO (especies reactivas de oxígeno) que someten al parásito a estrés oxidante existiendo evidencias de que tales enzimas juegan un papel crucial en la defensa del parásito.

El enfoque principal de este trabajo es la caracterización parcial de la Trx, (tioredoxina citosólica), proteína que participa dentro de estos mecanismos de defensa y que está involucrada en las estrategias de supervivencia del parásito.

La Trx es una enzima antioxidante presente tanto en eucariontes como en procariontes con una identidad del 27 al 68% entre los organismos. Esta proteína es importante ya que contiene un motivo catalítico CXXC conservado que participa en el equilibrio inter- e intramolecular de puentes disulfuro, mediante la reducción de proteínas antioxidantes que se encuentran en estado oxidado manteniendo así la citoprotección contra el estrés oxidante que genera la defensa inmune del hospedero.

En este trabajo se utilizaron las características moleculares conservadas de esta proteína para desarrollar un diseño experimental para su identificación, clonación y caracterización del ADNc (ácido desoxiribonucleico complementario) que la codifica en *T. solium*. Se encontró un ADNc de 428 pb que codifican para una proteína de 107 residuos de aa (aminoácidos) con una $M_r = 11579$. Se identificaron los motivos esenciales de la TrxTs (tiorredoxina de *Taenia solium*), mediante el alineamiento múltiple con varios organismos. Se observó un porcentaje del 21 al 94 % de similitud con respecto a otras Trx, y el análisis tipo Southern blot sugiere que el gen que se encuentra en el genoma de *T. solium* es de copia única.

1. INTRODUCCIÓN

La TN y la CC causadas por *T. solium* en el humano surgieron hace miles de años, probablemente en África, al comer los desperdicios de las presas de grandes carnívoros y convivir estrechamente en condiciones insalubres.⁴⁰

En la actualidad las infecciones por *T. solium* son comunes en muchos países en desarrollo, se presentan endémicamente en regiones de países como Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú, India, China, Nueva Guinea, Madagascar, Zimbabwe, África del Sur y Occidental,¹ donde estas infecciones constituyen un problema de salud pública hasta la fecha.⁵⁷

Las condiciones sociales, económicas y culturales están intrínsecamente vinculadas con esta zoonosis, ya que en cada uno de los momentos del ciclo de vida del parásito existen actividades humanas involucradas en su reproducción. Puesto que la TN es una enfermedad exclusiva del humano, éste es el único responsable de la dispersión de los huevos del parásito mediante la defecación al aire libre y/o la inadecuada eliminación de excretas.

Se sabe que en zonas marginadas la crianza de cerdos tolera el contacto de éstos con el excremento humano permitiendo así la infección del cerdo y fomentando la CC porcina por lo que desde los años cincuenta la Organización Panamericana de la Salud ha reconocido y abordado la TN/CC, que persiste y supone una amenaza cada vez mayor, siendo la pobreza y la migración humana condiciones asociadas que fortalecen su transmisión y arraigo en los focos endémicos.¹ Reportes recientes describen la aparición de casos en países industrializados, donde la enfermedad había sido erradicada, lo que ha renovado el interés en la historia natural de la enfermedad.³⁸

El estudio de este parásito ha tomado importancia dentro de la comunidad científica, trascendiendo a nivel bioquímico, inmunológico, neurológico, biológico, parasitológico, patológico y epidemiológico¹ obteniendo avances significativos para aplicar medidas de prevención, control y tratamiento.

Algunos de estos estudios abarcan los diferentes mecanismos de defensa que aplica *T. solium* contra la respuesta inmune del hospedero, la cual es activada después de la invasión de este parásito.

Parte de los mecanismos de defensa del hospedero incluyen, la producción de radicales de oxígeno y la liberación de moléculas tóxicas de los gránulos de células inflamatorias, sometiendo al parásito a un estrés oxidante por lo que pueden ocurrir daños en diferentes caminos; así, por ejemplo, la liberación de radicales libres derivados de oxígeno o nitrógeno que pueden inactivar directamente o causar un doblamiento inadecuado de proteínas intracelulares, degradar ácidos nucleicos e iniciar la lipoperoxidación de la membrana, causando la descarga de lipohidroperóxidos y carbonilos citotóxicos dentro del parásito. Varios parásitos platelmintos como *Taenia solium*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, por mencionar algunos, han desarrollado defensas antioxidantes que controlan estos ataques, basados en la participación de enzimas; tales como SOD (Superóxido dismutasa), Catalasa (CAT) y peroxidasa), las cuales además de participar en una gran variedad de procesos biológicos se traslapan con blancos diferenciales inactivando y removiendo radicales libres, funcionando temporalmente como la primera línea de defensa del parásito.⁵⁴ Existen niveles secundarios de desintoxicación que sirven como respaldo, estos son llevados a cabo por la actividad enzimática de GPx (glutación peroxidasa) del tipo seleno-dependiente y GST (glutación transferasa) del tipo seleno-no dependiente. Sin embargo estas defensas secundarias pueden fallar o quedar inactivadas por lo que estas enzimas antioxidantes tienen algunas enzimas que regeneran el daño de las proteínas causado por oxidación. La función de Trx es de una enzima oxido-reductora, y por su distribución ubicua se ha demostrado que ejerce un efecto regenerativo en proteínas que son inactivadas por el estrés oxidante.¹³

El estudio de Trx en mamíferos es muy extensa por lo que se tiene bastante información al respecto, sin embargo, el estudio en helmintos es muy reducido y lo poco que se sabe es debido a su estudio y comparación a otros organismos.

En la actualidad se desarrolla la secuenciación del genoma nuclear de *T. solium*. Derivado de este proyecto no sólo será posible identificar moléculas útiles para mejorar el diagnóstico y tratamiento sino también la identificación de los genes que determinan el desarrollo del parásito.^{57,21}

MARCO TEÓRICO

2.1 *Taenia solium*

2.1.1 GENERALIDADES DEL PARÁSITO

Taenia solium pertenece al orden Cyclophyllidea, clase Cestoda, familia Taeniidae, género *Taenia*, son gusanos planos y largos.¹ Se presenta en dos formas: Gusano adulto y cisticerco (etapa larvaria).

2.1.2 MORFOLOGÍA

- GUSANO ADULTO

Este estadio es un gusano plano de color blanquecino u amarillento, normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud. Carece de tracto digestivo por lo que está provisto de un tegumento o epitelio que le permite absorber los nutrientes del medio y excretar desechos al mismo⁵⁷.

Tiene un escólex que posee cuatro ventosas y un róstelo coronado con dos hileras de ganchos. Tanto las ventosas como el róstelo son estructuras de fijación que capacitan al parásito para mantenerse anclado en la pared del duodeno, donde este crece y se diferencia adelgazándose en su parte inferior para formar un cuello. Donde este inicia el proceso de estrobilación, referente al desarrollo de proglótidos o segmentos que forman el cuerpo o estróbilo, mismo que puede alcanzar varios metros de largo.^{65, 66} Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados; los más distantes contienen órganos sexuales masculinos y femenino, estos son conocidos como maduros; los más alejados al escólex contienen un gran número de huevos, por lo que se dice que se encuentran grávidos (Figura 1).

Los huevos son esféricos miden de 20 a 40 μm y están cubiertos por un embrióforo estriado, formado de bloques de queratina, protegiéndolo así de la desecación. Este huevo a su vez, contiene una oncósfera o embrión infectivo totalmente desarrollado.⁶⁷ (Figura 2)

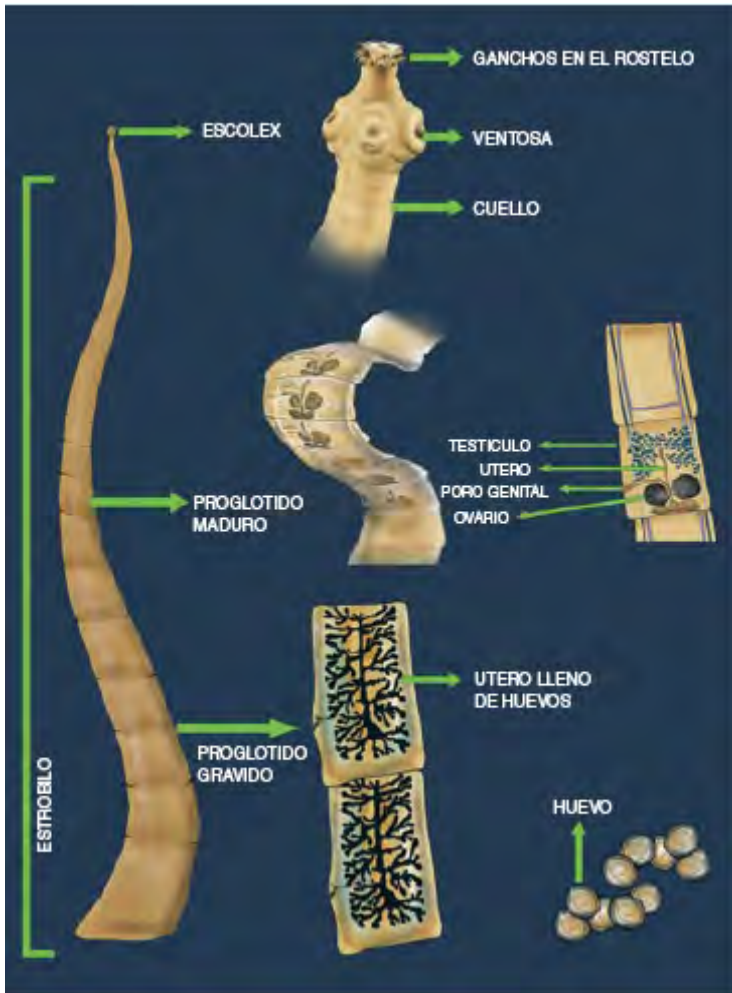
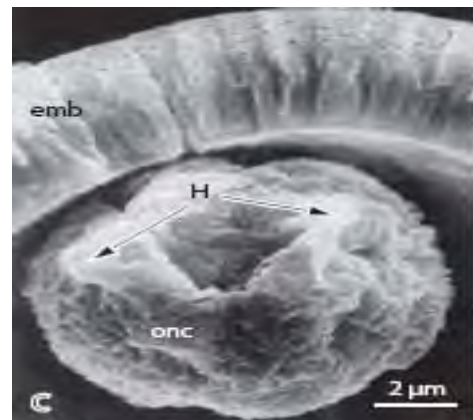


Figura 1. (Flisser A. 2006)²¹

Representación general de la morfología de *T. solium*. Se aprecia el escólex con sus ganchos, ventosas y los diferentes tipos de proglótidos. Los proglótidos inmaduros cercanos al cuello son de tamaño variable. Los proglótidos maduros, incluyendo los proglótidos grávidos, generalmente miden de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho.

