



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“Aislamiento del ADN complementario (ADNc) que codifica  
para la Glioxalasa I (GLO-I) de *Taenia solium*”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

NARDA KARINA CASTRO NOLASCO



MEXICO, D.F.

2011



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Gutiérrez Ramos Abel

**Vocal:** Pedraza Chaverri José

**Secretario:** Landa Piedra Abraham

**1er. Suplente:** Plasencia De la Parra Francisco Javier

**2do. Suplente:** Cordero Hernández José

El trabajo de investigación que a continuación se presenta fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*, el cual pertenece al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el contrato 80134 (Desarrollo de fármacos biológicos contra *Taenia solium*) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN206708-3 (Utilización de enzimas glicolíticas en el control de cisticercosis).

---

**Dr. Abraham Landa Piedra** (Asesor del proyecto).

---

**Narda Karina Castro Nolasco** (Sustentante).

A mis abuelos José y Elena porque ser mis ángeles de la guarda, se que desde el cielo me bendicen y cuidan y a mi abuela Genoveva por ser la mensajera de esas bendiciones aquí en la tierra.

## AGRADECIMIENTOS

“En las batallas de la vida no siempre gana el hombre más fuerte o el más veloz, si no que tarde o temprano triunfa aquel hombre que cree que puede triunfar”

Vince Lombardi

Antes de comenzar con mis agradecimientos me gustaría mencionar que si bien no estoy ganando el premio más importante o con mayor reconocimiento en la vida, este es un gran salto si no para la humanidad si para mí, me siento sumamente feliz y orgullosa de mi porque se cierra una puerta pero estoy segura que podre abrir muchas más y con un gran apoyo que son las personas que a continuación menciono y a las cuales nunca dejare de agradecerles.

En primer lugar quiero agradecer a Dios enormemente por haberme permitido llegar a concluir esta prueba tan importante y maravillosa en mi vida, se que crees en mi por eso no solo me abriste las puertas de tu corazón si no del mundo entero para llegar a la meta con éxito, también te agradezco por la hermosa y enorme familia que elegiste para mí y por todas a las oportunidades que me has brindado hasta la fecha, pero sobre todo gracias por llenarme de bendiciones.

A mis padres María del Carmen y Tirso a los cuales les debo todo y les dedico esta gran victoria, por ser el motor que me impulsa a triunfar cada día y nunca limitarse en llenarme de amor, alegría, consejos, enseñanzas, porque con ustedes he compartido la esencia de la vida y a ustedes les debo mi creación, por ser los mejores padres si no del mundo los mejores para mí y qué más puedo pedir si me dieron a los hermanos más extraordinarios los más divertidos, comprensivos y trabajadores con los cuales compartí, sigo y seguiré compartiendo cada momento a José Antonio, Gutberto, Beatriz y a ti hermana la más hermosa de mis hermanas y mi mejor amiga Kenia, por ser mi más grande inspiración y mi ejemplo a seguir.

A mis sobrinos José Gutberto y Juan Carlos mis duendes amados por ser la cereza de mi pastel, porque sin ustedes mi vida no sería lo que es.

También quiero agradecer a mi segunda casa, mi querida Universidad - UNAM y a mí siempre amada Facultad de Química, en la cual no solo aprendí conocimientos, actitudes, habilidades si no que emprendí el misterioso camino de la química, además de formar parte de experiencias inolvidables de las cuales me llevo muchos de los mejores recuerdos y porque fue aquí en donde mi sueño de ser Químico comenzó y llego a concluir con éxito y satisfacción.

Agradezco a mis amigos y por derecho de antigüedad a ti María José porque en resumen eres simplemente genial y mi mejor amiga, a Ana Laura, Miriam, Navil, Katia, Jaritz y Lupita por que se que siempre creyeron en mi mil gracias.

A mis amigos de las Donas con los cuales compartí el primer semestre de la carrera y a los cuales aprendí a querer como mi familia a Erika, Ingrid, Luis, Pilar, Mitzy, Adán, Carolina, Cecilia y Maribel, gracias por compartir parte de ustedes conmigo es un placer.

A unos de los seres más especiales en mi vida, les agradezco por haberse cruzado en mi camino, por ser unas extraordinarias personas, por nunca dejarme caer, creer, escucharme y confiar en mí, por hacerme reír, dejarme conocerlos, ser sensibles, únicos, por estar siempre a mi lado y enseñarme que siempre debo ver hacia delante y que el mundo te muestra una mejor cara cuando le sonríes y tienes una buena actitud, pero sobre todo por formar parte de mis mejores amigas y amigos, compartir conmigo momentos químicos y dejarme quererlos a ustedes: Angélica (Angeles), Luz (Bochito), Noelia (Nove), Miriam (Merialise), Tania (Tanis), Isaac (Inde), Joel, Paulina (Clon), Sujhey (Sujhi), Rodrigo (Tortis) y Guillermo (Memo).

A Gualito e Iliria (buenos amigos y colegas) y a todos mis compañeros de la generación 2006-2010 que hicieron muy placentera mi estancia en esta hermosa universidad gracias por ayudarme cuando lo necesite, porque todos ustedes pusieron un granito de arena para que llegara a este momento tan especial.

Y no no creas que me olvido de ti mi hermana GLO-II (Areli), solo era para darle tensión a este momento por ser mi siempre y muy fiel acompañante, porque contigo aprendí lo que es hacer experimentos hasta morir, te lo agradezco porque siempre me apoyaste cuando lo necesite no solo en la tesis, servicio y escuela si no también en mi vida que a veces se tornaba un tanto estresante, eres muy especial para mí y lo sabes.

Agradezco a mis maestros, pero en especial a mis profesores José Cordero por que no solo es un buen maestro, si no también es un buen tutor y colega gracias y a los profesores Alejandro Camacho y Luis Manuel Peréa por ser mis tutores en el programa 121, brindarme su apoyo e impulsarme en el área de la docencia, ser pacientes y unas personas extraordinarias conmigo.

De la misma forma agradezco a la Químico Patricia Arzate por haberme permitido y darme la oportunidad de conocer el ámbito profesional en el cual los Químicos de este país podemos desarrollarnos, lo cual me ha hecho crecer y madurara personal, académica y profesionalmente, por haber estado conmigo como mi tutora desde mi servicio social, mis más sinceros agradecimientos.

Agradezco a la M en C. Patricia de la Torre de la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, por haber dedicado tiempo en secuenciar el fragmento obtenido para la GLO-I, la cual fue una etapa indispensable en este proyecto.

Finalmente agradezco todo el laboratorio de biología molecular de *Taenia solium*, Facultad de Medicina UNAM, porque gracias a este sitio pude desarrollar el proyecto que hoy en día presento y con el cual cumpla uno de mis tantos propósitos y metas en la vida y a todo el personal que en el labora a la M en C. Alicia Ochoa (Técnico Académica), a la Dra. Lucia Jiménez por todas sus enseñanzas en el campo de la Biología molecular, a el Dr. Ricardo porque siempre nos apoyo con nuestros experimentos al igual que el Q.F.B y

próximo M en C. Oscar al cual molestaba cuando no sabía qué hacer y a el excelente equipo Landa: Vera Lucia, Janet, Sandra, Vera y Magda gracias.

Pero muy en especial al Dr. Abraham Landa por aceptarme en su laboratorio y querer ser mi tutor, apoyarme en cada experimento, dedicar tiempo al proyecto y a las revisiones del mismo, ser un gran guía, un gran ser humano y finalmente una persona muy divertida gracias.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>Resumen</b>	<b>12</b>
<b>I. Introducción</b>	
1.1 Historia y clasificación taxonómica de <i>Taenia solium</i>	13
1.2 Aspectos anatómicos de <i>Taenia solium</i>	14
1.3 Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	17
1.4 Importancia del Binomio Teniasis y cisticercosis	20
1.5 Sintomatología, diagnóstico y tratamiento de la teniasis	22
1.6 Sintomatología, diagnóstico y tratamiento de la neurocisticercosis	24
1.7 Cisticercosis porcina	26
1.8 Respuesta inmunológica contra <i>Taenia solium</i>	27
1.9 Sistema de desintoxicación	30
1.10 Sistema de las Glioxalidas (GLO-I y GLO-II)	31
1.11 Estructura de la GLO-I	34
1.12 Características de la GLO-I en algunos organismos	35
<b>II. Justificación</b>	<b>37</b>
<b>III. Hipótesis</b>	<b>38</b>
<b>IV. Objetivos</b>	<b>39</b>

<b>V. Materiales y Métodos</b>	
5.1 Material Biológico	40
5.2 Producción de la sonda de ADNc	40
5.3 Purificación del fragmento de ADNc	41
5.4 Titulación de la biblioteca de $\Lambda$ gt10	42
5.5 Aislamiento de clonas	43
5.6 Marcaje de la sonda	46
5.7 Recuperación de ADNc de fagos	47
5.8 Purificación de ADNc a partir de fagos	47
5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
5.10 Ligación	49
5.11 MINIPREP	49
5.12 BIG PREP	50
5.13 Secuenciación	51
5.14 Digestión con endonucleasas de restricción	52
5.15 Experimento in vitro con cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	52
<b>VI. Resultados</b>	<b>54</b>
<b>VII. Discusión de Resultados</b>	<b>64</b>
<b>VIII. Conclusiones</b>	<b>70</b>
<b>IX. Anexos</b>	<b>73</b>
<b>X. Bibliografía</b>	<b>74</b>

## **ABREVIATURAS**

%.....	Porcentaje
µg/mL.....	Microgramos por mililitro
µL.....	Micro litros
µm.....	Micrómetros
Abs.....	Absorbancia
ADN.....	Acido desoxirribonucleico
ADNc .....	ADN complementario
AGES.....	Productos finales de la glicación avanzada
ATP.....	Adenosin trifosfato
BrEt.....	Bromuro de etidio
c.b.p.....	Cuanto baste para
cm.....	Centímetros
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de carbono
d NTP's.....	Trifosfato de desoxirribonucleotidos
DAP .....	Dihidroxiacetona fosfato
DL50.....	Dosis letal 50
DTTP.....	Trifosfato de dideoxinucleotidos
EDTA.....	Ácido hidroxietilendiaminotriacético
GAP.....	Gliceraldehído 3-fosfato
GLO's.....	Glioxalasa
GLO-I .....	Glioxalasa I
GLO-II.....	Glioxalasa II
GSH.....	Glutati3n reducido
h .....	Hora
H <sub>2</sub> O M.Q.....	Agua doblemente desionizada

H <sub>2</sub> O.....	Agua
hrs .....	Horas
KDa.....	Kilo Daltones
M.....	Concentración Molar
m.....	Metros
MgCl <sub>2</sub> .....	Cloruro de magnesio
MGO.....	Metil glioxal
MgSO <sub>4</sub> .....	Sulfato de Magnesio
min .....	Minutos
mL.....	Mililitros
mM.....	Mili Molar
mm.....	milímetros
mVolts.....	Mili volts
nm .....	Nanómetros
°C.....	Grados Celsius
Pb .....	Pares de bases
PBS.....	Buffer salino de fosfatos
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA.....	Ácido ribonucleico
ROS.....	Especies reactivas de oxígeno
rpm .....	Revoluciones por minuto
RPMI.....	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR.....	Transcripción reversa acoplada a la polimerasa de reacción en cadena
SLG.....	S-D-Lactoilglutación
SNC.....	Sistema nervioso central
TE.....	Buffer de Tris-HCl con EDTA

TOPO-TA..... Sistema de clonación con la enzima topoisomerasa  
U/ $\mu$ L..... Unidades por microlitro  
UFPL..... Unidades formadoras de placas líticas  
Ug..... Unidades gramo  
UV..... Luz ultravioleta  
 $\lambda$  ..... Longitud de onda

## RESUMEN

El sistema de glioxalasa (GLO's) comprende dos enzimas GLO-I (lactoilglutación liasa) y la GLO-II (hidroxilglutación hidrolasa) que participan en la vía de desintoxicación del aldehído metilglioxal (MGO), catalizando la reacción interna de oxidación-reducción del mismo. Este compuesto es producido en la vía glucolítica mediante la reacción de interconversión del gliceraldehído 3-fosfato (GAP) a hidroxiacetona fosfato (DAP) por la triosa fosfato isomerasa, así como por el catabolismo de la treonina y acetona. La vía para la desintoxicación del MGO consiste en dos reacciones, en la primera de ellas la GLO-I cataliza la formación del S-D-lactoilglutación (SLG) a partir del MGO y de glutación reducido (GSH). En la segunda reacción el SLG es hidrolizado por la GLO-II y el GSH es liberado formando D-lactato, este producto final de la vía no reacciona con las proteínas. El MGO es altamente tóxico para las células, ya que al acumularse inhibe su proliferación e induce apoptosis.

En este proyecto se llevó a cabo la producción de un fragmento de ADN complementario (ADNc) que codifica para la GLO-I, partiendo de una muestra de RNA total de la larva y utilizando el método de la transcripción reversa acoplada a la polimerasa de reacción en cadena (RT-PCR). Este fragmento se utilizó como sonda para aislar un ADNc completo que codifica para la enzima de estudio, por medio de una serie de tamizajes de una biblioteca de ADNc de larva construida en el vector  $\lambda$ gt10. Una vez aislada la clona de ADNc, se obtuvo la secuencia nucleotídica y mediante un análisis computacional se determinó que codificaba para una glioxalasa I de *T. solium*.

Además, se realizaron una serie de experimentos utilizando cisticercos de *Taenia crassiceps* y exponiéndolos a diferentes concentraciones de MGO, para determinar el daño que este provoca en las larvas, el efecto observado fue una parálisis de la membrana y en algunos casos la desintegración de la misma, que no permitió la evaginación de algunos cisticercos, sin embargo es importante mencionar que se utilizaron diferentes concentraciones y tiempos pero que en ninguno se observó una muerte total de los parásitos.

Se obtuvo la  $DL_{50}$  la cual corresponde a una concentración de 30 mM de MGO en un tiempo de 2 horas. Concluimos que *Taenia solium* posee y utiliza la vía de las glioxalasa que desintoxican MGO y que además tolera grandes concentraciones de este compuesto.

## CAPITULO I.

### INTRODUCCION

#### I.1 Historia y clasificación taxonómica de *Taenia solium*.

Desde la época de Hipócrates y posiblemente desde los tiempos de Moisés, se sabe que la *Taenia solium* parasita al hombre, aunque no fue diferenciada de *Taenia saginata*, hasta la época de Goeze en 1782 (Gallegos J., 2006).

Aristóteles y Aristófanes observaron el estado larvario en la lengua del cerdo y lo describieron como granizo (Gallegos J.,2006).

Por su parte Gessner y Ramler en 1558 informaron del estado larvario en el hombre y fue hasta 1855 cuando Kuchenmeister y Leuckart investigaron el ciclo biológico y descubrieron la forma infectante para el hombre (Gallegos J., 2006).

En la actualidad *Taenia solium* se encuentra clasificada taxonómicamente de la siguiente forma (Koneman E., 2006).

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Platyhelmintos

**Clase:** Cestoda

**Orden:** Cyclophyllidea

**Familia:** Taeniidae

**Género:** *Taenia*

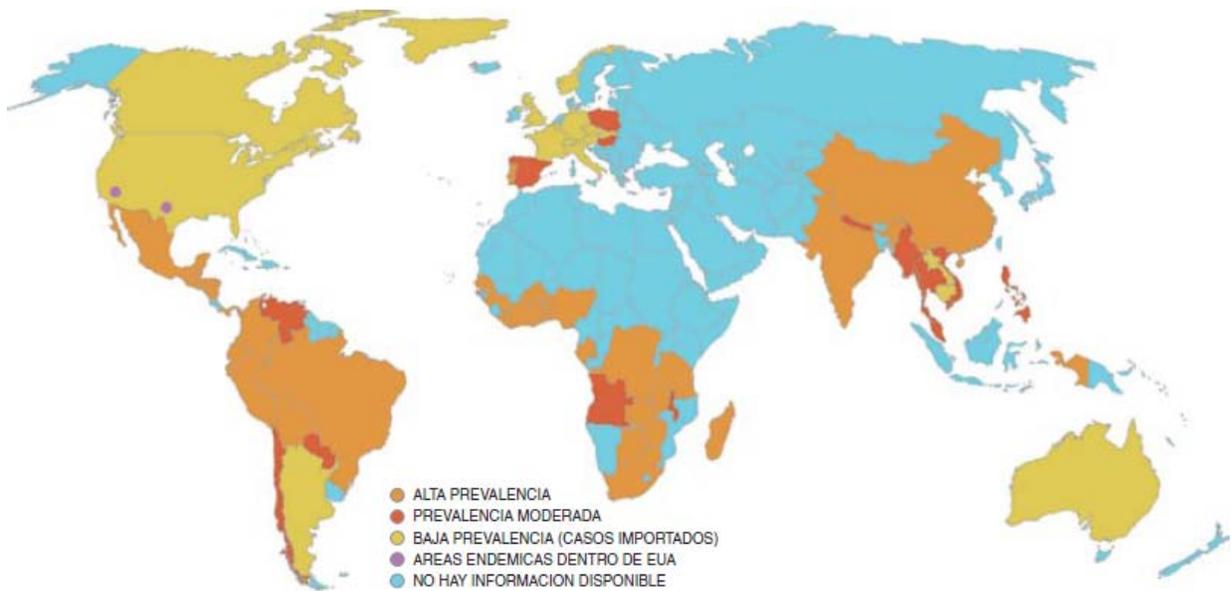
**Especie:** *solium*



**Fig. 1.** *Taenia solium* (Larralde C., Aluja A., et al., 2007)

## I.2. Aspectos anatómicos de *Taenia solium*.

*Taenia solium* es un parásito endémico de regiones como Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú, India, África del Sur, África Occidental, USA entre otros países siendo los movimientos migratorios en este último la principal causa de aparición de la enfermedad (Flisser A., 2006).



**Fig. 2.** Distribución geográfica mundial del binomio teniasis/cisticercosis con su nivel de prevalencia. (Flisser A., et al., 2006).

Este parásito es conocido comúnmente con el término de “solitaria”. El nombre de *solium* no corresponde al concepto de sola o solitaria, si no que deriva de la palabra árabe “soltz” que significa cadena y que alude a la que forman los proglótidos del estróbilo, estructura que mencionaremos posteriormente (Flisser A. 2006).

En cuanto a su anatomía *Taenia solium* también es conocida como *Taenia armada* esto porque presenta un escólex o cabeza (órgano de fijación del helminto) de un tamaño de 1 mm de diámetro y conformado por una doble corona de ganchos, en número de 22 a 32, los cuales miden de 110 a 180 micras, además de poseer cuatro ventosas (Flisser A, Koneman E., 2006)

Después del escólex encontramos lo que es el cuello el cual es un sitio corto, de aproximadamente la mitad del grosor del escólex, en esta región se encuentran células pluripotenciales también conocidas como células “madre” que son las responsables de la formación de nuevos proglótidos.

El cuerpo de *T. solium* es largo y aplanado, razón por la cual se encuentra formando parte del phylum de los platyhelminintos su longitud puede ir de 2 a 4 m aunque se han reportado ejemplares que llegan a medir de 6 a 10 m de largo.

Habita en el intestino delgado del hombre, carece de tubo digestivo y en compensación presenta un tegumento o epitelio que le permite la absorción de nutrientes y excreción de desechos. Este tegumento se encuentra formado por micro vellosidades llamadas microticas las cuales se encuentran cubiertas por una membrana con glicocálix que potencia la permeabilidad de cationes, sales biliares y nutrientes, posee actividad de amilasas, tripsina, quimiotripsina y lipasa pancreática (Torres A., 2004)

El estróbilo o cuerpo del parásito es segmentado y a estas fracciones se les conocen como proglótidos, que en cantidad pueden formarse desde 800 hasta 1,000 proglótidos, los cuales se dividen a su vez en (Tay J., 2003)

- **Inmaduros** (más cercanos al cuello y no presentan órganos sexuales).
- **Maduros** (presentes en la parte media del cuerpo y hermafroditas), presentan una estructura rectangular y miden de 5 a 7 mm de longitud.
- **Grávidos** estos proglótidos se pueden encontrar en las heces o en el medio ambiente y contienen los huevos de *Taenia solium*, ubicándose en la parte distal del gusano. Miden de 10 a 15 mm de largo y de 6 a 7 mm de ancho (Tay J., 2003). Su útero es característico pues presenta de 7 a 13 ramas laterales usualmente (9 a 10) gruesas las cuales encierran de 30 mil a 50 mil huevos cada una (Tay J., 2003).



**Fig.3.** Anatomía de *Taenia solium* (Flisser A, et al., 2006).

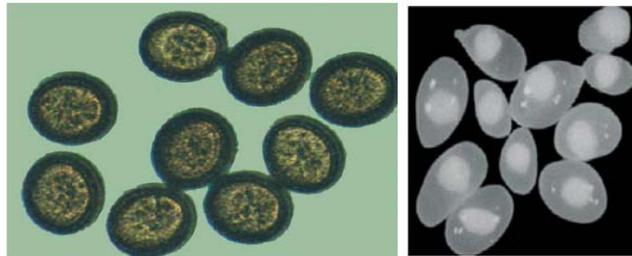
Los huevos de *T. solium* miden aproximadamente 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, son de paredes gruesas y radiadas y no se pueden diferenciar de los huevos de *Taenia saginata* (Flisser A., et al., 2006). En su interior contienen una oncósfera o embrión con seis ganchos (embrión hexacanto), siendo estos la forma infectante para el hombre, así como para el cerdo. Este huevo está protegido por capas como el vitelo, el cual es una estructura delgada que envuelve al embrióforo, este último está formado por bloques de una proteína similar a la queratina y se caracteriza por ser impermeable y muy resistente.

Las mismas enzimas digestivas y sales biliares del huésped activan a las oncósferas, que atraviesan la pared intestinal y entran en el torrente sanguíneo, hasta alcanzar y desarrollarse en el tejido subcutáneo, músculo esquelético, sistema nervioso central y ojos, convirtiéndose en la forma larvaria o cisticerco.

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula ovalada y translúcida, llena de líquido, de 0.5 a 2.0 centímetros de diámetro que presenta un escólex invaginado, al igual que el parásito en su forma adulta el escólex presenta cuatro ventosas y una doble

corona de ganchos, además al carecer de tracto digestivo las larvas adquieren sus nutrientes y llevan la excreción de estos por su tegumento (Flisser A., et al., 2006)

El desarrollo del cisticerco hacia una forma adulta capaz de producir huevos toma un tiempo aproximado de 2 meses, razón por la cual es fundamental conocer el ciclo biológico de este helminto (Villalobos-Perozo R., 2003).



**Fig. 4.** Huevos y forma larvaria (cisticercos) de *Taenia solium* (Flisser A, et al., 2006).

### **I.3. Ciclo biológico de *Taenia solium*.**

Este parásito alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como huésped intermediario (Flisser A., et al 1997), (Flisser., et al 2006), (Tay J., 2003), (García H., et al 2003)

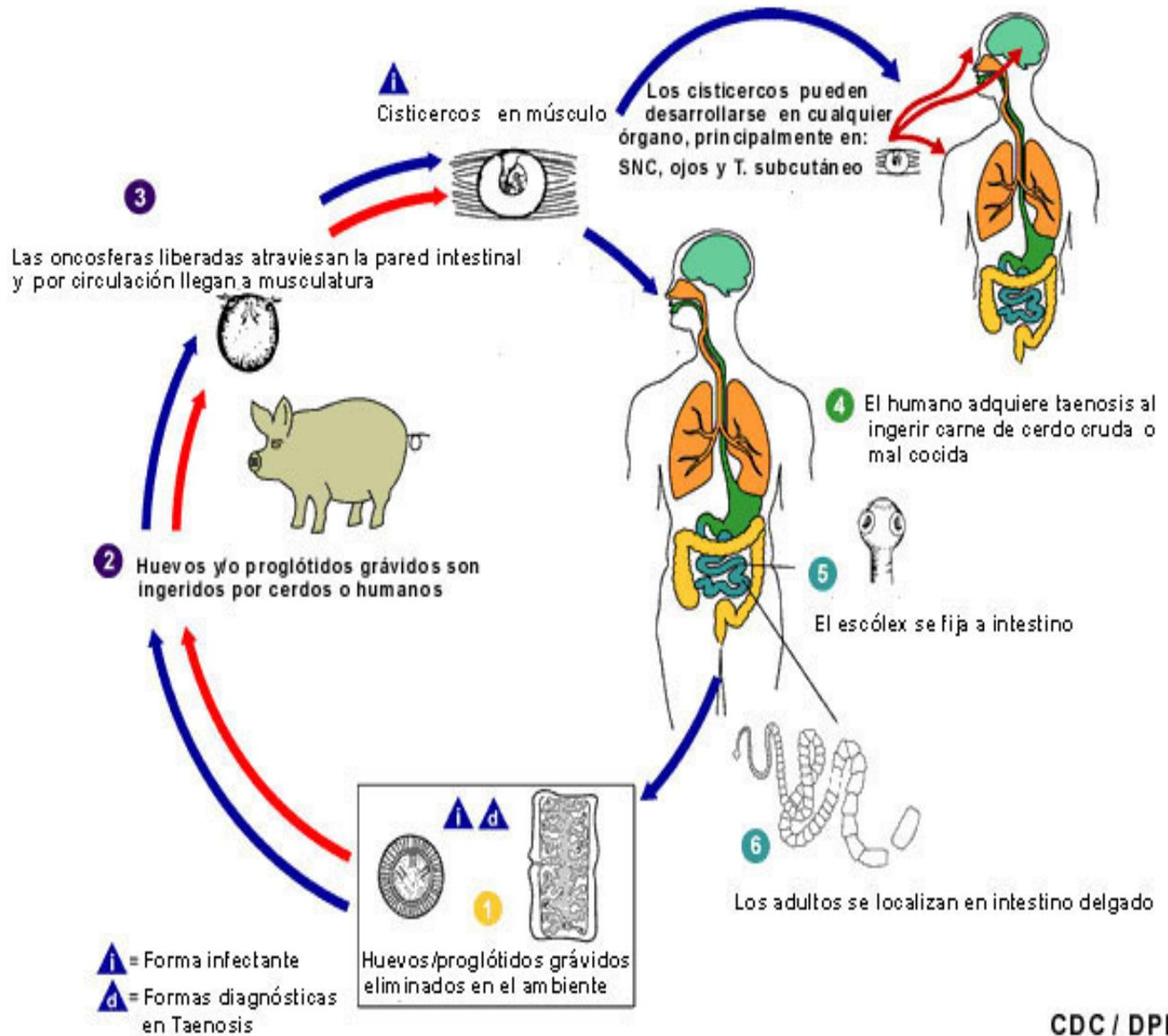
En su estado adulto, el platelminto habita en el intestino delgado del ser humano. Su presencia ocasiona la teniasis. En la que la *Taenia* o solitaria, produce miles de huevos, que se expulsan con las heces. El cerdo al ser un animal coprófago se infecta al ingerir heces donde hay huevos o proglótidos del parásito adulto. Cada huevo puede convertirse en un cisticerco ocasionándole la cisticercosis, ya que al ingerir los huevos, sus oncósferas por acción de enzimas digestivas como la tripsina y las sales biliares atraviesan la pared intestinal y por medio del torrente sanguíneo llega a músculo y otros órganos donde se convierten en la forma larvaria del parásito (Flisser A., et al., 2006 y Koneman E., 2006).

El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos mal cocida, lo que permite la supervivencia de esta forma larvaria. El

escólex contenido en el cisticerco se fija en las paredes del intestino humano donde se desarrollan hasta convertirse en el gusano adulto.

La falta de higiene y la convivencia con un teniásico pueden ocasionar la ingestión de huevos de una forma accidental, desarrollándose la cisticercosis humana afectando principalmente SNC, ojos y tejido subcutáneo (Sarti E., 1997).

## CICLO BIOLÓGICO DE *TAENIA SOLIUM*



**Fig. 5.** Ciclo biológico de *Taenia solium* (CDC, Center for disease control and prevention)

#### **I.4. Importancia en la salud del binomio Teniasis y cisticercosis**

La relevancia de este parásito se encuentra asociada a dos enfermedades la teniasis y la neurocisticercosis siendo esta última en el hombre la más peligrosa.

Las razones de esta alta frecuencia en seres humanos son la falta de higiene, la deficiente inspección sanitaria de la carne y la falta de programas de salud e infraestructura de la misma para la población.

En diversos artículos se ha hecho hincapié en que 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. En primer lugar, puesto que la teniasis es una enfermedad exclusiva del humano, éste es el único responsable de la dispersión de los huevos del parásito; así la defecación al aire libre y/o la inadecuada eliminación de excretas es la primera práctica de riesgo.

En segundo lugar, una crianza de los cerdos que tolere o promueva el contacto de éstos con las heces humanas permite la infección del cerdo. La falta de control sanitario de la carne de cerdo, su manejo y los hábitos de alimentación que incluyen el consumo de esta carne en forma poco cocida o cruda, también son prácticas que contribuyen a la infección (Larralde C., Aluja A., et al., 2007).

La falta de higiene personal especialmente los hábitos relacionados con el lavado de manos antes de comer y después de ir al baño, el consumo de agua sin hervir y de alimentos sin lavar, así como su exposición a agentes que dispersan los huevos son prácticas que posibilitan la ingestión de éstos por el humano (Larralde C., Aluja A., et al., 2007).

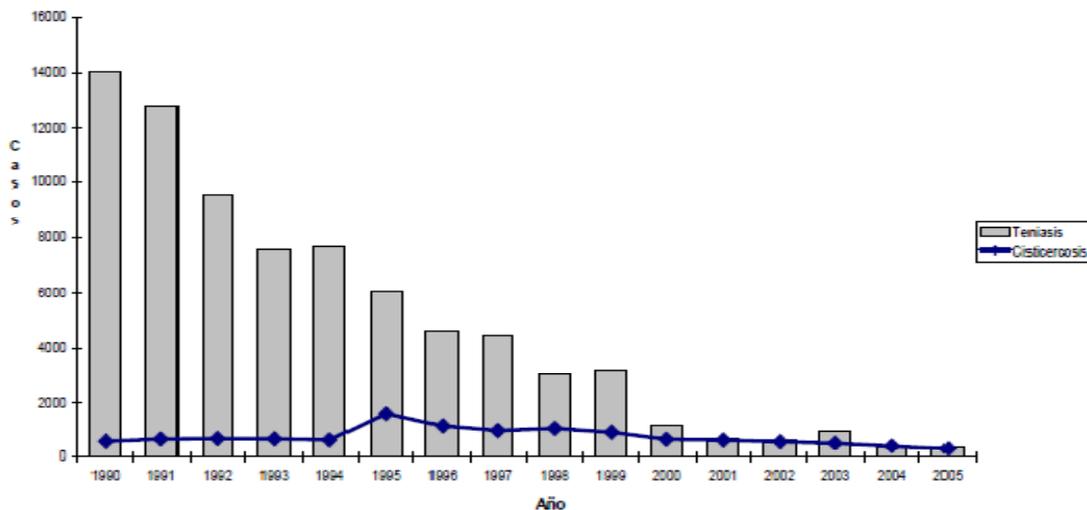
De acuerdo con datos obtenidos por la secretaría de salud el panorama epidemiológico indica que desde el año 1990 hasta el año 2005, la disminución de la incidencia de teniasis ha sido considerable, ya que en 1990 se tenía un reporte nacional de 14,013 casos de teniasis y 586 casos de cisticercosis, y en el 2005 las

cifras reportadas fueron de 393 casos de teniasis y 306 casos para la cisticercosis (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica., 2007).

La cisticercosis se ha mantenido desde hace ya 15 años aparentemente sin cambio y se podría decir que no hubiese relación entre ambos padecimientos, ya que a pesar de que la teniasis ha disminuido en la cisticercosis no ha habido cambios.

En el caso de la teniasis los 11 estados de la República Mexicana más afectados son: Yucatán, Baja California Sur, Chiapas, Tamaulipas, Michoacán, Coahuila, Campeche, Sinaloa, Jalisco, Querétaro y Chihuahua, mientras que para la cisticercosis las 13 Entidades Federativas en las cuales existe una incidencia nacional mayor son: Jalisco, Hidalgo, Sinaloa, Colima, Zacatecas, Chiapas, Nuevo León, Durango, Baja California, Coahuila, Michoacán, Distrito Federal y Guanajuato (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica., 2007).

Los estudios epidemiológicos informan que el parásito adulto se presenta en todas las edades y que alcanza su pico más alto en grupos de 16 a 45 años (edad económicamente productiva).



**Gráfica 1.** Comportamiento epidemiológico del binomio Teniasis-Cisticercosis México 1990-2005 (Secretaria de Salud, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2007)

### **I.5. Sintomatología, diagnóstico y tratamiento de la teniasis.**

La infestación por el gusano adulto de *T. solium* produce el cuadro clínico denominado teniasis intestinal. Los síntomas pueden ser causados por la producción de sustancias tóxicas por parte del cestodo, inflamación leve en el sitio de implantación y anemia por síndrome de malabsorción intestinal. En general, la mayoría de las infecciones por este parásito presentan una sintomatología moderada, ya que la persona puede cursar con malestar abdominal o dolor epigástrico, meteorismo, plenitud intestinal, sensación de hambre, náuseas, diarrea y una pérdida mínima de peso. Es bastante frecuente detectar una eosinofilia moderada en sangre periférica, mayor del 13% (Álvarez E., et al., 2004).

#### **Diagnóstico de las teniasis intestinales:**

**Historia clínica:** Información sobre la eliminación de proglótidos de forma espontánea o junto con las heces, si el paciente suele comer carne de cerdo cruda o poco cocida y especialmente, si proviene o ha realizado un viaje a una zona endémica.