Figura 2. (Larralde C. 2006)²

Corte de un huevo inmaduro donde se aprecia, el embrióforo (emb), la oncósfera (onc) y sus ganchos (H)



- CISTICERCO

El cisticerco o metacestodo de *T. solium* está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (de 0.5 a 2 cm de diámetro mayor) con un pequeño escólex invaginado. Este es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. El cisticerco es una forma intermedia o larvaria en el desarrollo de este parásito antes de convertirse en el gusano adulto o solitaria. Al carecer de tracto digestivo, las larvas obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de su superficie tegumental al igual que el gusano adulto.^{1,21} (Figura.3)

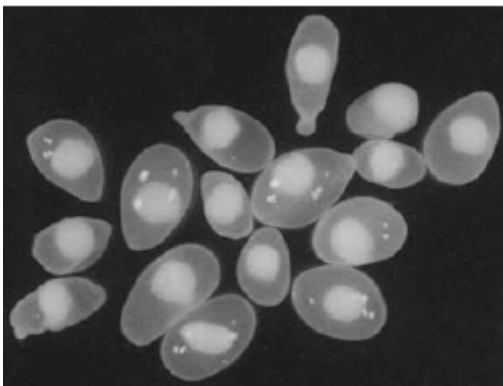


Figura 3 (Larralde C. 2006) ²

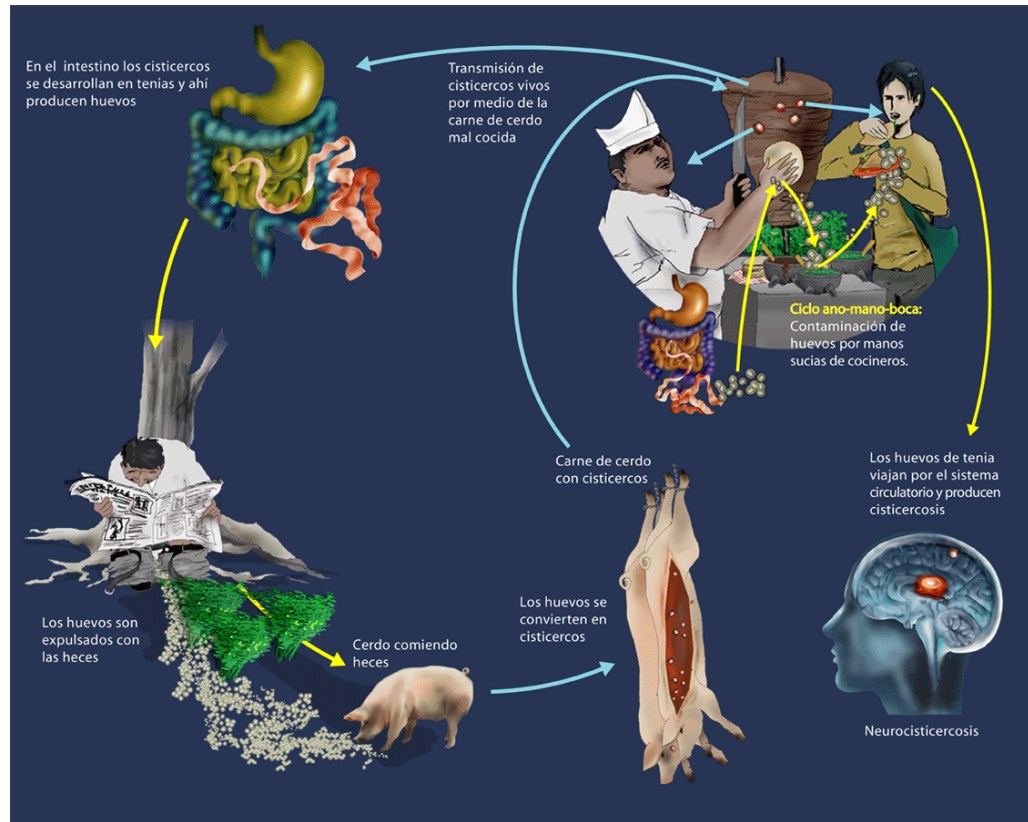
Cisticercos disecados de músculo esquelético de cerdo

2.1.3 CICLO DE VIDA

T. solium alterna en el cerdo como principal huésped intermediario y en el ser humano como huésped definitivo. En su estado adulto el parásito habita en el intestino humano, desarrollándose y produciendo miles de huevos; los cuales se encuentran inmaduros y son expulsados en la materia fecal. Dichos huevos pueden madurar fuera del huésped, permanecer viables e infectivos en aguas negras, ríos o pasturas por semanas.^{44,3} Al convivir estrechamente el humano y el cerdo, este se infecta al ingerir heces donde hay proglótidos o huevos del parásito adulto. Cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco, ocasionando la CC porcina. El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo insuficientemente cocida e infectada con cisticercos. Estos cisticercos son activados por la bilis y enzimas proteolíticas promoviendo la evaginación del escólex,⁵¹ el cual se fija en las paredes del intestino humano, desarrollándose

hasta convertirse en gusano adulto.^{44,3} La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto, puede ocasionar la ingesta de huevos, causando cisticercosis humana; proceso que puede tardar 8 semanas.^{40,14} (Figura.4)

Figura. 4 Ciclo de vida del parásito. Tomada de (www.lab.biomedicas.unam.mx/cistimex)



2.2 CUADRO CLÍNICO

2.2.1 TAENIOSIS

La mayoría de los portadores de la tenia adulta no presentan síntomas²⁵. Aunque se han reportado estos síntomas en pacientes⁴⁸:

- Dolor en hipocondrio derecho
- Estreñimiento
- Meteorismo
- Expulsión de proglótidos
- Náusea
- Pérdida de peso
- Debilidad
- Bulimia
- Cefalea

- Malestar general
- Diarrea
- Prurito anal o nasal
- Nerviosismo
- Aumento o pérdida de apetito.

2.2.2 CISTICERCOSIS

La cisticercosis puede afectar a diferentes tejidos del organismo desplazando estructuras y generando inflamación a su alrededor. En el ser humano, los cisticercos se localizan con mayor frecuencia en los músculos esqueléticos, sistema nervioso, ojos, tejido graso subcutáneo y corazón. Cuando el cisticerco se localiza fuera del sistema nervioso central (SNC) suele ser asintomático, mientras que cuando se aloja en el sistema nervioso central, las manifestaciones clínicas dependerán del número de parásitos y de sus localizaciones, así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria del huésped.

Los síntomas en pacientes con cisticercosis son:

- Crisis convulsivas de aparición tardía.
- Hipertensión intracraneana.
- Cefalea crónica.
- Deterioro mental.
- Alteraciones de la visión.
- Nódulos subcutáneos.
- Presencia de anticuerpos en suero.

2.3 DIAGNÓSTICO

2.3.1 TAENIOSIS

Los estudios relacionados para el diagnóstico de TN por lo general se basan en la detección de huevos en materia fecal mediante técnicas de sedimentación y flotación (Ritchie y Faust),⁵³ donde los huevos son separados y observados en microscopia de luz. En estas técnicas es difícil realizar la diferenciación de huevos de *T. solium* con otras especies. Por lo que también existen ensayos inmunoenzimáticos con coproantígenos (ELISA) de *Taenia*.⁶⁰ Los valores que

reportan los antígenos de huevos de *Taenia* en estos ensayos, oscilan entre 0.5 y 1.5% generalmente con estos datos no se puede confirmar que se debe a *T.solium*, ya que los huevos son idénticos a los de *T. saginata* y los antígenos tienen reacción cruzada entre ambas especies.⁴² Otro tipo de pruebas son las serológicas que detectan productos de excreción secreción (ES) de *T. solium* en un rango de 32.7 a 42.1 kDa como las proteínas ES33 y ES38.^{64, 2} Una técnica más es el PCR que amplifica el ADN del parásito, diferenciándolo de otras especies usando fracciones específicas de *T. solium*⁴⁵ En la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas como MAPIA que permite la comparación simultánea de varios antígenos para la detección serológica de TN y CC.²⁸

2.3.2 CISTICERCOSIS

Existen diversos métodos diagnósticos empleados para esta enfermedad tales como:

La biopsia que es un procedimiento quirúrgico altamente invasivo, por consiguiente este procedimiento no siempre se puede realizar, ya que depende de la localización del cisticerco. El desarrollo tecnológico nos ha proporcionado métodos imagenológicos que sirven de apoyo para el diagnóstico, tales como la tomografía computarizada (TC); técnica que obtiene imágenes que ponen de manifiesto la presencia del cisticerco en cualquier parte del cuerpo, la Resonancia Magnética; técnica más sensible que provee mejor resolución para detección en las zonas del cerebro en comparación con la TC y la Ultrasonografía que en conjunto con la TC ayuda a la detección de cisticercosis ocular. Lamentablemente estas técnicas no siempre están al alcance de todos por sus altos costos. Por lo que existen otras técnicas como la inmunoelectrotransferencia en donde se buscan anticuerpos anticisticerco en suero del paciente, estos reconocen antígenos en una fracción de glicoproteínas purificadas del parásito;^{67,62} siendo este método de diagnóstico confirmatorio.^{56, 24}

2.4 TRATAMIENTO

Son los fármacos de elección para tratar la taeniosis/cisticercosis:

- **ALBENDAZOL.** Este medicamento actúa produciendo la desaparición selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos de las células tegumentarias e intestinales de los helmintos, inhibiendo la polimerización de la tubulina. Altera las sustancias secretoras del aparato de Golgi, la secreción de acetilcolinesterasa, el consumo de glucosa y el agotamiento del glucagón, produciéndoles inmovilización y muerte.^{48,18,31}

La dosificación para taeniosis consiste administrar al mismo tiempo 2 tabletas de 200 mg al día por 3 días; en suspensión (1ml/20mg), 20ml (400 mg) una vez al día por 3 días consecutivos. Para la cisticercosis se administran 15 mg/kg peso en dos tomas al día, conjuntamente con los alimentos por 14 a 30 días dependiendo de la respuesta. Se recomienda el uso oral o intravenoso de corticosteroides, para prevenir eventos de hipertensión cerebral, durante la primera semana de tratamiento.

- **PRAZIQUANTEL.** Este medicamento produce parálisis espástica en el parásito, debido al pasaje del calcio al interior del verme; inhibe además la captación de glucosa al parásito forzándolo a consumir sus propias reservas del glucógeno, después de 5 minutos de contacto con la droga los vermes se observan al microscopio electrónico mostrando la degeneración del tegumento. Esta acción del praziquantel también se ejerce sobre los huevos y las larvas enquistadas. Se aplica junto con la dexametasona para evitar efectos no deseables, los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los corticosteroides previenen la aparición de síntomas que en ocasiones son más graves que la propia enfermedad.^{48,18,}

31

La dosificación para taeniosis consiste en administrar 10 mg/Kg de peso como dosis única. Para la Neurocisticercosis la dosis diaria es de 50 mg/kg, dividida en 3 tomas durante 15 días ó 75 mg/kg divididos en 3 dosis administradas cada 2 horas (por ejemplo, 07:00, 09:00 y 11:00), seguida de

la aplicación de 10 mg de dexametasona intramuscular 4 horas después de la última dosis y en los 2 días siguientes.

La cisticercosis visceral o cutánea se trata con 50 mg/kg divididos en 3 tomas (cada 8 horas). El tratamiento requiere de 15 días como mínimo.

- Existe también un tratamiento quirúrgico, pero este solamente se realiza cuando hay la posibilidad de retirar los cisticercos directamente, un ejemplo es la extracción del cisticerco del músculo esquelético.