**Características morfométricas.** A partir del material parasitario eliminado por el paciente, podemos observar huevos mediante un estudio microscópico directo de éstos, y sólo informaremos el género, ya que ninguna de las tres especies (*Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Taenia asiática*) puede diferenciarse mediante estos.

Pero como se menciona en la sección de diagnóstico, los proglótidos grávidos son estructuras que se emplean para el diagnóstico de la enfermedad, la cual se puede diferenciar de otros proglótidos como *Taenia saginata* por el número de ramas uterinas, ya que *Taenia solium*, presenta de 9 a 10 ramas uterinas y *Taenia saginata* más de 13, además de que el tamaño y forma de estos pueden ser diferenciables empleando tinciones especiales, después de haber obtenido la estructura por medio de la técnica de tamizaje de la cual también podemos obtener el róstelo y hacer la identificación de la especie más completa, conociendo el agente causal de la patología.

### **Detección de antígenos en heces:**

Se realiza mediante un ensayo inmunoenzimático que utiliza anticuerpos contra el parásito, que sólo permite un diagnóstico de género, pero que ayuda a confirmar una parasitosis actual, incluso sin la emisión de huevos o proglótidos (Flisser A. et al., 2006).

### **La detección de anticuerpos en suero se realiza mediante un inmunoblot:**

Esta técnica permite el diagnóstico diferencial entre: *Taenia saginata*, *T. solium* y *T. asiática*. Como inconvenientes, no necesariamente refleja infecciones activas y puede dar reacciones cruzadas con los cisticercos.

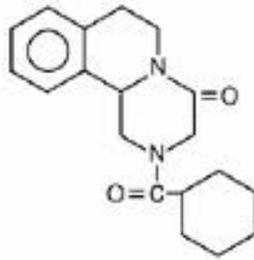
**Detección por la técnica de PCR en heces:** nos permite la diferenciación de las tres especies, siempre y cuando exista ADN del parásito.

**Tratamiento:** En cuanto al tratamiento que se emplea para la teniasis intestinal se aconseja la administración de un laxante salino suave 1 ó 2 h, después de haber ingerido el fármaco correspondiente. De esta forma se evita que el parásito se desintegre y, al mismo tiempo se previene la cisticercosis, y se facilita la identificación (Robles C., et al., 1997).

En cuanto a los fármacos utilizados, son los mismos para todas las especies del género *Taenia*, se recomienda la utilización de praziquantel o niclosamida.

El **praziquantel**, aumenta la permeabilidad al calcio del parásito, lo que produce una contracción generalizada de éste, inhibe además la captación de glucosa del cestodo, forzándolo a consumir sus propias reservas del glucógeno, después de 5 minutos de contacto del praziquantel con los parásitos, se observa al microscopio electrónico degeneración del tegumento (Robles C., et al., 1997 y Sciutto E., et al 2010).

Como ventaja tiene que también puede actuar contra los cisticercos, por lo que se ha considerado como fármaco de elección.



**Fig. 6.** Estructura molecular del praziquantel (Bayer Health Care., 2010).

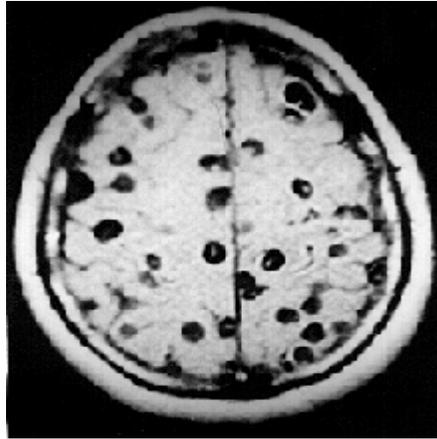
### **I.6. Sintomatología, diagnóstico y tratamiento de la neurocisticercosis**

La sintomatología de la cisticercosis cerebral depende de la localización del cisticerco y la lesión que causan. Pacientes con lesiones parenquimatosas suelen presentar crisis epilépticas, cefaleas, vómito en proyectil e incluso con síntomas focales debidos a un efecto de masa.

La inflamación que los rodea puede ser causa de infartos cerebrales al ocluir pequeñas arterias. Las lesiones extra parenquimatosas pueden causar hidrocefalia, por obstrucción mecánica del sistema ventricular. En muchos casos, los síntomas aparecen años después de la invasión del SNC por la inflamación, el efecto de masa o por calcificaciones residuales. De hecho, cuando los cisticercos están ya muertos o han degenerado, habitualmente calcifican e incluso forman una inflamación granulomatosa a su alrededor que puede ser igualmente la causa de muchos de los síntomas de los pacientes. Una manifestación grave pero poco frecuente es la encefalitis, cuando existen múltiples lesiones con una importante reacción inflamatoria.

El **diagnóstico** se basa en estudios de neuroimagen, datos clínicos, y sobre todo datos epidemiológicos. En los análisis rutinarios ocasionalmente podemos encontrar eosinofilia (Robles C., et al., 1997).

En cuanto a las técnicas de imagen, la resonancia magnética nuclear (RMN) es más sensible que la tomografía axial computarizada (CT) para pequeñas lesiones y también para detectar cisticercos intraventriculares o medulares, pero la CT, además de ser menos costosa, detecta mejor pequeñas áreas de calcificación.



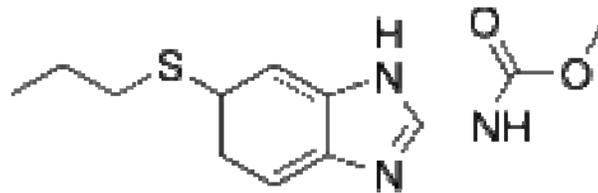
**Fig. 8.** Detección de neurocisticercosis haciendo uso de la Tomografía Axial Computarizada (Solari L., et al, 2001).

El parásito pasa por distintas fases. Al principio podemos observar una vesícula con un contenido líquido de intensidad de señal similar a la del líquido cefalorraquídeo (LCR). La visualización de un nódulo mural de alta densidad correspondería al escólex y es patognomónico de la neurocisticercosis activa (Solari L., et al 2001).

En cuanto al tratamiento indicado para esta enfermedad se recomienda la administración de fármacos antiparasitarios como el albendazol y el prazicuantel.

El **albendazol** es un antihelmíntico de amplio espectro, que constituye un tratamiento efectivo para la neurocisticercosis en humanos y la cisticercosis porcina (Castellanos A, Jiménez L y Landa A., 2002), su nombre químico es metil-5-(propiltio)-2-bencimidazol carbamato, este fármaco daña de forma selectiva los microtúbulos citoplasmáticos de las células intestinales de los nematodos pero no del huésped, ocasionando así la ruptura de las células y la pérdida de funcionalidad. En consecuencia, se produce una acumulación de sustancias secretoras en el aparato de Golgi del parásito, disminuyendo la captación de glucosa y depleción de los depósitos de glucógeno. Como muchas de las sustancias secretoras presentes en el aparato de Golgi son enzimas proteolíticas que se liberan intracelularmente, la consecuencia final es la autólisis de la célula intestinal y, finalmente, la muerte del gusano (Robles C., et al., 1997) y (Cárdenas G., et al., 2010). Otra de las acciones farmacológicas del albendazol es la de

inhibir a la fumarato reductasa y superóxido dismutasa (Castellanos A, Jiménez L, Landa A., 2002), enzimas que participa activamente en la síntesis de ATP, fuente de energía indispensable y en la desintoxicación del radical superóxido, respectivamente para que la célula pueda llevar a cabo sus múltiples funciones. La supresión de estos mecanismos bioquímicos explica el efecto letal, no sólo en los parásitos adultos sino también para las larvas en sus diferentes estadios y oncósferas.



**Fig. 9.** Estructura molecular del albendazol (Palomares F., et al., 2006).

La **dexametasona** se emplea para disminuir la reacción inflamatoria que resulta de la destrucción de los cisticercos y que podría afectar a la pared de los vasos con el consiguiente riesgo de infarto.

También es importante la administración de un anticonvulsivo para el cuadro epiléptico que se presenta en la cisticercosis. Sin embargo en algunos reportes se menciona que el mejor tratamiento no es precisamente con fármacos, ya que estos pueden poner en riesgo la vida del paciente por su número y localización, por lo que en estos casos lo más recomendable es recurrir a la intervención quirúrgica (Álvarez E., et al., 2004)

### **I.7. Cisticercosis porcina**

La principal razón de porque se comenzó a estudiar esta patología en los cerdos fue por el incremento de la neurocisticercosis en humanos, hasta hoy en día es difícil conocer la cifra exacta de cerdos infectados con cisticercos por diversas causas, siendo las más comunes, la falta de inspección sanitaria dentro de los rastros, la matanza clandestina y la falta de estudios epidemiológicos.

El grado de infección en los cerdos es muy heterogéneo, encontrándose canales con pocas larvas y otros en los que el tejido muscular está repleto de cisticercos.

Las razones pueden ser varias: puede deberse a que no todos los animales tienen acceso a la materia fecal (Cuando las heces fecales ingeridas provienen de un portador de *Taenia* que elimina en una deyección de tres a cuatro segmentos maduros, el cerdo puede ingerir de una sola vez entre 180 a 240 mil huevos, y aunque no todos serán maduros e infectivos, llegarán a desarrollarse miles de cisticercos en este cerdo), otra causa es que este tipo de animales forman grupos en los que uno es el dominante o líder, el cual ingiere la mayor parte de los cisticercos dejando una menor cantidad para el resto del grupo (Larralde C., Aluja A., 2007).

En cuanto al diagnóstico de esta enfermedad, el método para detectar cerdos con cisticercosis en el campo sigue siendo la inspección de la lengua, en especial de su parte ventral. Es un procedimiento violento y traumático para los cerdos, sin embargo aunque se han probado estudios de imagenología, así como métodos serológicos en los que se han obtenido buenos resultados, no son aplicables por que estos requieren de un trabajo laborioso y a su vez involucran un costo elevado (Morales J., et al., 2002).

### **I.8. Respuesta inmunológica contra *Taenia solium***

Ante la invasión de *T. solium*, el cuerpo reacciona con una doble respuesta inmunitaria: humoral y celular.

La respuesta humoral se caracteriza por la presencia de anticuerpos, complemento que se unen a este después de unirse a su antígeno correspondiente.

Mientras que la respuesta celular es mediada por los leucocitos. Se han detectado inmunoglobulinas como IgG, la cual actúa contra los cisticercos en el suero sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo, también existe la presencia de estos anticuerpos en saliva de pacientes con neurocisticercosis.

La presencia de IgG, corrobora que la enfermedad constituye un proceso crónico y de larga evolución. Esta respuesta inmunitaria humoral opera con mayor intensidad en casos sintomáticos que en población abierta.

Existe, además, una relación entre anticuerpos del huésped y características de los parásitos: los anticuerpos abundan en pacientes cuyos cisticercos están vivos o en proceso de destrucción, para disminuir en presencia de parásitos calcificados (Flisser A., et al., 2006).

Los linfocitos T, principales actores de la respuesta celular y encargados de la destrucción de agentes patógenos, son de dos tipos: T coadyuvantes (Th), subdivididos a su vez en Th1 y Th2, y linfocitos T citotóxicos (Tc). La proporción entre ambos tipos de linfocitos está asociada con la funcionalidad del sistema inmunitario, una proporción que parece anormal en los pacientes con cisticercosis: se da un aumento en la sub población de células citotóxicas que sugiere una respuesta inmunitaria disminuida.

Sin embargo, aún no se sabe si la parasitosis es la causa o el efecto de la inmunodepresión. Se han detectado citocinas, moléculas de comunicación entre células, lo mismo en el líquido cefalorraquídeo que en la sangre de pacientes con neurocisticercosis (Flisser A., et al., 2006).

Las citocinas reflejan una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (INF- $\gamma$  e IL-18) asociadas a protección. No obstante, la reacción inflamatoria crónica que rodea a cisticercos en el cerebro sugiere la participación tanto de linfocitos Th1 como Th2, estos últimos relacionados con una respuesta inmunitaria deficiente, es decir,

permissiva de la infección en las cuales se encuentran involucradas las citocinas IL-4, IL-10 y el TGF- $\beta$  (Abbas A., 2002).

Cuando los parásitos comienzan a morir, ya sea de manera natural o por la acción bioquímica de los fármacos o la vacunación probada principalmente en cerdos, se inicia un proceso inflamatorio con la intervención de eosinófilos, una clase de leucocitos, cúmulos de linfocitos y macrófagos en fagocitosis en el interior de los cisticercos destruidos.

Para sobrevivir a una respuesta inmunitaria activa, el parásito desarrolla diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria: establecimiento en sitios inmunológicamente privilegiados, como el ojo y el cerebro; enmascaramiento de la respuesta inmunitaria, al cubrirse con anticuerpos del huésped; producción de moléculas que suprimen o desvían la respuesta inmunitaria, y procesos de mutagénesis (Flisser A., et al., 2006).

## **1.9. SISTEMAS DE DESINTOXICACIÓN**

Desintoxicación se refiere a la eliminación de los agentes nocivos contra cualquier organismo que a largo plazo provocan enfermedad, daño o muerte.

Algunos parásitos han desarrollado mecanismos para eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS), nitrógeno, así como xenobióticos como son los fármacos antiparasitarios y *Taenia solium* no es la excepción.

Estos mecanismos pueden clasificarse como enzimáticos y no enzimáticos, dentro del segundo grupo se encuentran los compuestos de bajo peso molecular como la vitamina E, ácido ascórbico, piruvato, glutatión que actúan sobre las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno impidiendo su propagación en la célula.

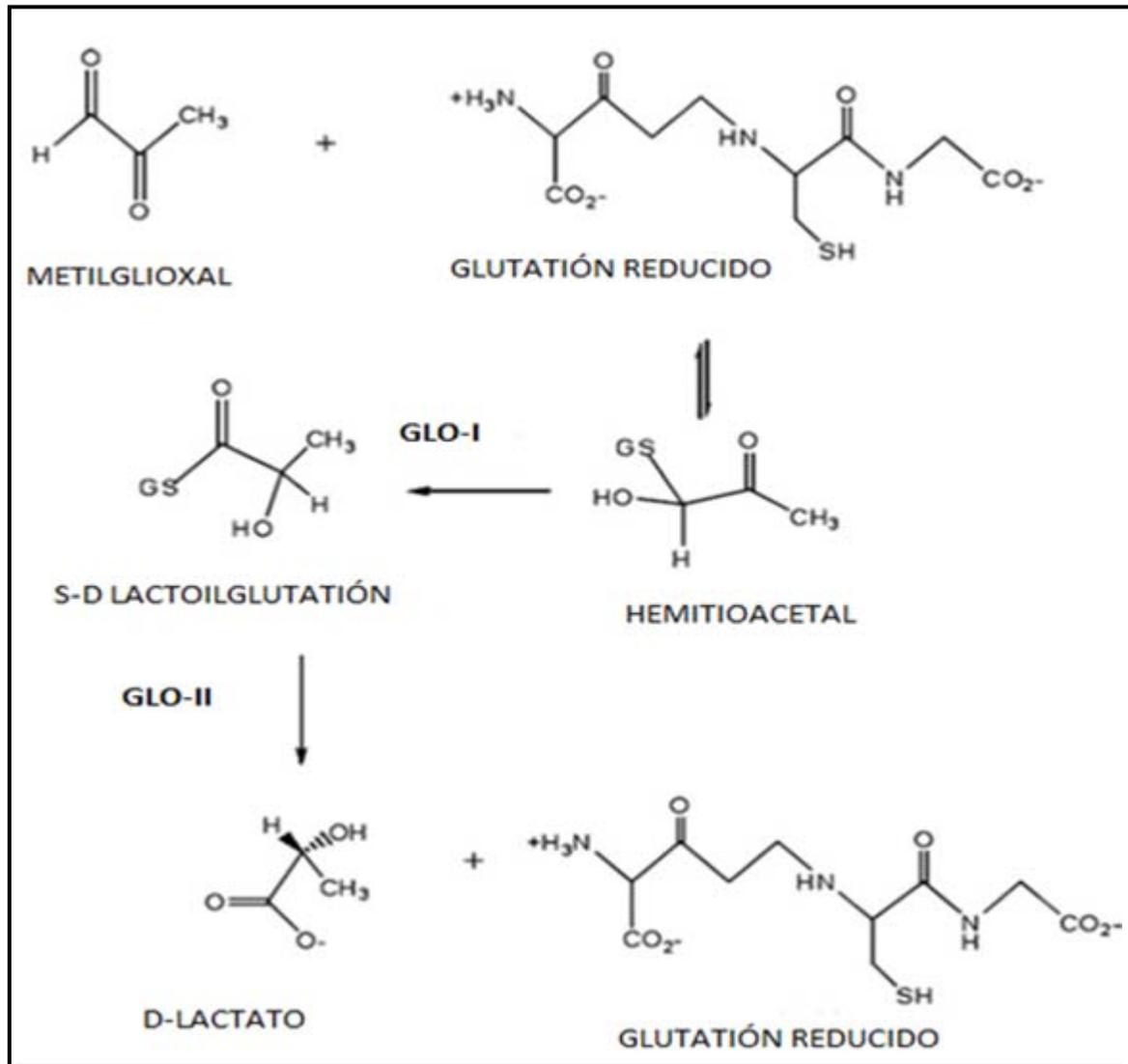
El primer grupo se divide a su vez en dos fases la primera o de funcionalidad, se basa en hacer una biotransformación de los grupos funcionales susceptibles, sobre todo en xenobióticos empleando reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, haciendo más polares a estos compuestos.

Las reacciones más comunes son las de oxidación en el metabolismo de los xenobióticos y aunque en otros organismos la familia de los citocromos P450 lleva a cabo su catálisis, en *Taenia solium* no existen estas mono oxigenasas. Sin embargo, el parásito cuenta con otro tipo de enzimas que le permiten la oxidación de estos compuestos, un ejemplo es la superóxido dismutasa (SOD) que elimina el ion superóxido.

En la fase II, se cataliza la adición de pequeñas moléculas a los xenobióticos generando nuevos enlaces covalentes, por ello las reacciones se denominan como “reacciones de conjugación”, siendo el glutatión reducido (GSH) y la tioredoxina (Trx) los cosustratos mas comunes. Las enzimas que catalizan tales reacciones son las Glutatión transferasas, las tioredoxina peroxidadas, las metil-transferasas y la sulfo-transferasas.

El sistema de glioxalasa, juega un papel sumamente importante en la desintoxicación de un compuesto altamente reactivo y tóxico conocido como MGO.

### I.10.Sistema de las Glioxalasa (GLO-I y GLO-II).



**Fig. 10.** Sistema de glioxalasa (Sukdeo Nicole, et al., 2004).

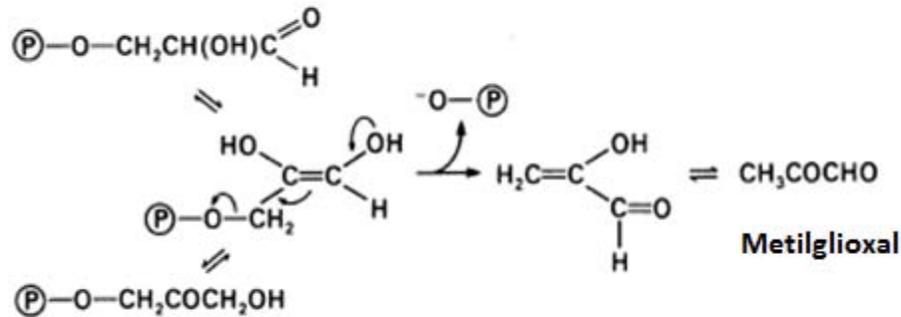
La glioxalasa I (GLO-I), también es conocida con el nombre de lactoilglutatión liasa o (R)-S-lactoilglutatión metilglioxal-liasa, junto con la glioxalasa II S-(2-Hidroxiacil) o glutatión hidrolasa se encuentran involucradas en la regulación celular, en la proliferación, regeneración de tejidos y además llevan a cabo un mecanismo de

desintoxicación de un compuesto conocido con el nombre de metilglioxal, piruvaldehído o 2-oxopropanol (MGO). Compuesto 1,2 dicarbonílico altamente reactivo que proviene de la vía de la glicólisis específicamente de la dihidroxiacetona fosfato y de algunos compuestos que se forman durante la producción del gliceraldehído 3- fosfato. Otra forma en la cual se puede producir este compuesto en el organismo es mediante la vía de las cetonas o por la vía de la treonina (Thornalley PJ., 1990)

El MGO puede unirse y ser modificado por aminoácidos como la arginina, lisina y algunos residuos de cisteína causando cambios estructurales en las proteínas y ácidos nucleicos impidiendo a su vez la división celular o bien puede llevar a cabo la formación no enzimática de los productos finales de la glicación avanzada (AGES), los cuales se encuentran ampliamente involucrados en enfermedades como diabetes mellitus, Alzheimer, entre otras patologías principalmente neuro y crónico degenerativas (Kurz A., et al., 2011) y (Gutiérrez I., et al., 2003).

Algunos estudios han demostrado que los niveles de MGO en células de mamífero son de aproximadamente 300  $\mu\text{M}$  y al elevarse esta concentración se propicia estrés oxidativo por la formación de ROS dentro de la célula induciendo apoptosis en esta y finalmente la muerte celular (Thornalley PJ., 1990). Otro mecanismo por el cual el MGO se encuentra induciendo estrés oxidativo es por la inactivación de enzimas antioxidantes como de la superóxido dismutasa de Cu/Zn y de la glutatión peroxidasa (Hemptinn V., et al., 2009).

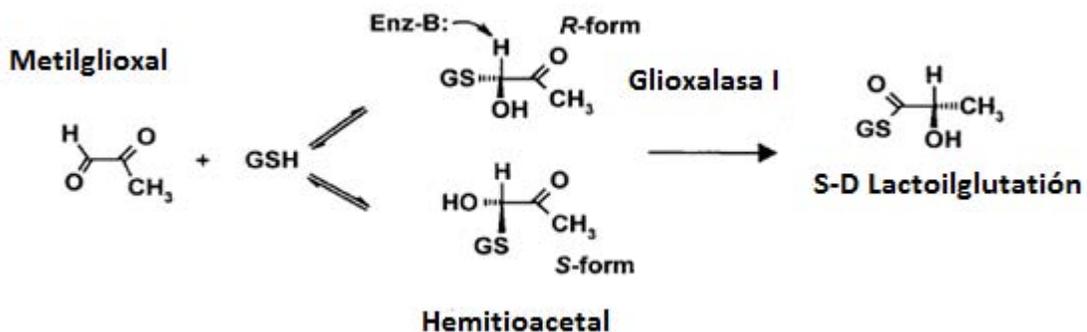
**Gliceraldehído 3-fosfato**



**Dihidroxiacetona fosfato**

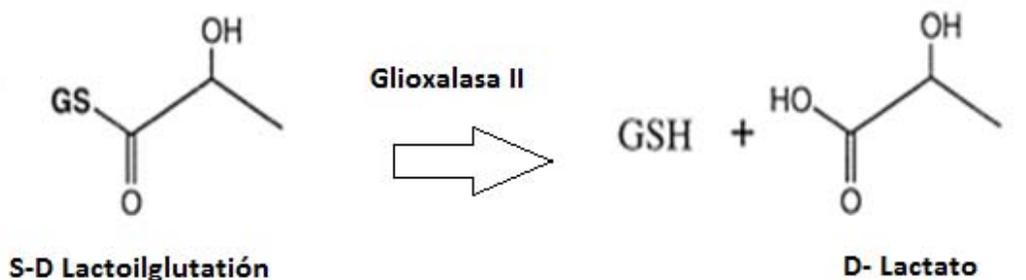
**Fig. 11.** Formación de MGO a partir de la dihidroxiacetona y el gliceraldehído 3-fosfato proveniente de la vía de la glicólisis (Thornalley PJ, et al., 1990).

Es por ello que el papel que juega el sistema de las GLO's es de gran importancia para la inactivación del MGO. Esto se lleva a cabo mediante dos reacciones de oxido-reducción en la que el MGO actúa como el primer sustrato fisiológico para la GLO-I. En la primera reacción la GLO-I cataliza la formación de S-D-lactoilglutión para la formación del hemitioacetal, denominada formación no enzimática del MGO con una reducción del glutatión. Esto ocurre porque el carbono 1 del MGO se oxida desde un aldehído a un grupo carbonilo y el carbono 2 se reduce desde una cetona hasta un alcohol secundario (Thornalley PJ., 1990).



**Fig.12.** Reacción Catalizada por la GLO-I (Frickel M, et al., 2001).

Mientras que en la segunda reacción la GLO-II cataliza la hidrólisis de S-D-lactoilglutación a ácido láctico (D-lactato) compuesto que no es tóxico para las células y no reacciona con las proteínas, además en esta etapa existe una regeneración del glutatión reducido y consumido en la reacción catalizada por la GLO-I.

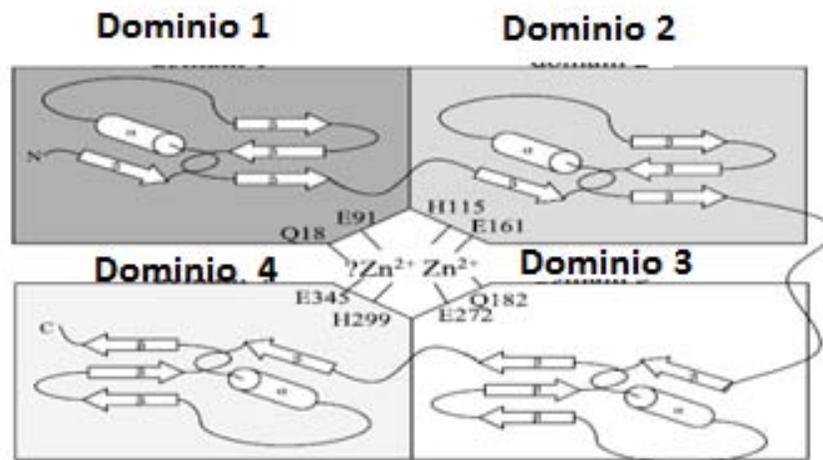


**Fig.13.** Reacción Catalizada por la GLO-II. (Wang W., et al., 1998).

### 1.11. Estructura de la GLO-I

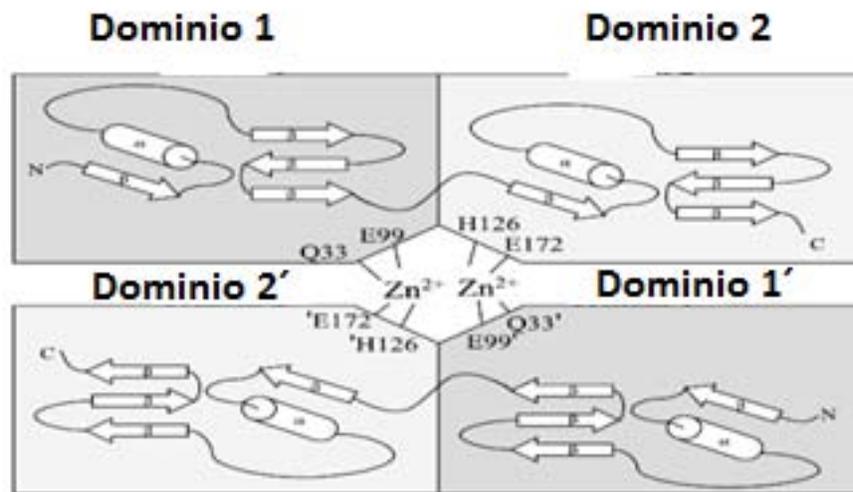
Esta enzima es miembro de la superfamilia de las metaloglutación transferasas, es una metaloenzima que forma parte de las VOC (Quelatos vecinos al oxígeno) y contiene moléculas de  $Zn^{2+}$  en sus sitios catalíticos, sin embargo en algunos casos principalmente en bacterias como *E. coli* y en los eritrocitos de humano se ha observado que el zinc puede ser remplazado por magnesio, manganeso o cobalto (Lozefa R., et al 2003 y Creighton D., et al., 2001)

La GIO-I presenta una estructura conformada por motivos  $\beta\alpha\beta\beta$  que coordinan al metal en una forma octaédrica. El sitio de unión de zinc se compone de dos residuos estructuralmente equivalentes en cada dominio en el caso del humano es Glu<sup>172</sup> y Glu<sup>99</sup> y dos moléculas de agua. (Lozefa R., et al 2003 y Creighton D., et al., 2001).



**Glioxalasa I de *Plasmodium falciparum***

**Monomero de 42.4 kDa**



**Glioxalasa I de humano**

**Homodimero de 46 kDa**

**Fig. 14.** Diferencias en la estructura de la GLO-I de humano y de *Plasmodium falciparum* (Lozefa R., et al., 2003).

## **I.12. Características de la GLO-I en algunos organismos**

El sistema de glioxalinas está presente en el citosol de las células, orgánulos celulares y principalmente en las mitocondrias.

La GLO-I se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos de organismos procariontes y eucariontes. También se ha detectado su actividad en mamíferos, aves, peces, anfibios, plantas, bacterias, hongos, etc. En mamíferos esta enzima presenta una masa molecular de 43-48 kDa y su estructura es dimérica, mientras que la GLO-I de organismos procariontes es monomérica con una masa de 20 a 36 kDa (Thornalley PJ., 1990).

Cada una de las subunidades del dímero en mamíferos así como los monómeros en microorganismos presentan metales en su sitio catalítico como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$ , siendo más común el  $Zn^{2+}$  (Sukdeo N., et al., 2004).

El punto isoeléctrico de esta enzima para mamíferos va de 4.7 a 4.8 y para levaduras es de 7.0, para hongos y parásitos no se ha reportado este parámetro (Thornalley PJ., 1990).

Los cofactores fisiológicos de la GLO-I son el GSH, la L-cisteína, el glutatión oxidado, la L-cisteínglicina y la gamma L-glutamilcisteína, y los sustratos específicos de esta enzima son  $\alpha$ -oxoaldehído, hidroxipirivaldehido fosfato, glioxal, fenilglioxal siendo el MGO, el principal.

Debido a la importancia de esta enzima, este proyecto reporta el aislamiento y caracterización del ADNc que codifica para una GLO-I de *Taenia solium*, siendo este el primer reporte de esta enzima en organismos cestodos.

## CAPITULO II.

### JUSTIFICACIÓN

En lo que respecta a la GLO-I de *Taenia solium* no se han encontrado reportes sobre la caracterización de esta molécula en cestodos y por lo tanto no se conoce su papel en la fisiología de los mismos. Así mismo tampoco se han realizado estudios de investigación dirigidos para conocer el papel que esta enzima tiene en la relación huésped-parásito.

De aquí proviene la importancia de aislar el ADNc que la codifica, para realizar estudios posteriores como conocer sus características bioquímicas, sus mecanismos catalíticos y su estructura molecular (cristal).

El disponer de estos datos nos dará la pauta para conocer el mecanismo catalítico que utiliza para eliminar el MGO en este organismo, nos brindara la información necesaria para la fabricación de nuevos fármacos o vacunas dirigidas contra esta enzima que nos permitan erradicar las enfermedades asociadas al helminto descrito anteriormente.

Como ya se mencionó, *T. solium* es un parásito endémico de diversas partes del mundo incluyendo México y su importancia clínica radica en que se encuentra asociado a dos enfermedades la teniasis y la neurocisticercosis, siendo esta última la más grave, y costosa por sus síntomas y secuelas ya que compromete la vida de los personas que la padecen.

## **CAPITULO III**

### **HIPOTESIS**

Si *Taenia solium* utiliza principalmente la vía glucolítica para obtener ATP, debe tener enzimas que lleven a cabo la desintoxicación de metabolitos tóxicos como el MGO que se producen en ella, por lo que debe contar con un gen que codifique para una GLO-I.

## CAPITULO IV

### Objetivo General

- ❖ Clonar y caracterizar el ADNc que codifica para la glioxalasa I de *Taenia solium*.

### Objetivos particulares

- ❖ Producir una sonda de ADNc para la GLO-I.
- ❖ Aislar el ADNc que codifica para la GLO-I de *Taenia solium*.
- ❖ Analizar la secuencia de nucleótidos del ADNc aislado.
- ❖ Determinar los efectos del MGO sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* y la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>).

## CAPITULO V.

### MATERIALES Y METODOS

#### V.1 Material biológico

Se empleó la cepa de *Escherichia coli* C600hfl<sup>-</sup> susceptible al bacteriófago  $\lambda$ gt10 para la titulación y tamizajes de la biblioteca. Otro de los materiales biológicos que se utilizaron dentro de este proyecto corresponde a las células competentes de *E. coli* cepa TOP10 para la electroporación y clonaje y finalmente los cisticercos para el tratamiento con el MGO, se obtuvieron de ratones hembra de tres meses de infección de la cepa Balb/c, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina, previamente infectados por la vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps*.

#### V.2 Producción de la sonda de ADNc para una GLO-I de *Taenia solium*.

Para lograr este objetivo se partió de una muestra de RNA de cisticerco, previamente elaborada en el laboratorio y se realizó un RT-PCR agregando a un tubo de PCR 10  $\mu$ L (1  $\mu$ g) de RNA de larva, 1  $\mu$ L (50 pm) de cada uno de los primers GLO-I-5' y GLO-I-3', los cuales se diseñaron a partir de secuencias conservadas de varias GLO's, además se incorporaron 2  $\mu$ L de dNTP's (2 mM) y 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O grado M.Q, ya que la reacción se llevó a cabo en 12  $\mu$ L, después de tener la mezcla de reacción, el tubo se transfirió a un termociclador de la marca Gene Amp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystem).