2.5 MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La infección por *T. solium* provee un gran reto al sistema inmune del huésped. No sólo porque este parásito es un organismo multicelular, sino porque tiene un ciclo de vida con múltiples etapas de desarrollo y éstas pueden coexistir en el huésped infectado. Por lo que el huésped activa su sistema inmune para eliminar al intruso. A esto el parásito en su forma larvaria ha desarrollado diversos mecanismos de evasión para sobrevivir a una respuesta inmunitaria activa. Estableciéndose en sitios inmunológicamente privilegiados, como el ojo⁵⁰ y el cerebro o generando un enmascaramiento de la respuesta inmunitaria, al cubrirse con inmunoglobulinas del huésped⁵¹ también produciendo moléculas que suprimen o desvían la respuesta inmunitaria, teniendo así infecciones asintomáticas, manteniéndose viable durante varios años.²¹ Un ejemplo de la desviación inmunitaria es la taeniastatina, que inhibe la vía clásica y alterna, así como polisacáridos sulfatados que hacen que se active el C3b y C5a del complemento a distancia del parásito.⁴ Análogamente la paramiosina se une a C1q inhibiendo la activación de la vía clásica del complemento.⁵² También existe el factor de metacestado, complejo formado por ARN y proteína, el cual disminuye la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos además se ha observado que inhibe la reacción inflamatoria en implantación subcutánea de cisticercos en ratones.⁵³ Y los mencionados mecanismos de defensa basados en la participación de enzimas antioxidantes. Los cuales si no son controladas durante los niveles de estrés oxidante generados, causan grandes daños en el parásito.

3 ESTRÉS OXIDANTE

Es el desequilibrio entre las ER (especies reactivas) y los antioxidantes, presentando una inclinación a favor de las ER que potencialmente llevan a cabo un daño en el organismo.⁵⁵ Esto puede estar asociado de la exposición a oxidantes o la disminución en las defensas antioxidantes o ambos factores.³²

Frecuentemente coexisten diferentes ER en el ambiente haciendo difícil la identificación inequívoca de cual agente es responsable de un efecto biológico dado,¹⁹ por ejemplo, la necesidad de O₂ (oxígeno) oscurece el hecho de su toxicidad como gas mutagénico. Siendo esto por consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno; de productos asociados a reacciones metabólicas normales presentes en mitocondria, citoplasma, retículo endoplásmico, membrana plasmática y peroxisomas; lo que da origen a la formación de productos conocidos como ERO (especies reactivas de oxígeno). Otros factores que generan un aumento de ER son la exposición a radiación, drogas redox, metales o las ERO producidas por células del sistema inmune como los eosinófilos, neutrófilos y macrófagos.¹⁵ Por lo que los organismos han evolucionado regulando estas ER, y otros como *T. solium* han elaborado defensas que son conocidas colectivamente con el termino de antioxidantes para reducir esta toxicidad.^{27, 8}

3.1 ESPECIES REACTIVAS Y RADICAL LIBRE

El término ER se aplica colectivamente a las moléculas, radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos en radicales libres. Tomando en cuenta que un radical libre contiene uno o más electrones no apareados, este puede formarse por diferentes mecanismos, tales como la adición de un electrón a un no-radical o cuando un enlace covalente se rompe, dejando un electrón de cada par unido a cada átomo (fisión homolítica).²⁷ Siguiendo con el ejemplo del O₂, que es un radical con dos electrones desapareados; identificado de esta forma O₂•, dichos electrones tienen el mismo spin presente de forma paralela mismos que pueden ser re-arreglados por la adición de energía, transformándolos en moléculas con arreglos que sean no reactivas (no radicales)

y en ER como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Aunado a esto se debe tener en mente que las ERO no sólo incluyen a los radicales libres de oxígeno, sino también a los no radicales derivados de O_2 . Dejando en claro que todas los radicales de oxígeno sean ERO, pero no todos los ERO son radicales.

Las células aerobias se acoplaron usando el O_2 comoceptor de electrones en muchas reacciones enzimáticas y no-enzimáticas; sin embargo dentro de estas reacciones, la adición de electrones al oxígeno siguió resultando en la formación de ERO tóxicas (Figura. 5), no sólo incluyendo a los radicales libres de O_2 , sino también a los no radicales derivados de O_2 ⁸. La concentración de estas ERO son un factor muy importante, ya que determinarían el nivel de estrés oxidante junto con los beneficios o daños en el organismo. Las altas concentraciones de estas moléculas causan daño a macromoléculas biológicas produciendo oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, despolimerización de polisacáridos, daño cebero al ADN (mutaciones, ruptura de hebras, etc.) y en el último de los casos la apoptosis llevando a la muerte celular.⁵⁸ Sin embargo en bajas concentraciones estas pueden ayudar a regular varios procesos fisiológicos en la célula, como la activación de factores de transcripción, además se pueden reparar los daños causados por las ERO y controlar a estas mismas con las enzimas antioxidantes.

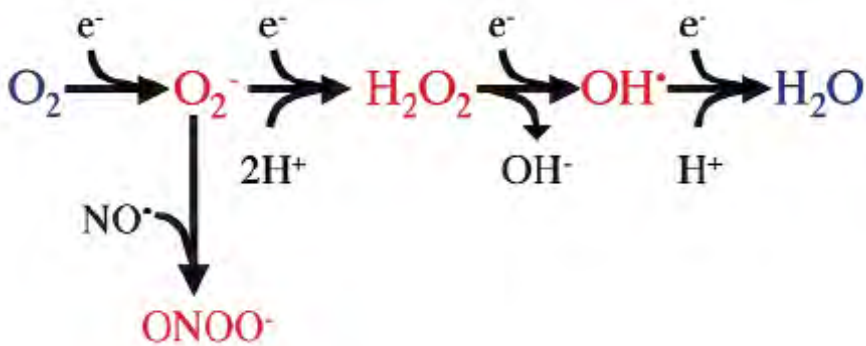


Figura 5. (Bowler RP. 2002)²⁷

Derivación de especies reactivas de oxígeno. El electrón secuencial (e^-) adicionado a oxígeno da como resultado la formación de ERO (rojo): superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\bullet}). El superóxido se combina con óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Tomada de Oxidative stress in allergic respiratory diseases

3.2 ANTIOXIDANTES

Halliwell y Gutteridge han definido los antioxidantes como sustancias que son capaces, aún en bajas concentraciones, de competir con otros sustratos oxidables y estas significativamente retrasan o inhiben la oxidación de estos sustratos.¹⁹

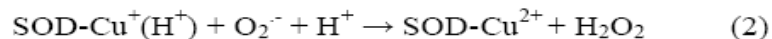
La defensa primaria contra las ERO son los antioxidantes endógenos, los cuales pueden ser subdivididos dentro categorías: enzimática y no-enzimática.

3.2.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Existen varias enzimas en *T. solium* que pueden aceptar el electrón desapareado de los radicales libres y proveer protección.

Dentro de estas enzimas encontramos a:^{27, 15, 10,12}

- La SOD (superóxido dismutasa): es una familia de metaloenzimas que catalizan la disminución de radiales $O_2^{\bullet -}$ convirtiéndolo a H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) y O_2 .



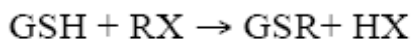
Existen cuatro isoformas de SOD y se clasifican de acuerdo al metal presente en su sitio catalítico:⁶⁴

- Cu/Zn-SOD (citosólica y mitocondrial)
 - Mn-SOD
 - Fe-SOD
 - Ni-SOD
- La CAT y GPx catalizan la reducción de H_2O_2 y alquil hidroperóxidos mediante la oxidación de GSH (glutatión).

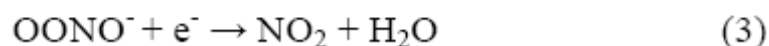
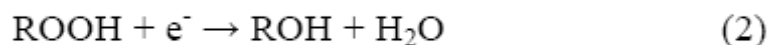
Dentro de las GPx existen tres diferentes tipos de esta enzima que contienen selenio: la citósolica (C-GPx), la fosfolípida hidroperóxido (PH-GPx), esta utiliza el sistema tiorredoxina y la plasmática (P-GPx).²⁶



La GST es una familia versátil de enzimas que son identificadas debido a que conjugan a GSH (glutati6n) con diversos xenobi6ticos. La reacci6n general de conjugaci6n de GSH genera compuestos electrof6licos que son transportados fuera de la c6lula.



- La Prx (peroxiredoxina) es una familia de enzimas que catalizan la reducci6n de H₂O₂ a agua, los hidroper6xidos (ROOH) en su respectivo alcohol y agua, y el peroxinitrilo (OONO⁻) a nitrito y agua, usando a tiorredoxina como donador de electrones.



No necesitan grupos prost6ticos, metales o coenzimas para su cat6lisis.

Existen diferentes subtipos de Prx, existen desde PrxI a Prx VI. Las cuales se dividen en diferentes tipos dependiendo el n6mero de ciste6nas que contengan: 1-Cys y las 2-Cys (misma que se divide en t6pica y at6pica).²²

3.2.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIM6TICOS

Incluye a los compuestos de bajo peso molecular como el GSH, ascorbato, ureato, α -tocoferol, bilirrubina, y 6cido lipoico. Otros son las mol6culas de alto peso molecular, como prote6nas que tienen un grupo tiol oxidable, tal como la alb6mina, y prote6nas que se unen a metales libres, como la transferrina.⁸

4.- LAS TIORREDOXINAS (Trx)

La tiorredoxina pertenece a una superfamilia de enzimas que incluye a las tioltransferasas que presentan dominios caracter6sticos an6logos entre ellos; estos han sido bien estudiados en las Trx y las glutaredoxinas (GRX). Esta superfamilia tambi6n incluye a un n6mero de prote6nas que pertenecen a la familia de prote6nas disulfuro isomerasas (PDI), subfamilia PDI-D, y prote6nas de bacterias. Estas

enzimas de la familia de la tiorredoxina no tienen un alto nivel en la similitud de secuencia, pero comparten un grado de similitud estructural, teniendo la secuencia CXXC en el sitio activo.¹²

La Trx es una proteína de 12 kDa de longitud variable (105 a 110 aa) con una identidad del 27 a 69% entre diferentes especies. En células mamíferas esta tiene un 90% de homología entre ellas. Además las Trx mantienen una región activa muy conservada [Val-Asp-Phe-Xaa-Ala-Xaa-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-(Lys)-(Met)-(Ile)-Xaa-Pro] donde se encuentra el motivo catalítico Cys32-Gly-Pro-Cys35 (usando la numeración de *E.coli*). Las investigaciones en la estructura y función de la Trx han demostrado que es una proteína ubicua de estructura única. Misma que existe en dos formas; reducida (Trx-SH₂) y oxidada (Trx-S₂). La Trx-S₂ es reducida generalmente por NADPH y la flavo proteína Tiorredoxina reductasa (TrxR) enzima capaz de reducir el sitio activo de Trx, que en conjunto forman al sistema de Trx-TrxR (figura. 6). Este sistema participa en reacciones redox a través de la oxidación reversible de su centro activo ditiol (SH₂) a disulfuro (S₂) y de un S₂ a SH₂, el cual puede ser ilustrada a través de una multitud de funciones, que pueden ser agrupadas en dos grandes categorías. La primera cataliza reacciones de intercambio SH₂ - S₂, mediante la transferencia de electrones en varias rutas intracelulares de biosíntesis y enzimas antioxidantes, tales como la ribonucleótido reductasa, metionin sulfoxido reductasa, Prx. Segundo, protegen a proteínas citosólicas de agregación e inactivación a través de la formación intramolecular e intermolecular de puentes S₂. Además tiene actividad antioxidante removiendo ERO (en particular H₂O₂ y OH[•]). Junto con otras funciones especializadas como factor regulador para enzimas o receptores, como subunidad de DNA polimerasa de un virus o como componente esencial para ensamble de pequeños virus.^{61, 13, 22,50, 33,35}

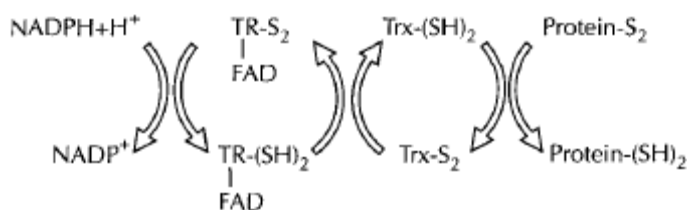


Figura 6. Sistema de reducción TrxR/NADPH para Trx-S₂ (Holmgren A. 1995)

La Trx presenta diversas actividades biológicas y una alteración genética puede presentar un incremento o disminución en la expresión de esta proteína, o su inactivación. Alterando el gen de Trx-1 en ratones que se encuentra en el segundo cuarto proximal del cromosoma 4, el cual es homólogo al cromosoma 9q32 en humano, se observó que los ratones homocigotos morían al poco tiempo, mientras que los heterocigotos eran viables, fértiles y en otros aspectos normales. Los efectos letales de Trx-1 en el desarrollo temprano son un hallazgo consistente con el que Trx-1, ya que está ampliamente distribuido en diferentes órganos y tejido durante el desarrollo fetal. Ratones transgénicos con Trx humana mostraron funciones normales en los órganos con mayor actividad de estrés oxidante y no hubo alteraciones en enzimas como SOD Cu/Zn, SOD Mn, o GPX.^{50, 46}

Existen medicamentos que inactivan a Trx, estos son utilizados en tratamientos antitumorales como el 1-metilhidroxipropil 2-imidazoloil disulfuro (PX-12), identificado como inhibidor de la Trx-1 uniéndose al residuo Cys73 y el 2,5-bis [dimetilamino) metil]ciclopentanona (NSC 131233), inhibidor irreversible de la Trx-1.