Las condiciones bajo las cuales se trabajó esta reacción fueron las siguientes: Se colocó el tubo para PCR con la mezcla de reacción del estuche (Biotecnologías Universitarias) en el termociclador incubando a una temperatura de 50°C por 30 minutos para la reacción de transcripción reversa y para la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizaron 30 ciclos de: 95°C por 1 min, 52°C por 1 min, y 72°C por 1 min; y un último ciclo de 95°C por 1 min, 52°C por 2 min y 72°C por 4 min, para obtener el ADNc.

Se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de la reacción y se corrió un gel de agarosa con TE al 1 %, en una cámara de electroforesis aplicando 120 mvolts, durante 30 min, agregando en uno de los pozos el marcador de peso molecular que nos sirvió de referencia para confirmar la presencia del fragmento referente a la GLO-I.

Una vez obtenido el fragmento de ADNc de la GLO-I este se amplificó para su purificación y secuencia mediante la reacción de la PCR. Esta reacción se preparó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , en un tubo para PCR y se utilizaron los siguientes reactivos del estuche PCR (Biotecnologías Universitarias), añadiendo 1  $\mu\text{L}$  (0.1  $\mu\text{g}$ ) del fragmento, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (GLOI-5' y GLOI-3', 50 pm), 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contiene 2.5  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora 10X, 2.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's 2 mM, 1.25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  20X , 0.25  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ) de enzima Taq polimerasa y finalmente un volumen cbp 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  grado. Las condiciones usadas fueron las descritas anteriormente.

### **V.3 Purificación del fragmento de ADNc que codifica para la GLO-I de *Taenia solium*.**

Después de esto se realizó una electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio (BrEt), en cual se cargaron 5  $\mu\text{L}$  del producto obtenido en la PCR, con el propósito de observar la presencia del fragmento de ADNc que codifica para la GLO-I de *Taenia solium*. Una vez que se comprobó la presencia del fragmento se cargaron 50  $\mu\text{L}$  en dos pozos de un gel de agarosa con TE al 1%, se observó con una lámpara de luz UV y se cortaron las bandas correspondientes las cuales se utilizaron para su purificación, empleando el estuche QAquick gel Extraction, el cual tiene como fundamento contener una columna cuya resina es específica para capturar ADN, la metodología que se siguió fue la siguiente:

En primer lugar se colocaron 450  $\mu\text{L}$  de una solución amortiguadora, que contiene yoduro de potasio que permite disolver la agarosa a un pH de 7.5 a 8.0, específico para que la columna pueda capturar el ADN que se pretende extraer, posteriormente el tubo que contiene el gel y la solución amortiguadora, se incubó a 50°C hasta que la agarosa se encontrara totalmente disuelta, lo cual se favoreció

agitando con la ayuda de un vortex cada 3 min. Una vez que se completo este paso se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de isopropanol para incrementar la eficiencia de la columna y después esta mezcla se pasó por las columnas con los tubos de recuperación. A continuación se centrifugo la muestra durante 1 min a 138 g y se guardo la muestra que pasó al tubo de recuperación, se lavó con 450  $\mu\text{L}$  de amortiguador PE (solución con EtOH) y se centrifugo durante 1 min. Finalmente se descarto la solución sobrenadante y se centrifugo por 1 min, además se colocó el tubo de recolección en donde quedo el producto diluido y se colocó la columna, posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador de elución EB, se incubo durante 1 min y centrifugando posteriormente para obtener el fragmento de interés puro.

En este caso también se llevo a cabo una electroforesis utilizando una cámara (de la marca Life- Technologies), en un gel de agarosa al 2 % con BrEt colocando 3  $\mu\text{L}$  del fragmento purificado para comprobar la presencia de este en el gel y corroborar su pureza.

Finalmente, al fragmento obtenido en la purificación se le determinó la concentración a una longitud de onda de 260 y 280 nm, y se mando a secuenciar.

#### **V.4 Titulación de la biblioteca de $\lambda\text{gt}10$**

Para realizar este procedimiento se emplearon 5 cajas Petri de 12.5 cm de diámetro con medio SOB<sub>M</sub> (ver anexo), la cepa que se utilizó en este experimento fue la *E. coli* C600hfl<sup>-</sup>, la cual presenta un crecimiento óptimo, bajo las siguientes condiciones nutricionales: Medio LB (50 mL), maltosa al 20% estéril (500  $\mu\text{L}$ ) y  $\text{MgSO}_4$  2 M (250  $\mu\text{L}$ ), el matraz en el cual se siembra la cepa requiere aireación por lo que se incubo a 37°C / 24hrs / 1600rpm.

Para su almacenamiento esta cepa se centrifugo a 2,003g durante 10 min a temperatura ambiente y se re suspendió en  $\text{MgSO}_4$  10 mM.

El experimento consistió en infectar durante 10 a 20 min, 250  $\mu\text{L}$  a las bacterias del cultivo previamente suspendido en 8 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM con 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ) de la biblioteca, esto con el objetivo de conocer el título de la biblioteca.

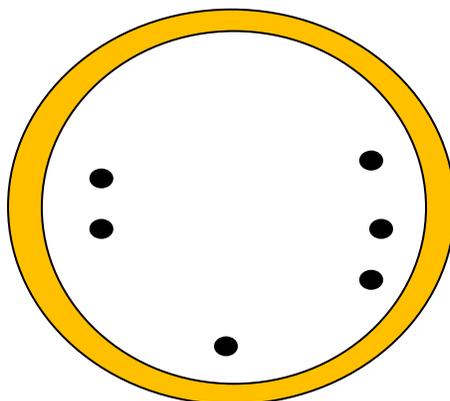
#### **V.5 Aislamiento de clonas de la biblioteca de ADNc de larva construida en $\lambda\text{gt}10$ mediante tamizajes.**

La metodología que se siguió para realizar la serie de tres tamizajes fue la siguiente: En primer lugar se cubrió la mesa de trabajo con plástico, con el fin de colocar sobre este las membranas (membranas de nitrocelulosa de la marca Hybond C) y exponerlas a cada una con las siguientes soluciones:

- a) Solución neutralizante (ver anexo), b) Solución desnaturalizante (DESNAT, ver anexo) y c) SSC 20X amortiguador de citratos (ver anexo).

A continuación se enumeraron las membranas con lápiz y las replicas de las mismas, las cajas previamente sembradas con la bacteria infectada se rotularon con marcador indeleble, en las cuales se encontraba la cantidad necesaria de UFPL requeridas para este primer tamizaje, después de esto se tomó la membrana por los extremos y se colocó en el centro de la caja hasta que se adhirió perfectamente, este paso se realizó con unas pinzas y es indispensable que se empleen guantes durante todo el procedimiento.

Posteriormente con una aguja y tinta china se realizaron marcas sobre cada membrana atravesando el agar, para poder orientar las membranas después del fijado del fago y revelado como se muestra en la siguiente imagen en donde la parte blanca corresponde a la membrana de nitrocelulosa, en negro las marcas con tinta china y en amarillo la base de agar.



**Fig. 15** Forma en la cual se marca la membrana de nitrocelulosa, para poder orientarla después del fijado y revelado.

Una vez que se dejó adherir la membrana, esta debe retirarse y colocarse sobre 3 mL de la solución DESNAT (ver anexo) incubando 3 min cada una, cuidando que la solución cubra perfectamente la membrana y que los fagos se encuentren en la parte superior, es decir que la solución no los toque directamente. Acabando el tiempo de incubación cada membrana se colocó encima de 3 mL de solución neutralizante (ver anexo) incubando 3 min y realizando este pasó por duplicado. Posteriormente se colocaron todas las membranas en un recipiente de vidrio con solución SSC2X para eliminar restos de agar que hayan quedado adheridos a la membrana y/o bacterias agitando suavemente de forma manual durante un lapso de 5 min. Al concluir con la etapa anterior todas las membranas se colocaron sobre un pedazo de papel filtro separadas unas de otras para secarlas, siempre verificando que los fagos estuvieran en la parte superior y una vez secas el ADN se fijo con luz UV durante 1 min, utilizando el equipo UV Stratalinker 2400 de la casa comercial Stratagene.

Una vez fijado el ADN se dejaron las membranas en solución de hibridación por 2 hrs en agitación y después de este tiempo se añadieron 10  $\mu$ L de espermatozoos de salmón incubando por 1 h a 50°C en agitación moderada. Este procedimiento se realiza de la misma forma para las replicas de las membranas. Posteriormente, se incorporó la sonda marcada por la técnica de dUTP-biotina, descrita en la sección **V.6** y las membranas se incubaron con agitación moderada durante toda la noche

a 50°C, al siguiente día se decantó la solución de hibridación con la sonda marcada y las membranas se lavaron con la solución SSC4X durante 15 min con agitación a una temperatura de 50°C, al terminar el tiempo se decantó la solución y se incorporó la solución estabilizadora de streptavidina con el conjugado en solución de bloqueo incubando durante 15 min con un agitación suave. Al concluir esta etapa se realizaron cuatro lavados con la solución SSC4X, para lo cual se transfirieron las membranas a un contenedor limpio y seco, cada lavado se realizó con agitación a temperatura ambiente durante 5 min y después se agregó el sustrato, e incubó durante 5 min en agitación a temperatura ambiente y por último se realizó el revelado de las membranas por radiografías de rayos X de la marca KODAK, lo cual se llevó a cabo en condiciones de completa oscuridad para evitar y prevenir que las placas se velen por la luz.

Para realizar el revelado se cubrió la mesa con plástico y se colocaron las membranas sobre este añadiendo el sustrato de quimioluminiscencia de 3 a 5 mL para cada membrana verificando que cada una se cubra perfectamente con esta solución, se colocan unas marcas con papel filtro y tinta china para orientar el orden de las membranas y se incuban durante 2 hrs en los casetes de Rayos X en completa oscuridad, por último se fijaron y revelaron evitando cualquier contacto con la luz, se lavo cada placa con agua y se dejaron secar.

Para concluir esta etapa se realizó el aislamiento de las clonas, haciendo coincidir las radiografías con las cajas Petri y aquellas que coincidan perfectamente correspondían a las clonas que hibridaron con el fragmento o sonda, para lo cual se picaron con una pipeta Pasteur con la parte trasera para el primer y para el segundo tamizaje y con la punta de la pipeta para el tercer tamizaje, colocando cada clona en 1,000 µL de SM (ver anexo) estéril y almacenándolas a 4°C.

Las condiciones que se tomaron en cuenta para los tamizajes fueron las siguientes:

**Tamizaje primario:** En este primer tamizaje se deseaba obtener un aproximado de 10,000UFP, para lo cual se emplearon 3.1 µL de las diluciones antes mencionadas para infectar por 20 min a 37°C 250 µL de bacteria *E. coli* C600hfl

crecida en las condiciones mencionadas en el punto **V.1**, posteriormente se añadió la bacteria con el bacteriófago a 5 mL de medio SOBMTOP (ver anexo, el cual debe encontrarse a una temperatura de 55°C) y se agitó suavemente para ser sembrada en las cajas Petri con medio SOBMTOP (ver anexo), se dejó solidificar por 30 min a temperatura ambiente y por último se incubaron las cajas Petri durante 24 hrs a 37°C. Las clonas positivas se colocaron en 1 mL de SM.

**Tamizaje secundario:** Siguiendo el mismo protocolo antes mencionado, se realizó nuevamente la titulación de las clonas aisladas en el tamizaje primario, se prepararon diluciones consecutivas de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  con el fin de obtener 1,000 UFPL/mL, realizando la misma metodología para la infección.

**Tamizaje terciario:** En este se aíslan las clonas provenientes del tamizaje secundario, se titulan para colocar alrededor de 100 UFPL/mL por caja, llevando a cabo el mismo procedimiento de infección que en el tamizaje primario para la infección de la cepa *E. coli* C600hfl-.

### **V.6 Marcaje de la sonda**

Para el marcaje de la sonda se empleó un método no isotópico (Voet D y Voet J., 1995) conocido como incorporación de dUTP-biotina a ADN mediante la PCR, el cual consistió en combinar los siguientes reactivos: 5 µL de amortiguador de la PCR, 5 µL de dNTP's (A,C,G), 5 µL de DTTP, 0.5 µL de bio-11-UTP, 1 µL (10 pm) de cada uno de los cebadores (GLO-I 3' y GLO-I 5'), 4 µL de ADNc obtenido previamente en el punto **V.2** y purificado como se indica en el punto **V.3** y por último se añadió el volumen restante de H<sub>2</sub>O grado M.Q para ajustar la reacción a un volumen final de 50 µL y después de esto se introdujo el tubo de reacción en un termociclador empleando el programa que establece las siguientes condiciones de reacción: Un primer ciclo de 95°C por 3 min, 54°C por un minuto, 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.

Finalmente, se cargaron 3  $\mu\text{L}$  del Producto fresco en un gel de Agarosa con BrEt, para comprobar que el marcaje del fragmento se llevó adecuadamente.

Es importante mencionar que antes de agregar esta sonda marcada a la solución de hibridación con las membranas debe desnaturalizarse el ADN marcado a  $100^{\circ}\text{C}$  por 2 min e incubarse a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 min.

### **V.7 Recuperación de ADN de fagos**

Para esto se utilizaron las diluciones  $1 \times 10^6$  de los fagos que correspondieron a las clonas positivas aisladas del tamizaje terciario para infectar 250  $\mu\text{L}$  de un cultivo de bacterias *E. coli C600hf* y se crecieron toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al siguiente día se agregaron 5 mL de SM en cada caja Petri completamente lisada en agitación suave durante 2 hrs, se recupero la solución formada por los fagos y las bacterias y se vaciaron en un tubo Falcon de 15 mL. Las cajas se lavaron con 2.5 mL de SM dejando incubar 15 min a temperatura ambiente y agitación suave, la solución se junto con los 5 mL anteriores. A los 7.5 mL de SM conteniendo bacterias y fagos se le agregan 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo para evitar contaminación y la mezcla se dejó reposar durante 10 min, se centrifuga a 7.3 g 10 min y se recupero el sobrenadante. Para concluir esta etapa se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de cloroformo para eliminar y evitar la contaminación por microorganismos y se almaceno cada tubo a  $4^{\circ}\text{C}$ , a esto se le denomina PLATE STOCK.

### **V.8 Purificación de ADN a partir de fagos**

La preparación de ADN de fagos de las clonas aisladas, se lleva a cabo transfiriendo un volumen de 700  $\mu\text{L}$  del PLATE STOCK a un tubo eppendorf estéril, a continuación se adicionan 700  $\mu\text{L}$  de la solución de PEG al 20 % y se incuba 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , después se centrifuga 16,000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desecha el sobrenadante y el precipitado se disuelve en 200  $\mu\text{L}$  de SM estéril. Posteriormente se le adiciona 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa (1 mg/mL) y 2  $\mu\text{L}$  de DNAsa (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incubando durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , después se adicionan 2  $\mu\text{L}$  de SDS al 10 % y 2  $\mu\text{L}$  de EDTA (5 M pH= 8.0) y se incuba durante 15 min a  $70^{\circ}\text{C}$ . Se incorporaron 200  $\mu\text{L}$  de fenol saturado con TE a la mezcla y se agitó en vortex un par de veces

dejando reposar durante 2 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitó en vortex. A continuación el tubo se centrifuga durante 2 min y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron nuevamente 200  $\mu$ L de cloroformo se agitó y se dejó reposar durante 2 min y completado el tiempo se centrifuga el tubo durante 1 min, se recupera la fase superior en un tubo nuevo y se repite el paso anterior. El ADN del fago se precipita adicionando acetato de sodio 3 M pH= 5.2 y etanol (EtOH) absoluto, se agita y guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente se centrifugó el tubo a 16,000 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desecha el sobrenadante y el precipitado se lava con 200  $\mu$ L de etanol al 70 % enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó durante 5 min, se desecha el sobrenadante, el precipitado se seca y suspende en 30  $\mu$ L de TE. Finalmente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con BrEt a 100 volts cargando 3  $\mu$ L de las muestras de ADN obtenidas de los diferentes PLATE STOCKS.

### **V.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para cada reacción de PCR se empleo 1  $\mu$ L (100 ng) de cada fragmento (DNA molde) ya que todas las muestras presentaron la misma concentración en el gel, los cebadores empleados fueron  $\lambda$ gt10 3'-Si y  $\lambda$ gt10 5'-Si (1  $\mu$ L de cada uno, 50 pm), y los reactivos del estuche de PCR (Biotecnologías Universitarias), 5  $\mu$ L de solución amortiguadora 10X, 2.5  $\mu$ L de  $\text{MgCl}_2$  20X, 5  $\mu$ L de dNTP's 2 mM, 0.5  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L) de la enzima Taq polimerasa y un  $\text{H}_2\text{O}$  grado M.Q c.b.p un volumen final de 50  $\mu$ L.

El PCR se corrió bajo las siguientes condiciones: un ciclo de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos,  $50^{\circ}\text{C}$  por 1 min y 2 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 30 ciclos de 1 min a las temperaturas antes mencionadas y por último un ciclo de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 1min,  $50^{\circ}\text{C}$  por 1 min y  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min en un termociclador GeneAmp PCR system modelo 9700 (Applied Biosystem).

Por último se realizó un gel de agarosa con BrEt con 3 $\mu$ L de cada muestra para identificar los fragmentos que amplificaron con esta reacción.

### **V.10 Ligación**

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el estuche de clonación TOPO-TA Cloning System de la casa comercial Invitrogen, para lo cual se emplearon los siguientes reactivos y volúmenes 1 µL del vector pCRII, 1 µL de amortiguador de ligación salino, 1 µL de Agua y 3 µL del PCR fresco (obtenido en el punto **V.9**). Por último la reacción se incubó a temperatura ambiente 1 h, a esta ligación la denominamos FgGLO-I-LGT10F+R CLONA 11.1 en pCRII.

Esta ligación se diluyó (2 µL de la ligación y 53 µL de H<sub>2</sub>O) y se electroporaron 2 µL de la dilución con 20 µL de células competentes de *E. coli* cepa TOP10. Las condiciones de electroporación fueron 1800 volts empleando un electroporador de la marca eppendorf modelo 2510, posteriormente se añadieron 180 µL de medio SOC en condiciones estériles a las células electroporadas para recuperación incubando durante 1 h a 3.3g y 37°C. Por último se sembraron 100 µL de las ligaciones transformadas en un medio SOBMs sólido con ampicilina 100 µg/mL utilizando una varilla de metal en L estéril. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 hrs y al día siguiente se observó el crecimiento bacteriano (colonias).

Posteriormente, las clonas se seleccionaron empleando la PCR con el programa: un ciclo de 95°C durante 3 min, 50°C por 1 min y 2 min a 72°C; 30 ciclos de 1 min a las temperaturas antes mencionadas y por último un ciclo de 95°C durante 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 5 min en un termociclador GeneAmp PCR system modelo 9700 (Applied Biosystem).

### **V.11 Preparación alcalina pequeña de DNA plasmídico (MINIPREP)**

Las bacterias transformadas que presentaban el inserto de interés se crecieron en 3 mL de medio LB con ampicilina (ver anexo), dejando incubar los cultivos 24 hrs, 37°C en agitación. Centrifugar 1 mL del cultivo a 8.160 g durante 1 min para empastillar las células y descartar el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 200 µL de solución 1 (Ver anexo), se agita cada tubo en un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, inmediatamente se adicionan 400 µL de

solución 2 desnaturizante fresca (Ver anexo) y se mezcla gentilmente de forma manual, se incuba en hielo durante 5 min. A continuación se adicionan 300  $\mu$ L de solución 3 (Ver anexo), se incuba por 5 min en hielo, se centrifuga a 8.160 g durante 20 min a 4°C, se pasa el sobrenadante con puntas nuevas cuidando de no llevarse la pastilla blanca formada durante la centrifugación y a este sobrenadante se le agregan 600  $\mu$ L de isopropanol frío y se incuba la mezcla por 5 min a 4°C; se centrifuga a 8.160 g por 5 min, se desecha el sobrenadante rápidamente cuidando de no llevarse la pastilla, esta se centrifuga por pulsos para quitar el remanente con puntas nuevas sin tocar la pastilla, se adicionan 100  $\mu$ L de etanol al 70 % frío, se centrifugar nuevamente, se desecha el sobrenadante y finalmente la pastilla se suspende en 50  $\mu$ L de TE estéril. 3  $\mu$ L de las muestras se verifican en un gel de agarosa con BrEt.

#### **V.12 Preparación alcalina grande de DNA plasmídico (BIG PREP)**

Para obtener el ADN plasmídico se realizó el método de la lisis alcalina, una vez completado el tiempo de incubación de un cultivo de 50 mL, este cultivo se centrifugó a 2,000 g durante 15 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el botón se re suspendió en 5 mL de solución hipotónica (ver anexo), dejando incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Al terminar este tiempo se agregaron 10 mL de solución alcalina o solución 2 (ver anexo), se agitó la mezcla suavemente por inversión de forma manual y se incubo en hielo durante 10 min, a continuación se incorporaron 7.5 mL de solución 3 (ver anexo) dejando reposar 10 min en hielo, al concluir este tiempo se centrifuga a 2,000 g durante 10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El botón se re suspende en un tubo Falcon en 200  $\mu$ L de TE y se le agregan 2  $\mu$ L de ARNasa (1 mg/mL) incubando durante 30 min a 37°C. Posteriormente la muestra se extrae con fenol y cloroformo y la fase acuosa se pasa por una columna de sefarosa CL4B previamente equilibrada con TE. Fracciones de 500  $\mu$ L fueron colectadas. Las fracciones conteniendo el ADN plasmídico se observan en un gel de agarosa con BrEt,

Por último las fracciones que contienen el ADN plasmídico se precipitan con acetato de sodio 3 M pH 5.2 y etanol absoluto, dejando la mezcla de toda la noche a -70°C. Las muestras se centrifugan durante 10 min a 16,000 g, se desecha el sobrenadante, la pastilla se seca y resuspende en 50 µL de TE. La concentración del plásmido se determina en un espectrofotómetro con una celda de cuarzo a 260 y 280 nm.

### **V.13 Secuenciación**

Los análisis de las secuencias nucleotídicas, la traducción de aminoácidos y los alineamientos tipo Clustal obtenidos fueron realizados utilizando el programa PCGENE Versión 2.1. Para las comparaciones así como los alineamientos de la secuencia se usaron los programas de BLAST y CLUSTAL X del National Center for Biotechnology Information (NCBI), obtenidos a su vez de la base de datos PUB MED.

Esto se llevó a cabo mediante el método de Sanger en la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, se utilizó como templado el ADN plasmídico purificado con anterioridad. La secuenciación se llevó a cabo automáticamente por PCR utilizando el estuche ABI prism big dye terminador; se necesita una cantidad mínima de 500 ng de ADN que se llevó a un volumen de 12 uL con agua desionizada. Se agrega 1uL de oligonucleótidos marcados fluorescentemente (2-5 uM) y se agita suavemente (mezcla maestra). Para las reacciones de terminación se necesitan 3 uL de dideoxinucleótidos del estuche (un tubo de adenina, uno de citocina, uno de guanina y uno de timina) a los que se les añade 3 uL de la mezcla maestra, se agitan los tubos y se someten a PCR. Finalmente la muestra se pasó por una columna de sefarosa G-50 para eliminar los excesos de dideoxinucleótidos y cebadores marcados que no se incorporaron durante el proceso. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador SEQ4x4 de Amersham Pharmacia Biotech.

#### **V.14 Digestión con endonucleasas de restricción**

Para realizar la digestión de las clonas obtenidas referentes a la GLO-I se utilizaron las endonucleasas Eco RI y Bam HI. En la mezcla de reacción se usaron los siguientes reactivos y volúmenes: 5 µL del fragmento clonado en el λADN del fago, 20 µL de solución amortiguadora 10X que cada enzima requiere y agua grado M.Q c.b.p 200 µL, a cada mezcla de reacción se le incorporaron 3 µL de enzima.

Las reacciones se dejaron incubar durante 4 hrs a una temperatura de 37°C y para conocer el progreso de la digestión se corrió un gel de Agarosa al 2 % con BrEt a 100 mVolts, colocando una muestra control del ADN sin digerir y también un marcador de peso molecular λHind III.

#### **V.15 Experimento in vitro con cisticercos de *Taenia crassiceps*.**

Para determinar el daño que produce el MGO sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps*, se midieron las siguientes variables: evaginación, movilidad y daño en la membrana. Para este experimento se utilizaron cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa WFU provenientes de 3 ratones hembra Balb/c de 3 meses de infección. Estos ratones se sacrificaron por dislocación cervical y posteriormente se realizó un corte con bisturí en la cavidad peritoneal para obtener los cisticercos.

Los cisticercos se lavaron con PBS y se colocaron en una caja Petri grande con esta misma solución. Posteriormente se escogieron cisticercos de 2 a 3 mm sin gemas, translúcidos, no calcificados, sin daño en la membrana y sin evaginar. Los cisticercos se incubaron en una placa con 24 pozos tipo Elisa, se colocaron 10 parásitos en cada pozo con 1 mL de medio RPMI preparado con antibióticos (Estreptomicina al 0.1 % y Ampicilina al 0.1 % y aminoácidos no esenciales 500 µL por cada 50 mL de medio); se introdujo la placa en una incubadora a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 4 hrs a lo que denominamos pre cultivo, esto tiene como objetivo que las larvas se adapten al medio.

Al finalizar el tiempo del pre cultivo se colocaron las concentraciones de MGO, las cuales se prepararon de acuerdo a la tabla 1. Se utilizaron los tiempos: 30 min, 1

h, 2 hrs, 4 hrs, 6 hrs y 24 hrs, al finalizar cada tiempo de incubación se retiro el medio de cultivo con MGO y se colocaron en medio conteniendo 1 mL de bilis por cada 3 mL de RPMI, se incubaron por 2 hrs a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> y se cuentan el número de cisticercos evaginados. Con la ayuda de un microscopio estereoscopio se determina la movilidad y el daño al parásito.

Siguiendo el mismo protocolo se determino la DL<sub>50</sub> de MGO, la cual sólo se determino utilizando las concentraciones de 0, 0.5, 2, 4, 8, 15, 25, 30 y 40 mM, incubando a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> durante un tiempo de 2 hrs y posteriormente al igual que en los cultivos se descarto el medio RPMI y se añadió la bilis para observar aquellos cisticercos que evaginaban.

**Tabla1.** Concentraciones de MGO utilizadas en el ensayo *in vitro* con cisticercos de *Taenia crassiceps*

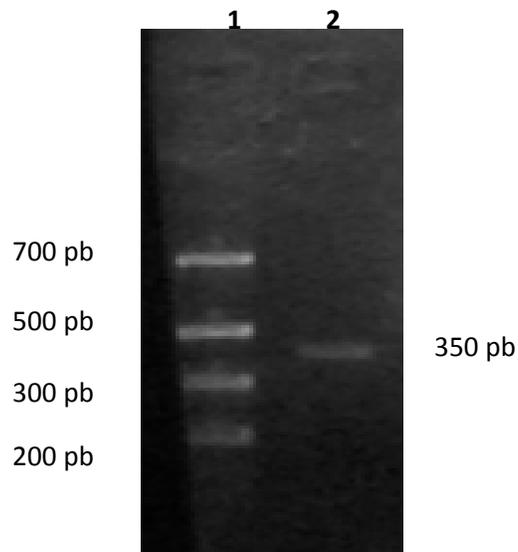
Concentración final de MGO [mM]	µL de MGO	µL de medio RPMI
<b>40,0</b>	1000	0
<b>20,0</b>	500	500
<b>10,0</b>	250	750
<b>7,5</b>	187.5	812.5
<b>5,0</b>	125	875
<b>2,5</b>	62.5	937.5
<b>1,0</b>	25	975
<b>Control</b>	0	1,000

## CAPITULO VI

### RESULTADOS

#### VI. 1 Producción de la sonda.

Mediante el método de la RT-PCR y utilizando un RNA total del estadio de cisticerco de *T. solium*, se produjo un fragmento de ~350 pb, el cual fue observado en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt como se ilustra en la figura 16. El fragmento fue purificado por la metodología que se indica en la sección **V.2 y V.3**.



**Fig. 16.** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, que muestra el producto purificado del fragmento de la glioxalasa I (GIO-I) obtenido por la RT-PCR. **1)** Marcadores de tamaño (pb) y **2)** Fragmento purificado.

## VI.2 Secuencia del fragmento de ADNc que codifica para la GLO-I de

### *Taenia solium*

El fragmento de 350 pb de ADNc puro se clonó en el vector pCRII y su secuencia nucleotídica fue obtenida en un secuenciador automático, su análisis computacional en PC/GENE y comparación en bancos de datos internacionales mostraron que la secuencia codifica para una glioxalasa I de *Taenia solium*, ya que presenta una alta identidad en secuencia primaria con las GLO-I de varios organismos (Fig. 17). Una vez conocido lo anterior, este fragmento fue marcado con dUTP-biotina por medio de la PCR y utilizado como sonda para el aislamiento e identificación de clonas que codifican para una GLO-I completa de este helminto de una biblioteca de ADNc de larva.

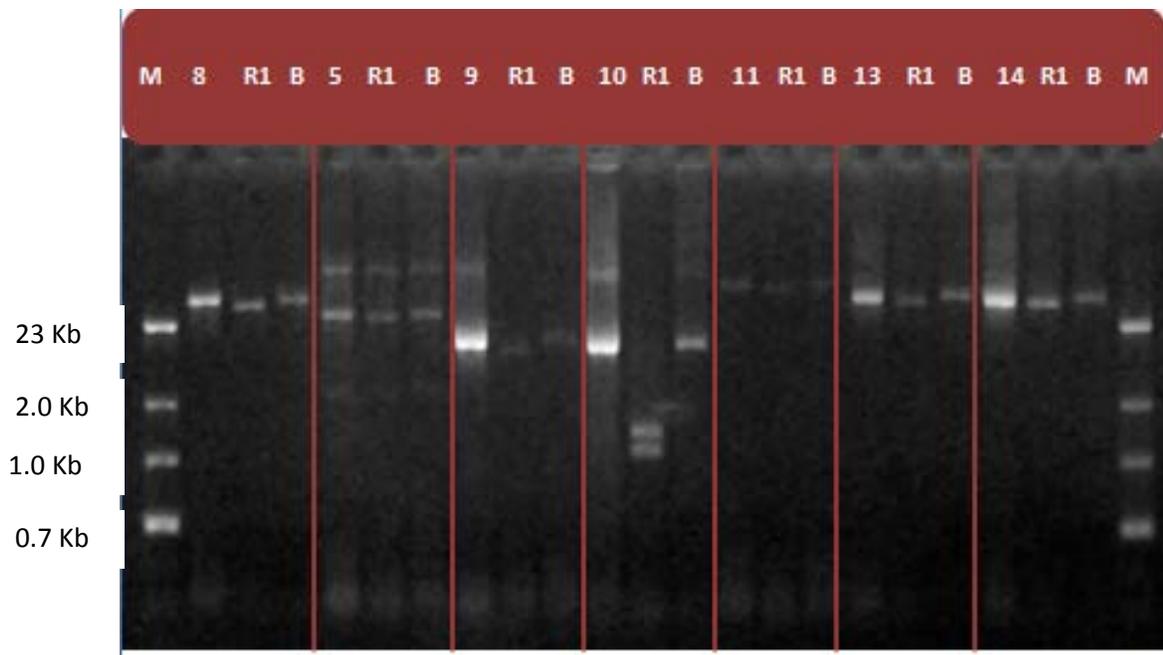
```
1  GATTACTGGTCAGAAAAGTGTGCAATGAAATTGCTGGAATCCTCAGATAAGCATGCGCTT  60
   D Y W S E K C A M K L L E S S D K H A L
61  TTTAACTATGGTGAAGGCCAGTGCCAACTGCAGTTGACGCTCGCTAGACAGCCAATTGAT  120
   F N Y G E G Q C Q L Q L T L A R Q P I D
121 CGCGGCCAAGCCTATGGCAGAGTAGCTTTTCTTGTCTAGAAATCAGCTCCCATCCCTA  180
   R G Q A Y G R V A F S C P R N Q L P S L
181 CAAGAAAAGATGGACAAAGAGGGCGAAACAGTTCTAACCGGACTAGTCAGCTTGGAAACT  240
   Q E K M D K E G E T V L T R L V S L E T
241 CCCGGGAAGGCTACTGTTGAGGTGATAATCCTTGCTGACCCTGATGGTCACGAAATCTGC  300
   F G K A T V E V I I L A D P D G H E I C
301 TTTGTGGGCGATGAGGCTTTTTGCACTCTCTCGCAGGCTGACCCAAAAGCCGACGAACTG  360
   F V G D E A F C S L S Q A D P K A D E L
361 TTGGCAGCGGCAATGGCTGAGGACCATAGCGACTCCTGGTTCCAAAAACGTGGCGGCAAAA  420
   L A A A M A E D H S D S W F Q K R G G K
421 AAAGCGCAGTAA  432
   K A Q -
```

**Fig. 17.** Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento amplificado por RT-PCR con los cebadores (GLO-I 3' y GLO-I 5') a partir de un RNA total de la larva de *T. solium*, subrayados en verde se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento.

Antes del tamizaje, se realizó la titulación de la biblioteca de ADNc de larva de *T. solium* construida en el fago  $\lambda$ gt10 que presentó un título de  $6,53 \times 10^8$  UFPL/mL. Se tamizaron un total de 30,000 UFPL en el tamizaje primario obteniendo solo 12 clonas positivas. Estas clonas individuales se titularon y se tamizaron alrededor de 1,000 UFPL por clona, obteniéndose 7 clonas positivas. Por último, en el tamizaje terciario se hibridaron 100 UFPL de cada clona positivada del tamizaje secundario y se obtuvieron 6 clonas, las cuales se denominaron GLO-I 8, 5, 12, 11, 9 y 10. Finalmente, utilizando el ADN del fago de cada clona y mediante la PCR con cebadores que flanquean el sitio de clonación del fago, se obtuvieron los fragmentos que codifican estas clonas, los que se sometieron a una digestión con endonucleasas de restricción para determinar sus diferencias y tamaños (Fig. 18).