4.1 ESTRUCTURA

La estructura más conocida es la Trx-S₂, es una proteína globular formada por 108 residuos que se dobla para formar un núcleo hidrofóbico de 5 cadenas de hoja β -plegada (β 1- β 5), mezcladas y giradas; tres que corren en paralelo y dos anti-paralela, junto a 4 hélices- α (α 1- α 4); una en cada costado. Se puede considerar la estructura secundaria formada por dos residuos $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (1 a 59) y $\beta\beta\alpha$ (76 a 108), conectándose con 18 residuos que corren como un largo segmento en forma de hélice distorsionada a través de la hoja plegada (Figura. 7).⁵⁹ El motivo conservado sobresale de la segunda cadena - β y de la segunda hélice - α , que forman el primer giro, dejando los átomos de sulfuro redox activos y accesibles en un costado de la estructura. Dentro de la estructura hay áreas planas e hidrofóbicas conservadas, con residuos de Gly, Pro, Met, Val, Ala, que pueden ayudar a la unión de Trx con otras proteínas moleculares durante su acción

catalítica y residuos cargados que pueden participar en las reacciones redox. Durante el mecanismo reductor de proteínas, la Trx-SH₂ mediante su región hidrofóbica, se une al sustrato de una proteína X; generando un complejo, donde en el ambiente hidrofóbico del complejo, el tiolato de (Cys32), actúa como un nucleófilo; atacando la proteína blanco formando así un enlace covalente mixto, conocido como estado de transición; finalmente es atacado nucleofilicamente el tiolato desprotonado de (Cys35), en el cual, el disulfuro forma un ditiol en la proteína blanco y un enlace S₂ en la Trx que se oxida.³⁴(Figura. 8)

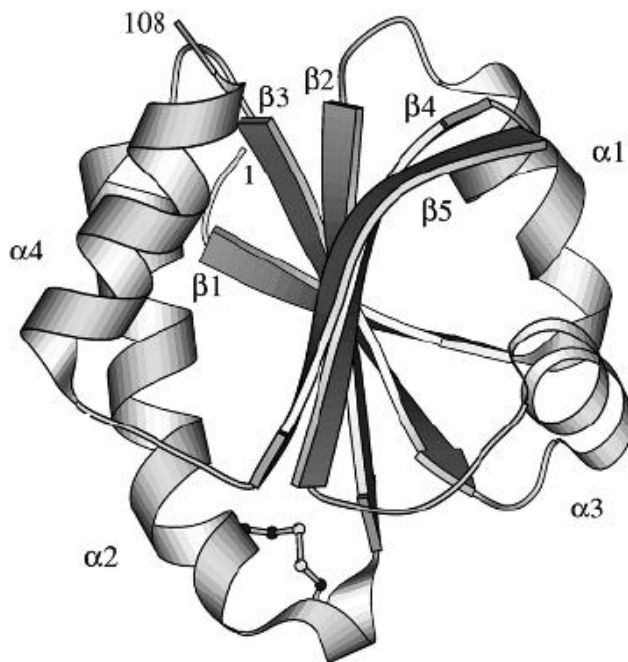


Figura 7. (Štefanková P. 2005)39

Trx de *E. coli*. estructura con cinco cadenas de hoja plegada en el centro, con 4 hélices- α y un grupo disulfuro en el sitio activo.

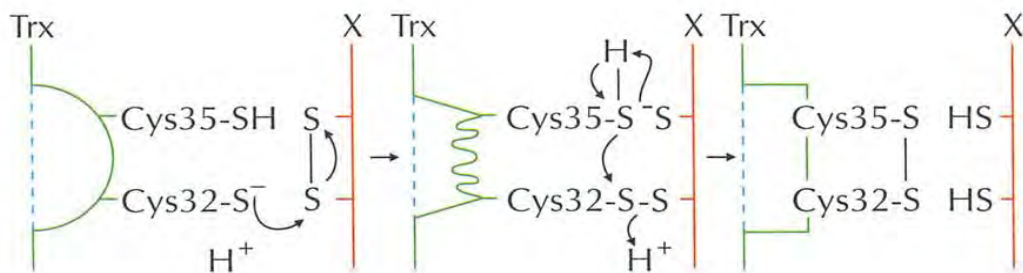


Figura 8 (Holmgren A. 1995)³⁴

Mecanismo reductor de proteínas por Trx.

4.2 ISOFORMAS DE LA Trx

Existen dos principales tipos de Trx:

La TRX-1 mamíferos (humana), además de tener su sitio catalítico (Cys-32 y Cys-35), existe otro sitio de intercambio $\text{SH}_2\text{-S}_2$ el cual contiene a Cys-62 y Cys-69. Adicionalmente tiene un residuo de Cisteína en la posición Cys-73, particularmente localizada al giro adyacente del sitio catalítico. Esta Cys puede ser oxidada, resultando en la formación de un dímero que carece de la actividad catalítica. La Trx-1 humana puede realizar distintas funciones:⁴⁰

- Fuera de la célula realiza quimiotaxis y es un estimulador del crecimiento.
- En citosol es antioxidante o funciona como cofactor reductor.
- En el núcleo es un regulador del factor de transcripción.

La Trx-2 se ha encontrado que esta formada de 166 aa (18kDa), 60 aa en la región N-terminal de la Trx-2 forman el péptido señal que la transloca a la mitocondria, esto se han confirmado por Western Blot; presenta el mismo sitio catalítico de las Trx con los residuos Cys en 90 y 93, pero carece de los tres residuos de Cys encontrados en Trx-1. Se ha observado mediante un corte de los 60 aa (péptido señal), que Trx-2 adquiere la característica de una proteína trx-1 de 12.2 kDa.³⁶

5. HIPOTESIS

Si Taenia solium es sometido a estrés oxidante por parte de la respuesta inmune del hospedero. Este debe de contar con genes que codifican para enzimas antioxidantes, como la tiorredoxina.

6. OBJETIVO

- Objetivo general:

Caracterizar molecularmente el ácido desoxiribonucleico (ADNc) que codifica para una tiorredoxina (Trx) citosólica de *Taenia solium*.

- Objetivos particulares:

1.- Producción de una sonda de Trx.

2.- Aislamiento de ADNc para la Trx.

3.- Caracterización molecular de la clona de ADNc

- a) Determinación de la estructura primaria a partir de la secuencia de nucleótidos.
- b) Comparación de secuencia primaria de Trx por medio de un alineamiento múltiple con diversas Trxs.
- c) Determinación del número de genes (Southern Blot).

7. MATERIAL y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se utilizaron bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa: C600 *supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21* y TOP10 [F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hdsRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1 araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL*(Str^R) *endA1 nupG*] (Invitrogen).

Los cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente. Los metacestodos se lavaron en solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS) y se preservaron a - 70°C, hasta su uso.

La biblioteca de ADNc construida con el fago λ gt10 fue preparada con anterioridad en el laboratorio de Biología Molecular de *T. solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.2 Reactivos

Los oligonucleótidos Trx-5' y Trx-3' fueron diseñados a partir de los sitios TWCGPC y MPTLFVF, secuencias altamente conservadas en las Trx. Para las reacciones PCR se utilizó el estuche producido por Biotecnologías Universitarias. El estuche para la reacción conjunta de PCR y transcripción reversa (RT-PCR) fue el Superscript One Step RT-PCR (Invitrogen). Se utilizó el estuche de Random Prime Labelling System para el marcaje radioactivo de sondas (casa comercial GE Healthcare). El isótopo usado en dicho marcaje [α -³²P-dCTP] tiene una actividad específica de 250 μ Ci/mmol, (Amersham Bioscience). Se usaron placas radiográficas (KODAK), membranas de nylon (Hybon de Amersham Bioscience) y membranas de nitrocelulosa (Millipore).

Las soluciones para los tamizajes, preparación de amortiguadores y otras soluciones fueron hechas con reactivos comerciales disponibles en el laboratorio.

7.3 Obtención de la sonda

Se realizó un RT-PCR utilizando los oligonucleótidos Trx-5' y Trx-3' con 1 µg de RNAm de larva de *T. solium* como templado. Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystems), usando las siguientes condiciones en todas las reacciones fue: 50°C por 30 min para la reacción de transcripción reversa y 30 ciclos de: 95°C durante 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min; y el último ciclo de 95°C por 1 min, 52°C por 2 min, 72°C por 4 min. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% (ver anexo) corriéndose en una cámara de electroforesis (Life Technologies) a 100V por 1hr. El fragmento obtenido fue cortado del gel y disuelto en una solución NaI 6M a 37°C por 15 min. Disuelta la agarosa, se agregaron 2 µL de perlas de vidrio, se agitó y se incubó a 4°C por 2 hr, con agitación en intervalos de 30 min. Se centrifugó a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 30 seg, se adicionó una solución de etanol al 50% en TRIS-HCl, se resuspendieron las perlas de vidrio y se centrifugó como en el paso anterior, esto se repitió dos veces. Se desechó el sobrenadante y se secaron las perlas a 37°C, el ADN se eluyó resuspendiendo las perlas en 25 µL de amortiguador TE (ver anexo) e incubándolo a 37°C por 30 min. El fragmento de ADN obtenido fue amplificado por PCR y ligado al vector pCRII-TOPO. Usando la ligación se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa TOP10; las clonas positivas fueron secuenciadas en un secuenciador automático SEQ4.4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para cada reacción de PCR se utilizaron las siguientes cantidades: 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X, 2.5 µL de dNTP's 2 mM, 1.25 µL de MgCl₂ 20X, 1 µL de cada oligonucleótido, 0.2 µL de enzima (5 U/µL), 1 µL (ug) de ADN templado y H₂O hasta un volumen final de 25 µL. Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystems), usando las siguientes condiciones: un primer ciclo de 95°C por 3 min, 52°C por 1

min, 72°C por 1 min, un total de 30 ciclos de 95°C durante 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min y el último ciclo de 95°C por 1 min, 52°C por 2 min, 72°C por 4 min.

7.5 Marcaje radioactivo.

El fragmento obtenido anteriormente en la PCR fue marcado con el estuche de Random Prime Labelling System (GE Healthcare). Se utilizaron 25 ng del fragmento en 45 µL de amortiguador TE. Se calentó a 100°C por 5 min y enfrió inmediatamente en hielo por 5 min. La mezcla se colocó en el tubo de reacción del estuche de marcaje RedPrime, se adicionaron 5 µL de [α -³²P-dCTP] al tubo y se incubó durante 10 min a 37°C, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 5 µL de EDTA 0.2 M. Cuando se utilizó la sonda en el tamizaje de la biblioteca de ADNc, se desnaturalizó previamente a 100°C por 5 min.

7.6 Tamizaje para el aislamiento de clonas

Una clona de bacterias *E. coli* C600 fue inoculada en 50 mL de medio SOBMB e incubada a 37°C la noche. La titulación de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo, realizando diferentes diluciones de la misma. En volúmenes individuales de 200µL de bacterias se infectaron con las diluciones de biblioteca por 15 min, para sembrarlos en cajas petri con medio SOBMB-agar (ver anexo). Solidificado el medio se incuban a 37°C toda la noche. Se contó el número de placas líticas y se multiplicó por la dilución para obtener el título de la biblioteca. Se sembraron 45,000 fagos en tres cajas petri de 180 mm de diámetro, siguiendo el protocolo anterior. Las placas líticas producidas por los fagos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, colocando la membrana por encima del tapete bacteriano y de fagos en la caja petri, estas membranas se mantuvieron por 1 min, se marcaron con tinta china (puntos de referencia), para identificación de las placas líticas en la radiografía. Las membranas fueron colocadas sobre una solución alcalina

desnaturalizante (ver anexo) por 2 min, el ADN del fago desnaturalizado, se neutralizó la solución anterior, con solución neutralizante TRIS-HCl (ver anexo) por 2 min. Finalmente las membranas se lavaron con una solución de citratos 5x (SSC 5X, ver anexo) por 2 min. El ADN se fijó a la membrana mediante luz UV, en un equipo UV Stratalinker 2400 (Stratagene). Las membranas se secaron a temperatura ambiente y se colocaron en una solución de hibridación (ver anexo) por 1 hr a 50°C. Se agregó la sonda marcada y se dejó hibridando toda la noche a 55°C. Las membranas se lavaron tres veces con 100 ml de SSC 2x por 5 min en agitación. Las membranas se secaron y se expusieron a placas radiográficas toda la noche, al revelarse las placas, se identificaron los fagos positivos como un punto negro en la radiografía. Se aislaron las clonas positivas y se guardaron en 1 mL de medio SM (ver anexo) a 4°C. Se realizó un segundo y tercer tamizaje para obtener clonas de fagos aislados, con el protocolo descrito anteriormente.

7.7 Purificación de ADN a partir de fagos

Se infectaron 300 μ L de bacterias *E. coli* C600 con 1×10^6 fagos de una clona, esta mezcla se incubó 15 min a 37°C y se sembró en una caja petri con agar SOBMB, como se describió anteriormente, se incubaron toda la noche a 37°C, se recuperaron los fagos en 5 mL de medio SM, agitando 1 hr a temperatura ambiente, se recupera el SM y se agregan 2 mL más para recuperar el remanente de fagos. El SM con fagos se transfirió a tubos Falcon de 15 mL y se le adicionó 200 μ L de CHCl_3 , se agitó y centrifugo a 3400 rpm (Centra CL2, IEC) por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almaceno a 4°C. Se tomaron 700 μ L de solución PEG (ver anexo) en un tubo de eppendorf de 1.5 mL, se mantuvo en hielo por 2 hr, se centrifugó a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 15 min a temperatura ambiente y se tiro el sobrenadante. El precipitado se re suspendió con 200 μ L de medio SM y se agregaron 2 μ L de ARNasa (1 mg/mL) y 2 μ L de ADNasa (100 μ g/mL) incubándose a 37°C por 30 min. Terminado el tiempo se agregaron 2 μ L de SDS

al 10% y 2 μL de EDTA 0.5 M pH= 8.0, y se incubó a 68°C por 15 min. La mezcla anterior se sometió a extracciones de fenol-cloroformo, separando la fase acuosa se adicionó 200 μL de isopropanol y se mantuvo a -70°C por 2 hrs. Se centrifugó las muestras a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 10 min a temperatura ambiente, se tiro el sobre nadante y se resuspendió el precipitado en etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 5 min y se tiro el sobrenadante. El precipitado de ADN se secó a 37°C por 10 min y se re suspendió en 25 μL de amortiguador TE.

7.8 Ligación y transformación bacteriana

El ligamiento de fragmentos y vectores se llevó a cabo utilizando el estuche de ligación TOPO-TA Cloning System (invitrogen), se utilizó 1 μL del vector pCRII-TOPO, 1 μL de amortiguador de ligación salino, 1 μL de agua y 3 μL de un PCR fresco. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hr. A 50 μL de *E. coli* TOP10 competentes se adicionaron 2 μL de la ligación. La mezcla se incubó en hielo por 1 hr y se sometió a choque térmico de 45°C por 30 seg, seguido de la adición de 400 μL de medio SOC para incubar la mezcla a 37°C por 30 min en agitación. Las bacterias competentes del medio SOC fueron sembradas en cajas petri con agar LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se dejaron incubando toda la noche a 37°C. Se escogieron colonias al azar para extraer su ADN plasmídico y con los oligonucléotidos M13F y M13R se amplificaron los insertos del plásmido mediante la técnica de PCR, se hizo un corrimiento en gel para identificar los insertos de interés.

7.9 Preparación de ADN plasmídico

Las bacterias transformadas que presentaron el inserto de interés, se incubaron en 100 mL de medio LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C durante la noche. Se realizó el método de la lisis alcalina, para extraer el ADN plasmídico. El cultivo se

centrifugó a 3,400 rpm (Centra CL2, IEC) durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se agregaron 10 mL de solución hipotónica (sol. 1, ver anexo) dejando incubar 10 min a temperatura ambiente, se agregaron después 10 mL de solución alcalina recién preparada (sol. 2 ver anexo), se agitó por inversión lenta y se incubó en hielo por 10 min, enseguida se adicionaron 7.5 mL de solución neutralizante (sol. 3 ver anexo), se agitó y se dejó en hielo 10 min, se centrifugó a 3,400 rpm (Centra CL2, IEC) durante 10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 200 μ L de TE y se agregaron 2 μ L de ARNasa (1 mg/mL) incubando por 30 min a 37° C. La muestra se extrajo con mezcla de fenol-cloroformo, la fase acuosa se pasó por una columna de sefarosa CL4B previamente equilibrada con TE. Fracciones de 500 μ L fueron colectadas y revisadas en geles de agarosa al 2%, las fracciones que tenían el plásmido fueron juntadas y precipitadas con acetato de sodio 3 M pH= 5.2 y etanol absoluto, se dejó la mezcla 2 hrs a -70°C. Se centrifugaron las muestras 10 min a 14,000 rpm (Ependorf Centrifuge 5415C), se tiró el sobrenadante, el precipitado se seco y se re-suspendió en 25 μ L de TE.

7.10 Secuenciación

Se realizó con el estuche Thermo Sequence Cy 5.5 Dye Terminator Sequencing, que con un mínimo de 500 ng de ADN plasmídico que se llevó a 12 μ L con H₂O desionizada, se le agregó 1 μ L de cebadores marcados fluorescentemente (2-5 μ M) y se agitó suavemente, esta mezcla se le conoce como “master mix”. En las reacciones de terminación se necesitan 3 μ L de dideoxinucleótido (A,C,G,T) del estuche antes mencionado, a cada una de estas reacciones se le agregó 3 μ L de master mix, agitándose perfectamente y se sometieron a 20 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 1 min. Culminado el ciclo las mezclas se enfriaron a 4 °C y se agregaron 6 μ L de amortiguador TE. Todos los elementos anteriores se agitaron en vortex y se sometieron a 72°C por 3 min y 1 min en hielo. Para mejorar las señales de eliminación por el exceso de fluorocromos, las

mezclas antes de ser cargadas en el gel se pasaron a través de una columna de sefarosa G-50, para eliminar todos los dideoxinucleótidos y cebadores que no se incorporaron durante la extensión, las muestras se secaron utilizando vacío y se re-suspendieron en 6 μ L de amortiguador con formamida y colorante. La secuenciación se realizó en un secuenciador SEQ4x4 (Amersham Pharmacia Biotech). Los análisis de las secuencias nucleóticas, así como la traducción de secuencia a aminoácidos y los alineamientos tipo clustal fueron realizados con el programa PcGENE.

7.11. Southern blot.

Se digirieron 10 μ g de ADN genómico de cisticerco, con cuatro enzimas de restricción (Bam HI, Eco RI, Nde I, Xba I). El ADN digerido fue corrido en un gel de agarosa al 2%. El gel fue lavado en dos ocasiones por 20 min con una solución alcalina desnaturalizante (ver anexo) y posteriormente fue neutralizado con solución neutralizante (ver anexo) en tres lavados de 20 min cada uno y finalmente lavado con SSC 10X durante 10 min. El ADN separado en el gel fue transferido a una membrana de Nylon por difusión durante 24 hrs en amortiguador SSC 5x. La membrana fue lavada con luz UV (1200 μ J x 100) en un equipo UV Stratlinker 2400 (Stratagene). Una vez que el ADN es fijado se deja la membrana en solución de hibridación por 2 hrs a 55 °C antes de agregar la sonda. La sonda se incubaba a 100 °C durante 5 min. y otros 5 min. a 4 °C, pasado el tiempo se adiciona para llevar a cabo la hibridación a 55 °C durante toda la noche. Las membranas se lavaron tres veces con 100 ml de SSC 2x por 5 min en agitación. Las membranas se secaron y se expusieron a placas radiográficas toda la noche y fueron reveladas al término de exposición.

8. RESULTADOS

Habiendo realizado las técnicas anteriores se obtuvieron los siguientes resultados. Con los oligonucleótidos diseñados de motivos conservados, el ADNc y la RT-PCR se obtuvo una secuencia nucleotídica de 153 pb, la cual codifica para una secuencia de 51 residuos de aa (Figura. 9).

```
1      ACTTGGTGCGGTCCCTGTAAGGCGCTTGCTCCAAAATTAGACGAAATGGCAAAG  
      T W C G P C K A L A P K L D E M A K      18  
55     GAGAATGCTAACGTCGTCCTTTGTAAGGTCGACGTCGATGAGTGTTCAGGATGTC  
      E N A N V V F V K V D V D E C Q D V      36  
109    GCCGAGAAGTACCGAGTTACCGCCATGCCTACTTTGTTTGTGTTTC  
      A E K Y R V T A M P T L F V F      51
```

Figura 9.

Traducción de la secuencia nucleotídica del fragmento obtenido a partir del ADNc de *T. solium* mediante la RT-PCR y los oligonucleótidos Trx-5' y Trx-3 (se encuentran en negritas).