### **VI.3 Digestión con endonucleasas de restricción.**

En la figura 18 se observa que los patrones de digestión con las enzimas utilizadas eran idénticos entre sí para las clonas GLO-I 8, 5, 12, 11 y 14 y las clonas GLO-I 9 y la GLO-I 10 eran diferentes entre sí y diferentes a las clonas GLO-I 8, 5, 12, 11 y 14. Asimismo, se observa que las GLO-I 8, 5, 12, 11 y 14 presentaban un tamaño mayor que las clonas GLO-I 9 y la GLO-I 10. Por las características antes mencionadas se decidió ligar al vector pCRII la clona 8 que poseía el mayor tamaño y era de las más abundantes, y las clonas 9 y 10 diferentes obtenida del tamizaje terciario. Las ligaciones fueron transformadas en *E. coli* TOP10. Desafortunadamente solo se logró obtener clonas de la ligación pCRII-GLO-I 8. Una clona la pCRII-GLO-ITs8.1 fue seleccionada para su secuenciación.



**Fig.18.** Electroforesis en gel de agarosa con Bromuro de etidio de la digestión con endonucleasas de restricción de las 7 clonas obtenidas del tamizaje terciario, las enzimas de restricción utilizadas fueron BamH1 (**B**), Eco RI (**RI**) y como marcador se utilizó el fago  $\lambda$  digerido con Hind III.

#### **VI.4 Secuencia nucleotídica del plásmido pCR2.1-GLO-ITs8-1**

La secuencia nucleotídica obtenida a partir de la clona pCRII GLOI-Ts8-1 muestra que el ADNc que codifica para la enzima está conformada por 1014 pb, con una composición de 274 **A**deninas que corresponden al (27%) del total de los nucleótidos, 237 **G**uaninas (23.3%), 232 **C**itocinas (22.8%) y 271 **T**iminas que conforman el último (26.7%). Además es rica en los residuos L (8.5%) y E (8.2%), mientras que los residuos más escasos son N (2.4%), M (2 %) y W (1%).

Existen 41 nucleótidos antes de ATG y 23 nucleótidos después del codón de término, incluyendo la cola de Poli A, la cual está conformada por 12 adeninas, además se localizó en la posición 982 el sitio de poliadenilación. Los nucleótidos 1 a 33 marcan la secuencia señal que dirige la proteína hacia la mitocondria.

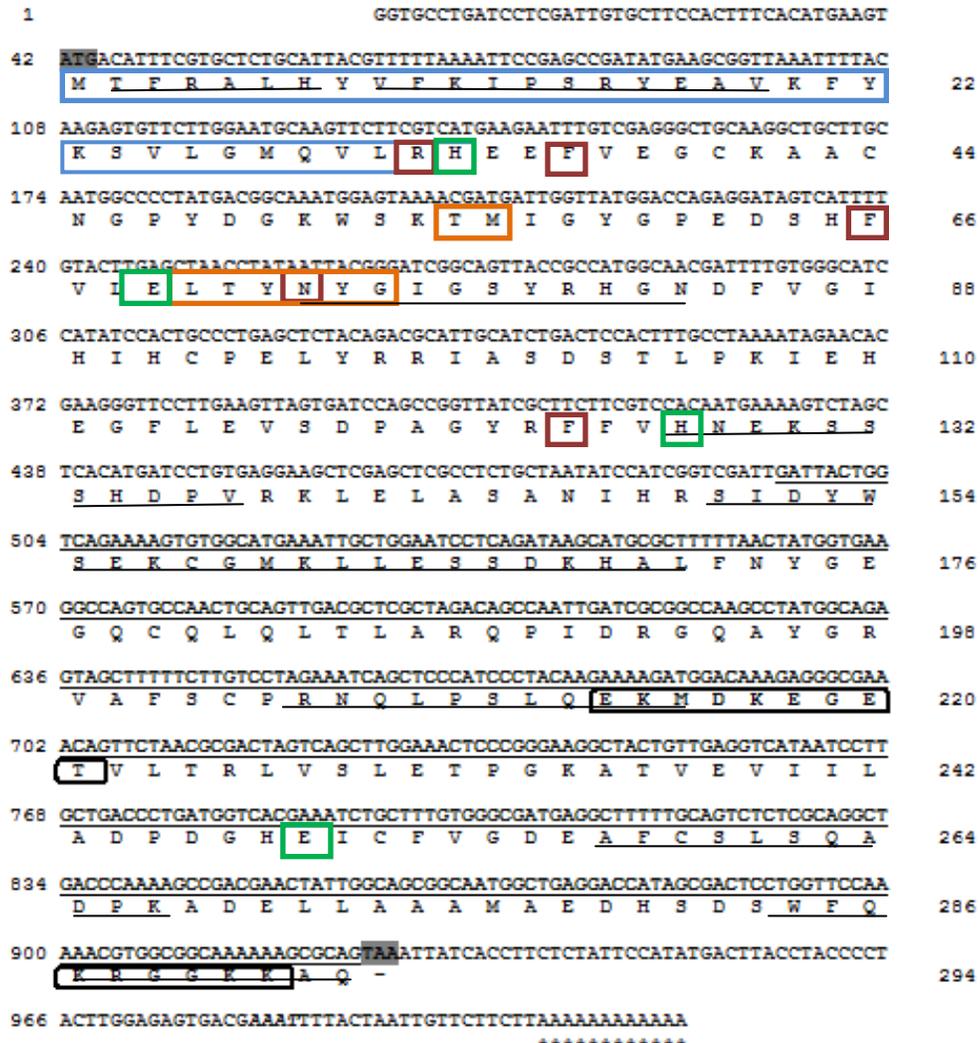
El análisis computacional de esta secuencia realizado con el programa PCGENE que se muestra en la Figura 18, reveló que esta presenta un marco abierto del nucleótido 42 encontrándose la secuencia ATG que marca el inicio de la transcripción y la secuencia de terminación TAA en el nucleótido 925 que marca el fin de la proteína. Los sitios activos de unión al GSH se encontraron en la posición R<sup>23</sup>, F<sup>37</sup>, N<sup>74</sup> y F<sup>67</sup> y F<sup>125</sup>, en cuanto a los sitios de unión a metal se encontraron dos regiones que se conservan en otras especies, ya que es importante mencionar que no hay reportes de esta enzima en helmintos y mucho menos se hace referencia a la ubicación de la enzima en los organismos encontrados en la base de datos, por lo que se sugiere que este parásito utiliza Zn<sup>2+</sup> y las regiones de unión a este se localizaron en las posiciones H<sup>33</sup>, E<sup>70</sup>, H<sup>127</sup> y E<sup>252</sup>.

Dentro del análisis se detectaron sitios de fosforilación por la proteína cinasa C en los residuos 2, 78, 155 y 166, los aminoácidos traducidos en la posición 14, 132, 210 y 262 corresponden a los sitios de fosforilación por la caseína kinasa II y finalmente un sitio de amidación se localizó en el residuo 289.

Otros análisis sobre la secuencia primaria revelaron que presenta un pI de 5.99, y tres zonas que presentaron gran hidrofobicidad, del residuo 213 al 218 (Glu-Lis-Met-Asp-Lis-Glu) del 287 al 292 (Lis-Arg-Gli-Gli-Lis-Lis) y por último los residuos 216 al 221 (Asp-Lis-Glu-Gli-Gli-Thr).

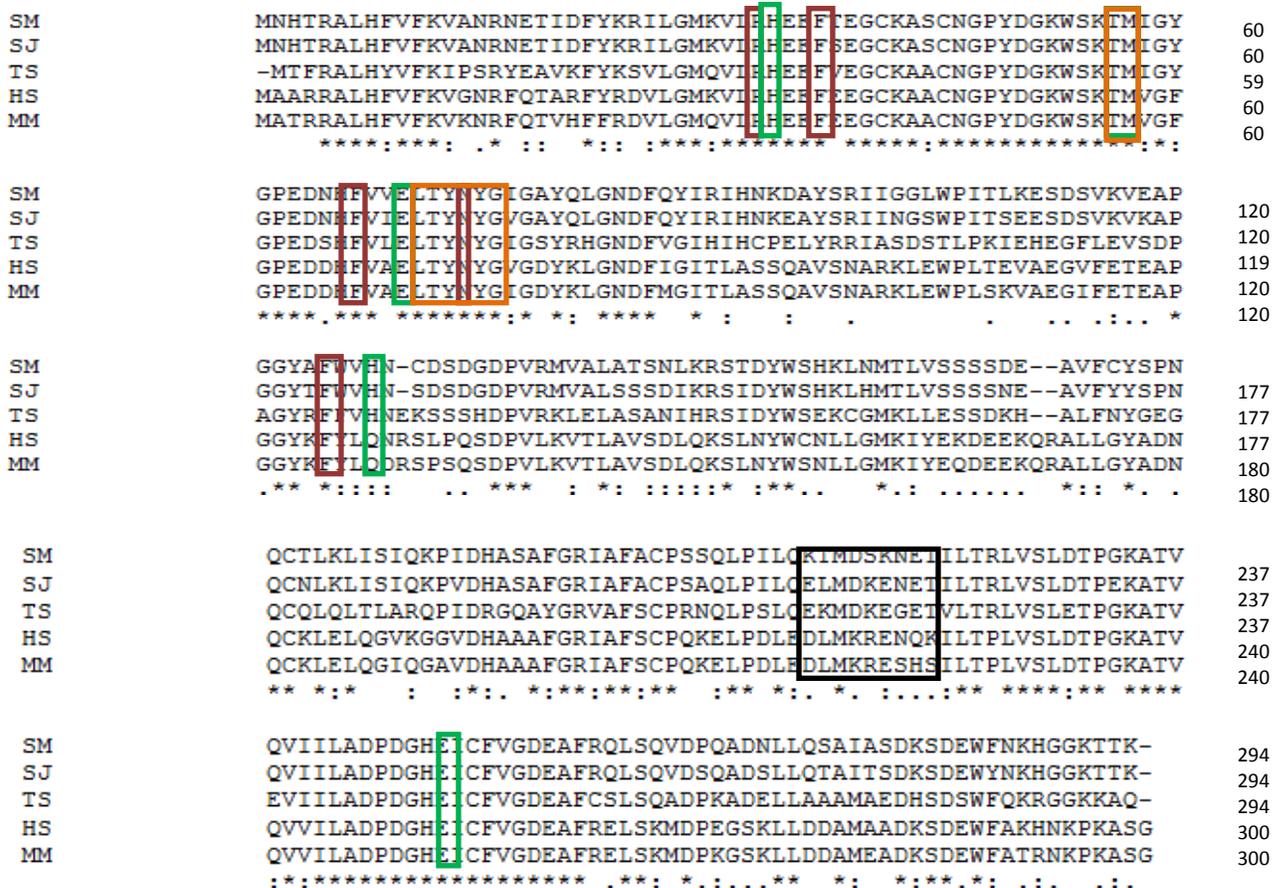
Un alineamiento de las GLO-I de *T. solium* con otras especies depositadas en bancos de datos como GenBank (Fig 19), mostraron los siguientes porcentajes de similitud con SM (*Schistosoma mansoni*) 98 %, SJ (*Schistosoma japonicum*) 98%, HS (*Homo sapiens sapiens*) 98% y MM (*Mus musculus*) 99 %. Se observa que la secuencia de *Taenia solium* cuenta con un aminoácido menos en la primera posición, pero comienza con el mismo aminoácido traducido M, además se logran identificar 20 aminoácidos completamente diferentes en comparación con las demás, los cuales se localizan en las siguientes posiciones Y<sup>8</sup>, I<sup>12</sup>, S<sup>14</sup>, A<sup>18</sup>, H<sup>81</sup>, T<sup>104</sup>, D<sup>118</sup>, A<sup>120</sup>, E<sup>129</sup>, L<sup>140</sup>, A<sup>145</sup>, G<sup>177</sup>, R<sup>192</sup>, G<sup>193</sup>, Q<sup>194</sup>, Y<sup>196</sup>, V<sup>199</sup>, V<sup>222</sup> y E<sup>230</sup>, los sitios activos para el GSH son totalmente parecidos en todas las especies al igual que los sitios en los cuales se une el Zn<sup>2+</sup>, aunque existen diferencias en las zonas

de hidrofobicidad, en la cual la más parecida es la de *Schistosoma japonicum*, los únicos residuos que cambian son una K por una L en la posición 214 y una G por una N en la posición 219.



**Fig. 19.** Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del ADNc de la clona pCRII-GLO-ITs8.1 que codifica para la GLO-I de *T. solium*. Los números de la izquierda señalan nucleótidos (pb), mientras que los de la derecha aminoácidos. Los grupos de aminoácidos subrayados corresponden a los oligonucleótidos usados para obtener la sonda. Los residuos subrayados individualmente corresponden a los sitios de fosforilación, los sombreado en gris indican los nucleótidos encargados del sitio de inicio y término de la traducción, los residuos dentro de las cajas negras corresponden a las zonas de mayor hidrofobicidad, en azul se muestra el péptido señal que dirige a la proteína a la mitocondria, en rojo se localizan los residuos que unen GSH y en verde los sitios de unión a Zn<sup>2+</sup>, en asteriscos podemos localizar la zona de poli-A.

## VI.5 Alineamiento de la secuencia.

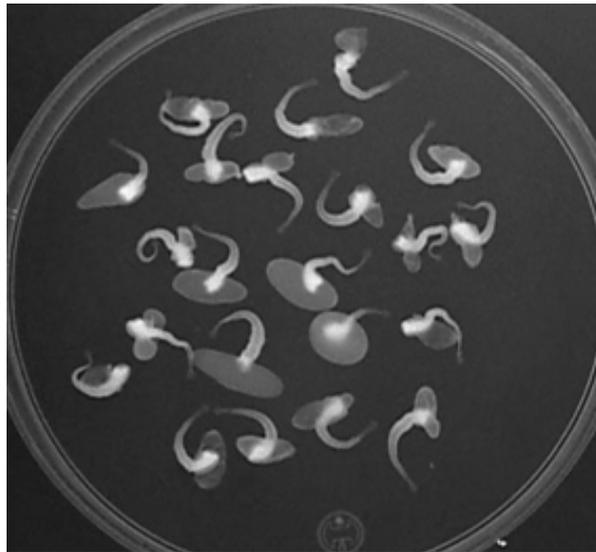


**Fig. 20.** Alineamiento múltiple de la gloxalasa I de *T. solium* con otras gloxalosas I de diferentes especies. Los números a la derecha corresponden a la cantidad de aminoácidos presentes en las GLO-I: SM (*Schistosoma mansonii*) 98%, SJ (*Schistosoma japonicum*) 98%, TS (*Taenia solium*), HS (*Homo sapiens sapiens*) 98% y MM (*Mus musculus*) 99%. Con asteriscos se pueden observar las regiones conservadas en todas las GLO-I. En cajas naranjas se muestran las regiones conservadas con otros organismos como (*Neisseria meningitidis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*), en rojas se localizan los sitios catalíticos de unión a GSH, en verde los de unión al Zn<sup>2+</sup> y en negro las zonas de mayor hidrofobicidad.

### **VI.6 Ensayo *in vitro* para determinar el daño que causa el MGO sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* (WFU).**

Para determinar el efecto que el MGO produce sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps*, las larvas después de un pre cultivo de 4 hrs en medio RPMI a 37°C, se enfrentaron a diversas concentraciones de MGO (1.0 hasta 40 mM), teniendo un control positivo para la evaginación de los cisticercos cuyo pozo no contenía el MGO, el tratamiento se realizó a diferentes tiempos desde 30 min hasta 24 hrs. Después de haber transcurrido cada tiempo de incubación con las concentraciones de MGO respectivas, se descartó el medio RPMI con MGO y se colocaron en medio RPMI con bilis porcina, la cual se dejó actuar por 2 hrs para observar la evaginación de los cisticercos.

Este parámetro se consideró como positivo cuando el gusano salió completamente del cisticerco para exponer el escólex como se presenta en la fig. 21.



**Fig.21.** Fotografía del proceso de evaginación en cisticercos (Ochoa Alicia, Facultad de Medicina, 2010).

Los cisticercos controles evaginaron el 100 % y en todos los casos se observó una alta movilidad, lo que nos indica que los cisticercos estaban vivos, además no presentaban daño antes de ser expuestos con el MGO.

Al observar el daño que produjo el MGO a los 30 min, se puede afirmar que no hay una disminución significativa en cuanto a la evaginación pero si la hay en la movilidad, ya que se observó una reducción total a la concentración de 7,5 mM siendo constante para el resto de las concentraciones.