Este fragmento fue marcado con [α -³²P-dCTP] y se utilizó como sonda marcada, para el aislamiento e identificación de clonas que contuvieran la secuencia completa que codifica para la Trx citosólica de *T. solium* (TrxTs). Realizando un tamizaje de una biblioteca de ADNc construida en el fago λ gt10, se encontraron 20 clonas positivas al final del tamizaje terciario (Fig. 10). La determinación de los patrones de restricción de las clonas con las endonucleasas BamHI, EcoRI (sin imagen) sugirieron que todas eran iguales. Por lo que se escogieron las clonas de mayor tamaño (clonas 2 y 5) se preparó ADN del fago y se secuenciaron. Ambas clonas mostraron secuencias nucleotídicas idénticas a la de la figura 11.

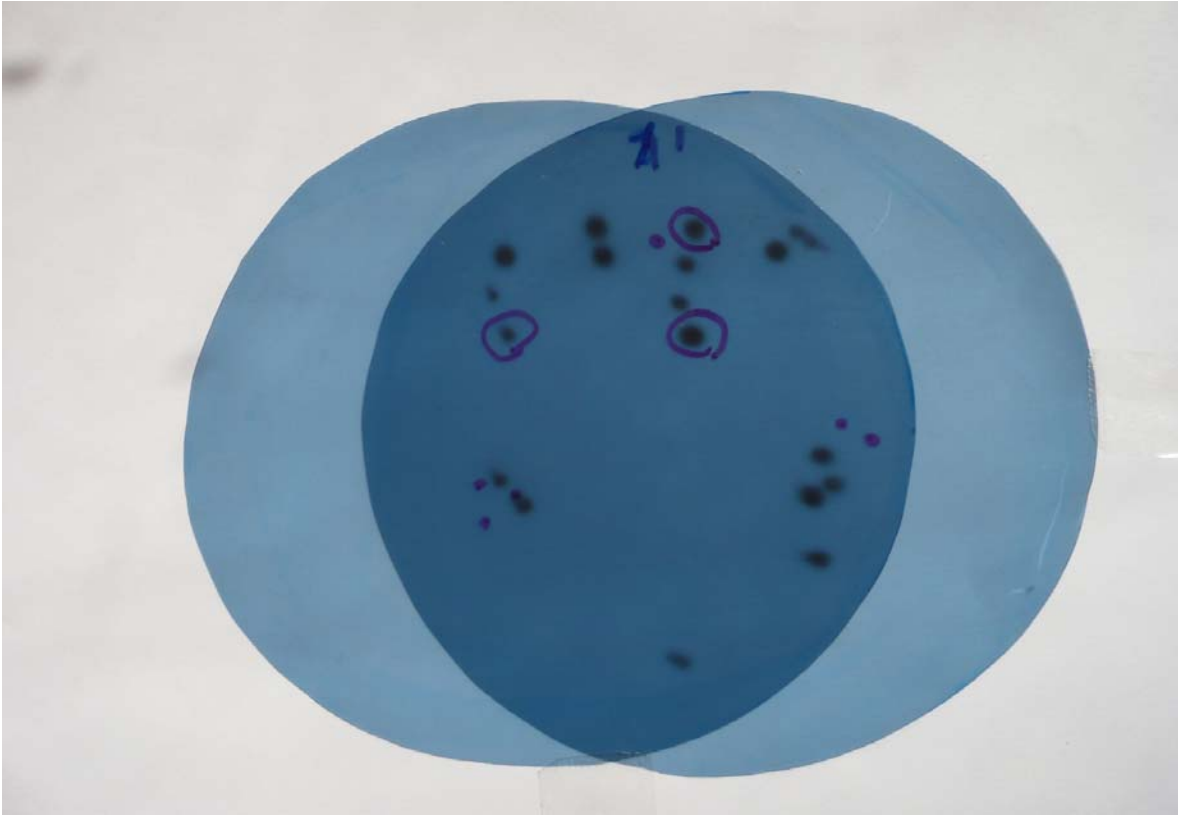


Figura 10.

Superposición de las autorradiografías de las membranas original y copia del tamizaje terciario mostrando las clonas positivas (puntos negros).

Esta Figura 11 muestra el inserto de ADNc obtenido compuesto de 428 nucleótidos, con 30 pb en la región 5'-sin traducir (5'-STD) y 73 pb en la región 3'-sin traducir (3'-STD), junto con un marco de lectura abierto que empieza en el nucleótido 31, con el codón de inicio ATG y termina en nucleótido 353 con el codón de término TGA. El ADNc codifica para una proteína de 107 aa, con una Mr = 11579 y punto isoeléctrico (pI) = 4.39. Dentro de este marco de lectura se encuentra el motivo catalítico (Cys34-Gly35-Pro36-Cys37); además esta secuencia presenta varios residuos característicos de las Trxs, como son las superficies hidrofóbicas (Gly35-Pro36), (Met76-Pro77) y (Val92-Gly93-Ala94); y los residuos cargados, Lys38, Glu58. Se observa también un sitio de poliadenilación clásico AATAAA a 25 pb del codón de término y a 20 pb de la cola de poli (A).

```

1   CAAAGAGTTACGCCATTCAGTTTTCTGAGAATGTCCGGTGGAGGTGGTTGTT
                                     M S V E A V V   7
52  AAGACGGTGGATGGTGACGGTCTTGAGGCAGCTATTAAGGGAGACAAGCTC
    K T V D G D G L E A A I K G D K L   24
103 CTCGTTTGTGATTTCTTTGCAACTTGGTGCGGTCCCTGTAAGGCGCTTGCT
    L V C D F F A T W C G P C K A L A   41
154 CCAAATTAGACGAAATGGCAAAGGAGAATGCTAACGTCGTCTTTGTAAAG
    P K L D E M A K E N A N V V F V K   58
205 GTCGACGTCGATGAGTGTTCAGGATGTCGCCGAGAAGTACCGAGTTACCGCC
    V D V D E C Q D V A E K Y R V T A   75
256 ATGCCTACTTTGTTTGTGTTCAAGAACGGGAATGAAATCGGTCGTGTCGTC
    M P T L F V F K N G N E I G R V V   92
307 GGAGCCAATGAGGCTAGCATTAGGGAACCTTATCCAAGCAAACGTCTAGTC
    G A N E A S I R E L I Q A N V -   107
358 ATATATTTAAGAACTATTTCAAATAAAAATCTTATCGTGCTCTTGTCTAAA
410 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 11.

Secuencia nucleotídica y de aminoácidos obtenidos del ADNc clona 5. Los números de la izquierda son referentes a los nucleótidos y los de la derecha a los aminoácidos traducidos correspondientes en cada línea. Los aa subrayados corresponden a la sonda que se obtuvo para el tamizaje. Los codones de inicio y término aparecen en rojo. El motivo catalítico está doblemente subrayado. Las regiones hidrofóbicas están sombreados en gris claro y los residuos de aa en cajas. El sitio de poliadenilación clásico está en negritas y subrayado.

A partir de la secuencia primara obtenida de la secuencia nucleotídica del ADNc de la clona 5, se realizó una comparación de la TrxTs por medio de un alineamiento múltiple con homólogos de esta Trx de otros organismos biológicos (Figura. 12).

```

Trx Ts      MSVEAVVKTVDGDGLEAAIKGDKLLVCDF FATW CGPC KALAPKLDMAKENA-NVVFVKV 59
Trx Eg      MSVEAVVKQVDGDALEAAIKGDKLLVCDF FATW CGPC KSLAPKLDAMAKENE-KVIFVKL 59
Trx Hs      MVKQIESKT--AFQEALDAAGDKLVVDF SATW CGPC KMIKPPFHSLSEKYS-NVIFLEV 57
Trx Mm      MVKLIESKE--AFQEALAAAGDKLVVDF SATW CGPC KMIKPPFHSLCDKYS-NVVFLEV 57
Trx Ss      MVKQIESKY--AFQEALNSAGEKLVVDF SATW CGPC KMIKPPFHSLSEKYS-NVVFLEV 57
Trx Sm      MSKLIELKQDGDLESLLEQHKNKLVVDF FATW CGPC KTIAPLKFELSEKY--DAIFVKV 58
Trx Ec      MSDKI IHLTDDSFDTDVLKADG-AILVDF WAEW CGPC KMIAPILDEIADEYQGLTVAKL 59
          *          : : * * * * * * * * * * * : * : . : . : . : . : . :
          -   5   10   15   20   25   30   35   40   45   50   55

Trx Ts      DVDECQDVAEKYRVTAMP TLFVFKNGNEIGRV VGAN-EASIRELIQANV- 107
Trx Eg      DVDECQDVAEKYRVTAMP TLIVFKNGCEIGHV VGAN-EAGIRELIQANA- 107
Trx Hs      DVDDCQDVAESECEVKCMPT FQFFKKGQKVGEF SGAN-KEKLEATINELV- 105
Trx Mm      DVDDCQDVAADCEVKCMPT FQFFYKKGQKVGEF SGAN-KEKLEASITEYA- 105
Trx Ss      DVDDCQDVAESECEVKCMPT FQFFKKGQKVGEF SGAN-KEKLEATINELI- 105
Trx Sm      DVDKLEETARKYNISAMP TFIAIKNGEKVGDV V GAS-IAKVEDMIKKFI- 106
Trx Ec      NIDQNPGTAPKYGIRGIPT LLLFKNGEVAATKV GALS KGLKEFLDANLA 109
          : : * . . * . : : * * : * * . * * : . :
          60   65   70   75   80   85   90   95   100  105

```

Figura 12.

Alineamiento múltiple de secuencias de Trxs realizados con el programa ClustalW. Secuencia de amino ácidos homologas a Trx Ts: Trx Hs: *Homo sapiens* (AAH54866.1), Trx Mm: *Mus musculus* (CAA54688.1), Trx Ss: *Sus scrofa* (AAK60272.1), Trx Sm: *Schistosoma Mansoni* (AAL79841.1), Trx Eg: *Echinococcus granulosus* (AAC14584.1), Trx Ec: *Escherichia coli* (YP_001746100.1). Los residuos idénticos se indican con asteriscos, las sustituciones conservadas se indican con dos puntos y las sustituciones semi-conservados se indican con un punto. El motivo catalítico, se muestra encerrado en un cuadro, las regiones planas e hidrofóbicas se muestran sombreadas en gris medio, el residuo cargado que ayuda en el intercambio de e⁻, se muestra en sombra gris oscuro.

TrxHs	TrxMm	TrxSs	TrxSm	TrxEg	TrxEc	TrxTs	Alineamiento
	87	94	42	37	22	39	Trx Hs
		86	40	37	24	39	Trx Mm
			42	35	21	38	Trx Ss
				38	29	39	Trx Sm
					33	87	Trx Eg
						34	Trx Ec

Tabla 1 Porcentajes de identidad entre las Trxs.

En el alineamiento múltiple de TrxTs se presenta un número significativo de residuos idénticos entre las Trxs. Estos alineamientos mostraron porcentajes de identidad desde 21 a 94% (Tabla 1).

El análisis tipo Southern blot (Fig 13) del ADN genómico de cisticerco fue digerido con enzimas de restricción y al ser enfrentado contra el ADNc marcado con [α - 32 P-dCTP]. Mostró que este hibridó con diferentes tamaños de fragmentos del ADN genómico que van desde aproximadamente 19 kbp a 0.5 kbp (Figura. 13).

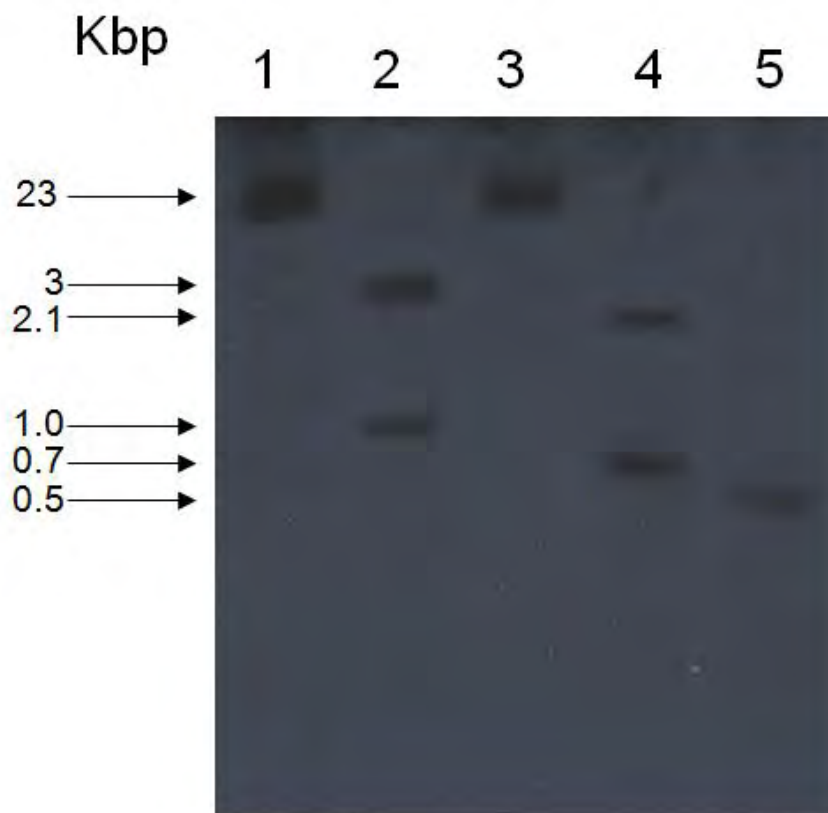


Figura 13. Southern Blot de ADN genómico digerido con enzimas de restricción e hibridado con el ADNc de TrxTs. Aparecen del lado izquierdo los pesos moleculares en kilo pares de bases y se muestra cada carril correspondiente a la enzima de restricción utilizada: 1. Control, 2. XbaI, 3. EcoRI, 4. BanHI, 5. NdeI, con sus respectivas bandas.

9. DISCUSIÓN

Al lograrse obtener un fragmento de ADN de 153 pb que codifica para los 51 residuos de aminoácidos de tamaño esperado, comprobó que el diseño de los oligonucleótidos realizados sobre los sitios conservados y el espacio que entre ellos existe es altamente conservado en todas las Trx conocidas hasta la fecha. Este fragmento además presenta residuos característicos (ver figura 9) de las regiones hidrofóbicas Met-Pro-Thr, Val-Gly-Ala y las cisteínas del sitio catalítico (Cys-Gly-Pro-Cys). Lo que sugiere que el fragmento codifica para una Trx de *T. solium*, demostrando también que este es un método para la obtención de sondas y aislamiento de genes completos a partir de bibliotecas de ADNc que codifican para proteínas que se desean clonar, como es el caso.

Una vez obtenido el fragmento se utilizó como sonda para aislar el ADNc de interés (TrxTs) por medio de tamizajes realizados a una biblioteca de ADNc de larva construida en el fago λ gt10^{57, 58}. Para el aislamiento del ADNc que codifica para una Trx, se utilizaron 45,000 fagos de la biblioteca^{59,60}. Al final de este tamizado se logró aislar 20 clonas, lo cual indica que el transcrito está representado en la biblioteca en un 0.044% aproximadamente, esto sugiere que existe en bajas concentraciones dentro de *T. solium*. Al ser analizadas estas clonas mediante endonucleasas de restricción se encontró que el patrón de corte es idéntico en todas ellas. Ya que presentaban el mismo patrón de corte por las endonucleasas utilizadas; se escogió la clona de mayor tamaño que era alrededor de 1 kb, esto para asegurarnos de tener la secuencia completa puesto que la mayoría de las Trx presentan un PM de alrededor de 12,000 da. Se utilizó la clona 5 para ser secuenciada y analizada.

El ADNc contenido en la clona 5 del fago λ gt10 se clonó en el vector pCRII, su secuencia presentó 428 nucleótidos (ver figura 11). Presentando una región de 30pb en la región 5'-sin traducir (5'-STD) antes del codón de inicio y después del codón de término una región 3'-sin traducir (3'-STD) con 73 pb, la cual presenta en ella una señal de poliadenilación clásica AATAAA y una cola de poli (A) de 20 b.

El análisis de la secuencia primaria muestra que la metionina de inicio (ATG) se encuentra en la posición 31 donde inicia un marco de lectura abierto (ORF) hasta el codón de termino (TGA) en el nucleótido 354 que codifica para una proteína de 107 aa, misma que corresponde para una Trx con peso molecular teórico de 11,579 Da y un punto isoeléctrico (pI) predictivo de 4.39, siendo esta Trx de menor peso que las Trx reportadas. Esta proteína carece de un péptido señal como lo presentan las Trx mitocondriales; así mismo presenta residuos característicos de las Trx tal como el motivo catalítico Cys33-Gly34-Pro35-Cys36 con su residuo aromático Trp32 y el residuo cargado Lys37.

Cabe mencionar que el análisis del alineamiento múltiple de la Trx *Ts* con otras Trx citósolicas muestra los residuos hidrofóbicos (Gly34-Pro35), (Met75-Pro76) y (Val91-Gly92-Ala93) los cuales estabilizan la interacción de las cisteínas del sitio activo reportadas por Holgrem^{34,56}. Es interesante observar que la Trx *Ts* cuenta con otras dos Cys independientes a las ubicadas en el sitio catalítico estas Cys se localizan en las posiciones 26 (β 2) y 64 (α 3), mismas que difieren en dos de las tres Cys presentes en las Trx de mamífero estas se encuentran en las posiciones 64 (α 3), 71 y 75 (β 4); las Cys 64 y 71 sirven como otro sitio de intercambio SH₂-S₂ en la Trx de mamífero mismo del que carece la Trx *Ts*, sin embargo las Cys26 y 64 de Trx *Ts* son importantes ya que pueden estabilizar la catálisis. Otra diferencia importante en Trx *Ts* es la sustitución del residuo Cys75 por Ala75 el cual puede evitar la formación de un homodímero que inactive al sitio catalítico haciéndolo poco accesible, en su lugar este puede favorecer la interacción hidrofóbica del sitio catalítico.⁶⁷ Dentro de esta comparación se también se observan diferencias entre las Cys de Trx *Ts* y Trx *Ec* a pesar de que estas provienen de la misma clase y familia de helmintos enfocándose en la secuencia de Trx *Ec* tres Cys más, a parte de las que se encuentran en el sitio catalítico, siendo estas Cys26 (β 2), Cys 64 (α 3) y Cys86 cerca del amino terminal de (β 5) (ver figura 12).

El análisis del alineamiento de Trx *Ts*, muestra un porcentaje de identidad del 87 % con la de *E. granulosus*, 39 % con la de *H. sapiens*, *M. musculus* y *S. mansoni*,

38% con *S. scrofa*, 35% con *C. elegans* y un 34% con *E. coli*. TrxTs presenta mayor identidad con *E. granulosus*, ya que estos son organismos relacionados puesto que pertenecen a la misma familia. Como se observa la TrxTs tiene una identidad pobre con respecto a las Trx de mamíferos, lo que la hace muy interesante porque estas regiones diferentes podrían usarse como antígenos vacunales.

Basado en los análisis realizados entre la TrxTs y la Trx de *E. coli* y conociendo su estructura terciaria de esta última, se observó que la TrxTs presenta cadenas- β y hélices- α , que formarían segmentos $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (1 a 59) y $\beta\beta\alpha$ (76 a 107) junto con un segmento de unión de 18 residuos en forma de hélice, lo que confirma que la TrxTs presenta la firma de las Trx ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$). Sin embargo la resolución de la estructura correspondiente deberá confirmar esta firma con la difracción de rayos X de un cristal de la TrxTs. (ver Anexo III).

Por otro lado, los análisis obtenidos del Southern blot sugieren que el gen que codifica para la TrxTs en el genoma de *T. solium* es de copia única, debido al patrón simple que se observó en el mismo.

La información obtenida en este trabajo de la caracterización de un ADNc que codifica para una TrxTs citosólica, permitirá en el futuro producir una Trx recombinante que permita conocer su estructura cristalina, su ubicuidad, mecanismo catalítico, su actividad oxido-reductora involucrada en la protección de moléculas dañadas por las ERO, su regulación en la expresión de genes y en la apoptosis, además podría ser utilizada como desarrollar vacunas o para desarrollar fármacos que inhiban su actividad anulando su actividad reductora para destruir al parásito.^{50,65,66}

10. CONCLUSIONES:

- Se obtuvo una sonda de ADNc (321 pb) que codifica para una Trx.
- *Taenia solium* cuenta con un gen que codifica para una tiorredoxina citosólica.
- El Southern blot sugiere que el gen para la TrxTs en el genoma de *T. solium* es de copia única.
- Este trabajo demuestra por primera vez la caracterización parcial de una Trx citosólica en este parásito.
- Asimismo, abre un campo para estudiar más a fondo el metabolismo de oxido-reducción en Cestodos.

Anexo I

Soluciones

Agar LB: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.05% (p/v), NaCl 1% (p/v) y agar bacteriológico 1.5% (p/v).

Agar SOBM: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v). NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y agar bacteriológico 1.5% (p/v).

Agar top SOBM: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v). NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y agar bacteriológico 0.7 % (p/v).

Amortiguador de cargado (DNA): EDTA 0.2 M, azul de bromofenol 0.1%, xileno de cianol FF 0.25%, Ficoll en H₂O 15%.

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

Amortiguador TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0.

Amortiguador WB: PBS 1X, Tween 0.3% (p/v), leche en polvo 5% (p/v).

Gel de agarosa 2%: Agarosa 1g, amortiguador TAE 50mL, bromuro de etidio 4 µL.

Medio LB: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.05% (p/v), NaCl 1% (p/v).

Medio SM: NaCl 0.58% (p/v), MgSO₄ • 7 H₂O 0.2% (p/v). Tris-HCl 0.05% (p/v) pH= 7.5

PBS: Fosfato monobásico de sodio 0.001M, fosfato dibásico de sodio 0.01M, cloruro de sodio 0.15M pH= 7.2

Solución 1: EDTA 10mM, Glucosa 50 mM, Tris 25mM pH =8.0

Solución 2: NaOH 0.2M, SDS 1% (p/v).

Solución 3: Acetato de Amonio 7.5M.

Solución bloqueadora para inmunoelectrotransferencia: PBS, Tween 0.3% (p/v) y leche descremada Svelty de Nestlé al 0.5% (p/v).

Solución de lavado: NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM pH=7.2, EDTA 2 mM, etanol 50% (v/v).

Solución PEG: PEG 20% (v/v), NaCl 2M en 2% (v/v).

Solución de hibridación: SSC 5X, formamida 50% (v/v), SDS 0.2% (p/v).

Solución alcalina desnaturizante: NaOH 0.5M, NaCl 1.5M.

Solución neutralizante: Tris-HCl 1M, NaCl 1.5 M, pH 8.0

Solución SSC 5X: NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075M

Anexo II

Enzimas de restricción

*Bam*H I 5'-G↓GATC C-3'
 3'-C CTAG↑G-5'

Hind III 5'-A↓AGCT T-3'
 3'-T TCGA↑A-5'

Nde I 5'-CA↓TA TG-3'
 3'-GT AT↑AC-5'

*Xba*I 5'-T↓CTAGA-3'
 3'-AGATC↑T-5'

Anexo III

COMPARACION ESTRUCTURAL DE *TrxTs* VS *TrxEc*

```
Taenia                   HSVSAVYKTVDGDGLEAAIKGDKLLVCDFEATWCGPCKALAPKLDENAKEN-ANVYFVKV 59
E. coli                   -MSDKLIHLTDLNSELTVYLRADGALLVDFMAENUGPCKRLAELLLRDADEYQPKLTYAKL 59
                          : : : : . * . .     . : * . *     : : * * : * * * * *     : * * * * : * . *     . : : . . . * :
                              5        10        15        20        25        30        35        40        45        50        55

Taenia                   DVDECDVAEKYRVTAMPLEVEKNGNEIGRVVGAN-EASIRELIQANV- 107
E. coli                   NTDQNDQFAKRYCTRICTDPTTITPKNGRVAATKVCATSRKQQLWRPTDANTA 109
                          : : * :     . * * * :     . : * * * : * * * * :     .     * * *     : . . : : * : : * * :
                              60        65        70        75        80        85        90        95        100        105
```

Se presentan las cadenas β en rojo y en verde las hélices α

BIBLIOGRAFÍA

1. 14^a. Reunión interamericana a nivel ministerial en salud y agricultura, Ciudad de México, D.F., México, 21-22 de abril de (2005)
2. Allan J C., Wilkins P P., W. Tsang V C., Craig P S., Immunodiagnostic tools for taeniasis, Acta Tropica.; (2003) 87:87- 93
3. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J, Larralde C *et al.* Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. México, D.F.: Biblioteca de la Salud, Fondo de Cultura Económica, (1987).
4. Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP., Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Archives of medical research; (1994) 25: 325-330
5. Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. A, *Taenia solium* metacestode factor nonospecifically inhibits cytokine production, Parasitol Res.:(1998) 84:117-122
6. Arnér J. E S, Holmgren A, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, Eur. J. Biochem.; (2000) 267: 6102-6109
7. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol.; (1996) 271: C1424-C1437
8. Bowler RP, Crapo JD, Oxidative stress in allergic respiratory diseases J Allergy Clin Immunol.; (2002)Vol. 110, No. 3, pág: 349-346
9. Brown T., Hybridization analysis of DNA blots., Curr Protoc Immunol. Wiley Interscience, (2001) May; Capitulo 10: Unidad 10.6B.
10. Cadenas E, Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem; (1989) 58:79-110.
11. Cárdenas F. Quiroz H, Meza A, Plancarte A, Flisser A., Cisticercosis intraocular. En: A Flisser, F Malagón (eds.) Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México D. F. (1989), pág:107-124

12. Carvalho A P, Fernandes P A, Ramos M J, Similarities and differences in the thioredoxin superfamily. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* .; (2006) 91:229–248
13. Chalar C, Martínez C, Agorio A, Salinas G, Soto J, Ehrlich R, Molecular cloning and characterization of a Thioredoxin Gene from *Echinococcus granulosus*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*; (1999) 262: 302-307
14. Chater G, García N, Peña G, Dau A, Bermúdez B, Hakim F, Jiménez E Neurocisticercosis. *Acta Neurol Colomb*; (2008) 25:42-53.
15. Chaudieá re J., Ferrari-Liou R, Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*; (1999)37; 949-962
16. Chauthaiwale V. M., Therwath A., Deshpande V V., Bacteriophage Lambda as a Cloning Vector, *Microbiological reviews*; (1992) Vol. 56, (4):577-591
17. Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodezky C, Flisser A, Heterogeneity of humoral immune componentes in human cisticercosis. *J Parasitol.*; (1985) 71(5):535-541
18. Diccionario de especialidades farmacéuticas PLM 2008
19. Drögue W, Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev*; (2002) 82:47-95.
20. Espinosa N., Hernández R., López-Griego L., López-Villaseñor I., Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs, *Gene*; (2002) 289:81-86
21. Flisser A, Vargas-Parada L, Laclette J.P., *Taenia solium*: un parásito cosmopolita; (2006) revista investigación y ciencias.
22. Flohé L, Harris J. R., *Peroxiredoxin Systems Subcellular Biochemistry*, Springer, United States; (2007) Vol. 44, capítulo 1-17.
23. Gadaska JR, Hill SR, Kirkpatrick L, Montfort W, Weichsel A, Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys^{73>} Ser mutation, *Biochem. Pharmacol.*, (1996) 52(11):1741-47.

24. García H H., Del Brutto O H., Imaging findings in neurocysticercosis, *Acta Tropica*; (2003) 87:71- 78
25. García H., González A., Del Brutto O., Tsang V, Llanos-Zavalaga F, Gonzalez G, Romero J, Gilman R. Strategies for the elimination of taeniasis/cisticercosis., *Journal of the Neurological Sciences*; (2007) 262:153-157.
26. Gutteridge J M.C, Halliwell B, Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000,"A Historical Look to the Future",136-147
27. Halliwell B (2006), Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, Vol. 141, pág: 312-322
28. Handali S, Klarman M, Gaspard A N., Noh J, Lee Y-Mui, Rodriguez S, Gonzalez A E., Garcia H H., Gilman R H., W. Tsang V C., Wilkins P P., Multiantigen Print Immunoassay for Comparison of Diagnostic Antigens for *Taenia solium* Cysticercosis and Taeniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*; (2010) 68–72
29. Hattori M., Sakaki Y., Dideoxy Sequencing Method Using Denatured Plasmid Templates, *Analytical Biochemistry*; (1986)152:232-238
30. Henkle-Dührsen K., Kampkötter A., Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes, *Molecular & Biochemical Parasitology*; (2001)114: 129–142.
31. Herrera L A., Benítez-B L, Sotelo J, Ostrosky-W P, La quimioterapia de la cisticercosis. Revisión acerca de su farmacocinética y toxicología. *Gac Méd Méx.*; (2000) Vol. 136 No. 5
32. Holmgren A, Thioredoxin, *Ann Rev. Biochem.*; (1985) 54: 237-71
33. Holmgren A, Thioredoxin and glutaredoxin systems, *J. Biol. Chem.*; (1989) 264:13963-6
34. Holmgren A, Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 1995 (3):239-43.

35. Jee C, Vanoaica L, Lee J, Jae P. B, Ahnn J, Thioredoxin is related to life span regulation and oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*; (2005) 10:1203–1210
36. Kalinina E. V, Chernov N. N, Saprin A. N, Involment of Thio-, Peroxi, and Glutaredoxins in Cellular Redox-Dependent Processes. *Biochemistry (Moscow)* 2008, Vol. 73 No. 13: 1493-1510.
37. Kraft R., Cysticercosis: An Emerging Parasitic Disease, *American Family Physician*; (2007) July, Vol. 76, No. 1
38. Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.*; (1993) 60 (2):343-347
39. Larralde C., de Aluja A, y colaboradores. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. México D.F.: Fondo de Cultura Económica, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud, (2006)
40. Lech K, Brent R, Plating lambda phage to generate plaques, *Curr Protoc Mol Biol.* (2001) May; Capitulo1:Unidad 1.11.
41. López-Cepeda L, Proaño J, Ambrosio J, Ávila-Ramírez G, Ana Flisser. Estudio de individuos con teniosis y su asociación con enfermos con neurocisticercosis. *Rev Fac Med UNAM*; (2001) Vol.44 No.4
42. Mahanty S, Garcia H. H, Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system, *Progress in Neurobiology*(2010) 91:172–184.
43. Malagón F. Elementos del binomio taeniasis/cisticercosis. Una síntesis. En: Flisser A, Malagón F, ed. *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México*. México, D.F, Limusa Noriega, (1989):3-7.
44. Mayta H, Gilman R H, Prendergast E, Castillo J P., Tinoco Y O., Garcia H H, Gonzalez A E., Nested PCR for Specific Diagnosis of *Taenia solium* Taeniasis, *Journal of clinical microbiology*: (2008), pág: 286-289.

45. Meyer Y, Buchanan B B., Vignols F, Reichheld J F., Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology, *Annu. Rev. Genet.*; (2009) 43:335-367.
46. Neilson J R., Sandberg R., Heterogeneity in mammalian RNA 3' end formation, *Experimental Cell Research*; (2010)316:1357-1364
47. Norma Oficial Mexicana, NOM-021-SSA2-1994, Para la vigilancia, prevención y contro del complejo Taeniosis/Cisticercosis en el primer nivel de atención médica.
48. Otero L, Bonilla M, Protasio A V, Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths. *BMC Genomics*; (2010) 11:237
49. Powis G, Montfort W R, Properties and Biological activities of thioredoxins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.*; (2001) 30:421-55
50. Rabiela MT, Hornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del-Rosal E, Flisser A, Evagination of *Taenia solium* Cysticerci: A Histologic and Electron Microscopy Study, *Archives of Medical Research*; (2000) 31:605-607
51. *Rev Mex Patol Clin*, (2002) Abril - Junio, Vol. 49, No. 2, pág: 92-99
52. Sarti E., La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*, *Salud pública de México*; (1997) Vol.39 No.3
53. Sayed AA, Simeonov A, Thomas CJ, Inglese J, Austin CP, Williams DL, Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nature Medicine*; (2008) Apr;14(4):407-12.
54. Sies H, Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*; (1996) 82:291- 295
55. Sloan L., Schneider S., Rosenblatt J., Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay for Serological Diagnosis of Cysticercosis, *J. Clin. Microbiol*; Vol. 33, No. 12, pág:3124-3128
56. Smyth J.D, McManus D.P, The physiology and biochemistry of cestodes, Cambridge University Press, (1987) Great Britain
57. Southorn PA, Powis G, Free Radicals in Medicine: Chemical nature and biologic reactions, *Clin. Proc*; (1988) 63:381-389

58. Štefanková P., Kollárová M., Barák I., Thioredoxin - Structural and Functional Complexity, *Gen. Physiol. Biophys*; (2005) 24: 3-11
59. Tay J, Salazar PM, Haro I, Bucio MI. Frecuencia de las helmintiasis intestinales en México. *Rev Invest Salud Públ*; (1976) 36:241-280.
60. Tonissen K F., Wells J R.E., Isolation and characterization of human thioredoxin-encoding genes. *Gene*; (1991) 102: 221-228
61. Tsang V, Brand A, Boyer A. An enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*; (1989) 159:50-59.
62. Watson J D., Gilman M., Witowski J., Zoller M., Recombinant DNA, Scientific American Books, 2a edición; Capítulos 5-7
63. Wilkins P P, Allan J C., Verastegui M, Acosta M, Eason A G., Garcia H. H, Gonzalez A E., Gilman R H., W. Tsang V C., Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; (1999) 60(2):199–204
64. Willms K, Fernández Presas AM, Jiménez J. A., Landa A., Zurabián R., Juárez Ugarte ME, Robert L., Taeniid tapeworm responses to in vitro glucose, *Parasitol Res*; (2005) 96: 296-301
65. Willms K, Robert L., Caro J A., Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters, *Parasitol Res*; (2003) 89:308-316
66. Willms K. Morphology and biochemistry of the pork tapeworm, *Taenia solium*. *Curr Top Med Chem*; (2008), 8(5):375-82.
67. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VCW. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis*; (1991) 164:1007-1009.

REFERENCIA ELECTRÓNICA

1. Gen Bank: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank, 4 Julio 2010
2. Programa de alineamiento múltiple: www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html, 4.julio.2010