Para el tiempo de 1 hora se llegó a obtener la mitad de la evaginación en los cisticercos a la más alta concentración (40 mM) y en cuanto a la movilidad esta fue similar que en el tiempo anterior.

Después de exponer a los cisticercos durante 2 hrs a MGO, se observó que la movilidad fue idéntica a los tiempos antes mencionados, en cuanto a la evaginación sólo el 60 % de cisticercos evaginaron a la concentración de 20 mM, sin embargo no fue hasta la concentración de 40 mM cuando el 70 % de los cisticercos presentaron una movilidad nula y no evaginaron.

En lo que refiere al tiempo de 4 hrs, se logró apreciar una disminución significativa en cuanto a la movilidad, la cual llegó a cero a una concentración de 2,5 mM y se mantuvo constante para el resto de las concentraciones, además de que solo evagino el 40 % de los cisticercos a las concentraciones de 20 y 40 mM.

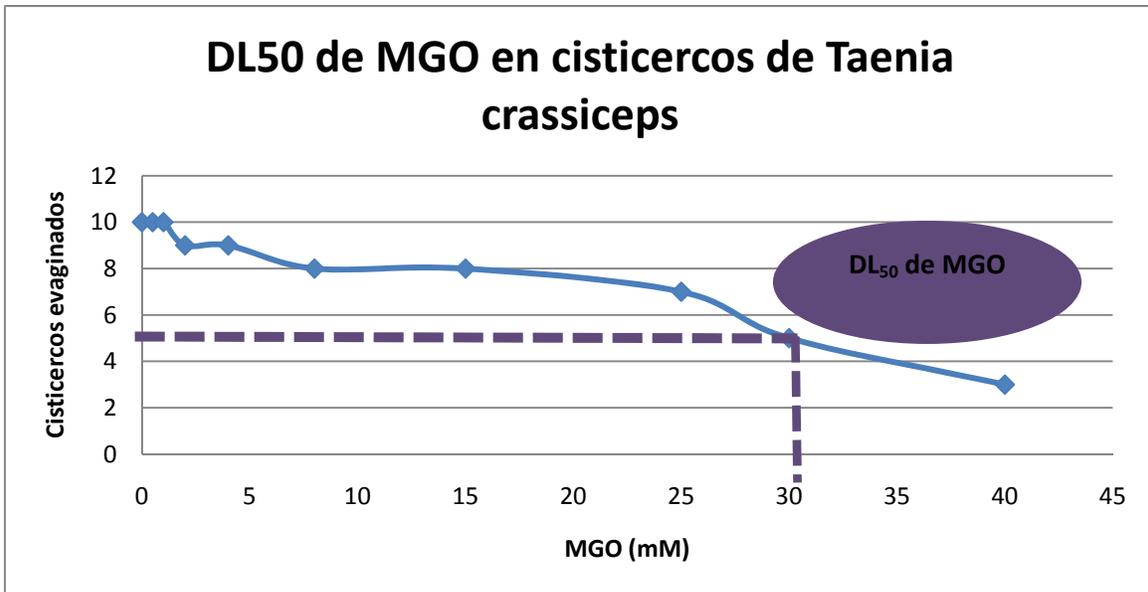
Para el tiempo de 6 hrs no se observó una disminución significativa en cuanto a la movilidad de los cisticercos, en lo que respecta a la evaginación se logró la evaginación hasta el 50 % de las larvas a la concentración de 7,5 mM, pero además se identificó daño en la membrana (fisuras) a partir de la concentración de 5,0 mM y turbidez en el medio por el daño causado en las membranas del cisticerco.

Después de enfrentar a los cisticercos durante 24 hrs la movilidad y evaginación de estos no mostró variaciones significativas, ya que esta se mantuvo constante con respecto al tiempo anterior, sin embargo si se percibió una variante en cuanto a la producción de turbidez en el medio y daño en la membrana de los cisticercos la cual empezó a la concentración de 2,5 mM (Tabla 3).

La DL50 se determinó interpolando en la grafica el dato del 50% de cisticercos evaginados (viabilidad) expuestos por 2 hrs a diferentes concentraciones de MGO (ver Tabla 3), resultando una DL50 correspondiente a 30mM de MGO.

**Tabla 3.** Ensayo *in vitro*, para determinar el daño que causan diferentes concentraciones de MGO a diferentes tiempos de exposición en los cisticercos de *Taenia crassiceps*. Se evaluó movilidad (Movilidad: +++ alta, ++ medio, + baja, 0 nula), Evaginación de las larvas (a/b donde a: número de cisticercos evaginados y b: número total de cisticercos empleados), Daño en la membrana de los cisticercos y turbidez en el medio.

Concentración [MGO] /tiempo	Control	1,0mM	2,5mM	5,0mM	7,5mM	10mM	20mM	40mM
<b>30 min</b>	+++ 10/10	+++ 10/10	++ 10/10	+ 10/10	0 8/10	0 8/10	0 9/10	0 8/10
<b>1 h</b>	+++ 10/10	+++ 10/10	++ 10/10	+ 10/10	0 7/10	0 7/10	0 7/10	0 5/10
<b>2 hrs</b>	+++ 10/10	+++ 9/10	++ 10/10	+ 8/10	0 8/10	0 7/10	0 6/10	0 3/10
<b>4 hrs</b>	+++ 10/10	++ 9/10	0 9/10	0 8/10	0 6/10	0 7/10	0 4/10	0 4/10
<b>6 hrs</b>	++ 10/10	++ 8/10	0 8/10	0 8/10	0 5/10	0 6/10	0 6/10	0 3/10
<b>24 hrs</b>	+++ 10/10	+ 8/10	0 7/10	0 6/10	0 5/10	0 3/10	0 3/10	0 3/10



**Gráfica 2.** Determinación de la DL<sub>50</sub> de MGO enfrentando cisticercos de *Taenia crassiceps* con concentración de 0 a 40 mM, la lectura del ensayo se realizó a las 2 hrs, determinando la movilidad y la evaginación de los cisticercos en medio RPMI con bilis de cerdo.

## CAPITULO VII

### DISCUCIÓN

El sistema de las glioxalidas es conocido desde hace 90 años (Creighton D., et al., 2001), sin embargo aun en la actualidad existen pocos reportes sobre este en helmintos. Las enzimas que lo forman presentan una ruta muy importante en la desintoxicación del MGO en muchos organismos como las bacterias, plantas, hongos, levaduras, parásitos y mamíferos (Thornalley P.J., et al., 1990), (Sukdeo N., et al., 2004). La GLO-I es la principal enzima de esta ruta, ya que en muchos reportes se pone de manifiesto su alta actividad a diferencia de la GLO-II (Thornalley P.J., et al., 1990) así como su papel dentro de la vía, es la primera enzima que actúa en esta ruta metabólica y es indispensable mencionar que sin su presencia la vía no podría llevarse a cabo. Este sistema lleva a cabo la desintoxicación de metabolitos altamente reactivos que inducen las células a la formación de especies reactivas de oxígeno y a la apoptosis, como es el caso del MGO y otros hemitioacetales u oxoaldehídos que inducen a la formación de los AGES (Thornalley P.J., et al., 1999 y Thornalley P.J., et al., 2003).

Por ello en este proyecto decidimos trabajar con esta enzima en un parásito en especial *Taenia solium*, un organismo del cual no se tenían reportes sobre su existencia ni caracterización.

Como primer paso del proyecto se llevó a cabo el aislamiento de ADNc que codifica para la GLO-I de este parásito, realizando la producción de una sonda de ADN, por medio de la técnica de RT-PCR y PCR, utilizando como reactivo principal RNA total de larva de *T. solium* y los oligonucleótidos específicos (GLO-I 3' y GLO-I 5'), los cuales fueron diseñados de regiones conservadas de la enzima para obtener un fragmento de ~350 pb. En el análisis de esta secuencia nucleotídica mostró que presentaba una alta identidad en secuencia primaria con las GLO-I de varios organismos. Es importante destacar la gran importancia que tiene la metodología empleada en la producción de la sonda, ya que podemos afirmar que esta técnica es muy eficiente para generar sondas para el aislamiento de diferentes genes que codifican para enzimas de este parásito, algunos

ejemplos que se han logrado en el laboratorio han sido el aislamiento del ADNc que codifica para la tiorredoxina citosólica (Trx) (Guzmán O., 2010), superóxido dismutasa (SOD) (Castellanos A., 2002), glutatión transferasa (GST) (Torres A., 2004) y las proteínas de unión a caja TATA (PUT) (Rodríguez O., 2009).

Este fragmento de GLIO-I fue utilizado como sonda, en un tamizaje de 30,000 fagos de una biblioteca de ADNc de larva de *Taenia solium*. Estas bibliotecas de ADNc a diferencia de otras bibliotecas presenta la ventaja de no contener intrones (Mathews C., et al., 2003). Se aislaron siete clonas de ADNc que podrían codificar para esta enzima, encontrando diferencias en cuanto a tamaño entre las clonas 8, 5, 12, 11 y 14 las cuales presentaron un tamaño mayor a 23 kb y eran idénticas en el patrón de restricción entre si y las clonas 9 y 10 que presentaron un tamaño menor a 23 kb y un patrón idéntico entre ellas. Sin embargo, después del proceso de selección sólo fue posible aislar, clonar y secuenciar una de ellas del primer grupo, la cual se identificó como pCR11-GLO-I Ts8.1. Con esto podemos concluir que esta técnica puede emplearse para aislar ADNc o genes completos de interés, como fue este caso de la GLO-I de *Taenia solium*.

Se analizó la secuencia nucleotídica de la clona pCR11-GLO-I Ts8.1 así como la de aminoácidos y se encontró una alta identidad con otras GLO-I reportadas en GenBank (SM (*Schistosoma mansoni*) 98%, SJ (*Schistosoma japonicum*) 98%, HS (*Homo sapiens sapiens*) 98% y MM (*Mus musculus*) 99%). Esta enzima tiene un porcentaje mayor de parentesco con la GLO-I de *Mus musculus*, de acuerdo al BLAST y CLUSTAL, debido al mayor número de aminoácidos similares que contienen, sin embargo en el análisis de BLAST aparece primero la GLO-I de *Schistosoma mansoni*, debido a que los aminoácidos que componen los motivos característicos de estas enzima son idénticos en los helmintos, lo que a su vez indica que son organismos filogenéticamente más cercanos, un aspecto interesante es que esta enzima presenta regiones conservadas no solo con especies eucariontes si no también con organismos procariontes como *Neisseria meningitidis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* (Lan Y., et al., 1995), (Kizil G.,

et al., 2000) en especial dos regiones que corresponden a TM y ELTHNWG (Kizil G., et al., 2000), (Frickel E., et al., 2001). Lo anterior nos permite afirmar que esta es una enzima que comparten muchos organismos y *Taenia solium* no es la excepción, permitiendo así la supervivencia de los organismos mencionados ya que como se indica en la parte de introducción el MGO es el principal sustrato de la GLO-I, pero no por ello es el único compuesto que participa en esta vía.

Si bien se tienen reportes del aislamiento de los genes que codifican para la GLO-I de *Trypanosoma cruzi* y *Neisseria meningitidis* (Kizil G., et al. 2000), (Vickers T., et al., 2004) no se describe el sitio en el cual se localiza la enzima, es por ello la importancia de este reporte.

En esta secuencia observamos características muy peculiares comenzando con la región del splicing alternativo que codifica para un péptido señal que dirige la enzima a la mitocondria, siendo este el primer reporte en este tipo de helmintos para este orgánulo, con lo cual podemos sugerir que el ADNc aislado corresponde a una GLO-I mitocondrial. Por otra parte las clonas 9 y 10 encontradas que presentaron un patrón de restricción diferente al ADNc de la GLO-I encontrada, podría pensarse que podrían ser GLO-I del citosol.

En cuanto a la mitocondria que putativamente sería el sitio en el cual se localiza la clona 8 que se aisló, la enzima tiene la función de llevar a cabo reacciones oxidoreducción que permiten el sustento energético de la célula como son: fosforilación oxidativa, ciclo de Krebs así como la desintoxicación de MGO (Voet D., et al., 1995). Actualmente se ha descubierto que las mitocondrias poseen una proteína con propiedades contráctiles similares a la actina-miosina de las fibras musculares que producen movimiento celular.

Esta metaloenzima es considerada como miembro de las  $\beta\alpha\beta\beta$  y VOC (quelatos vecinos al oxígeno) (Creighton D., et al., 2001) los análisis de la secuencia primaria nos permitieron conocer que presenta el arreglo en tándem  $\beta\alpha\beta\beta$  y localizar las regiones que forman la hendidura en la cual se localizan los sitios de unión al metal. En la mayoría de las especies el metal identificado es el  $Zn^{2+}$ ,

aunque en algunas bacterias es el  $\text{Ni}^{2+}$ . Debido a la identificación de los aminoácidos que unen al  $\text{Zn}^{2+}$ , residuos H<sup>7</sup>, E<sup>70</sup> y E<sup>252</sup> en el sitio activo de la clona pCRII-GLO-I Ts8.1, por esto se piensa que es el Zn el metal que contiene la GLO-I aislada. Asimismo, los aminoácidos del sitio para la unión al GSH se encontraron en la posición R<sup>23</sup>, F<sup>37</sup>, N<sup>74</sup>, F<sup>67</sup>, F<sup>125</sup> y están de acuerdo a lo encontrado para otras GLO-I.

Además de la secuencia primaria deducimos su pI de 5.99 y algunas regiones hidrofóbicas que solo se conservan en *Taenia solium* y *Schistosoma japonicum*, cambiando en dos aminoácidos en las posiciones 214 y 219. Datos que pueden servir para la purificación de la enzima en el futuro. Asimismo, dentro del análisis se detectaron sitios de fosforilación por proteínas cinasas, los cuales tienen una función regulatoria en algunas enzimas, como en la vía de la síntesis de ATP. La fosforilación puede llevar a cambios en la estructura del sitio activo que afectan la catálisis modificando la afinidad de fijación del sustrato (Lan Y., et al., 1995).

Cabe mencionar que en el nucleótido 42 se localizó el codón ATG que marca el inicio de la transcripción y la secuencia de terminación TAA en el nucleótido 925, por lo que podemos afirmar que el fragmento aislado codifica para una GLO-I completa lo que coincide con varias GLO-I, previamente reportadas.

Otro de nuestros objetivos dentro de este proyecto fue conocer el daño y la DL<sub>50</sub> del MGO en experimentos *in vitro* con cisticercos de *Taenia crassiceps*. La DL<sub>50</sub> encontrada en estos ensayos corresponde a 30 mM, concentración que es muy alta con respecto a la cantidad que se presenta en la sangre del humano la cual corresponde a 300  $\mu\text{M}$ , lo que nos hace considerar como estos organismos resisten altas cantidades de este metabolito. Lo que sugiere tal vez que este sistema de las glioxalidas es muy efectivo o que existen otros mecanismos enzimáticos o no para desintoxicarse del MGO, así como de los productos que este genera. Esto lo hace interesante puesto que en comparación con los humanos en donde el MGO es un metabolito altamente reactivo y nocivo para la salud; el cual al alterarse en la sangre puede provocar diabetes mellitus y además se encuentra asociado con enfermedades crónicas degenerativas así como con la

formación de especies reactivas de oxígeno y AGES (Kurz A., et al., 2011), (Gutiérrez I., et al., 2003).

Al realizar los ensayos *in vitro* logramos observar una parálisis de la membrana a la concentración de 7,5 mM a los 30 min, a las concentraciones más altas y tiempos mayores se observa un daño en la membrana la cual se encuentra fisurada, sin embargo algunos escólex de cisticercos evaginan y pueden pasar al siguiente estadio de maduración. Este daño en la movilidad del cisticerco puede deberse a que en las células de la pared vesicular exista daño en la actina y miosina del citoesqueleto en el citosol o en las mitocondrias, siendo el primero el sistema encargado del movimiento de células o bien que estas han entrado en estado de apoptosis. Para conocer el mecanismo real de lo que está sucediendo se deben realizar experimentos para determinar daño en el citoesqueleto y en mitocondrias para conocer la vía de apoptosis en el parásito.

Por último podemos concluir que la información obtenida en este trabajo de caracterización del ADNc que codifica para la GLO-I de *Taenia solium*, permitirá en el futuro continuar con este proyecto para producir una GLO-I recombinante que nos llevara a conocer su estructura cristalina, mecanismo catalítico, regulación en la expresión de genes, su papel en la fisiología del parásito que puedan emplearse para el desarrollo de nuevas vacunas o fármacos que permitan erradicar o disminuir las complicaciones originadas por este parásito en sus hospederos.

## CAPITULO VIII

### CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvo una sonda de ADNc (350 pb) que codifica para una GLO-I.
- ❖ *Taenia solium* cuenta con un gen dentro de su genoma que codifica para la GLO-I.
- ❖ La clona aislada corresponde a una GLO-I mitocondrial.
- ❖ Su ADNc tiene un tamaño de 1014 pb y codifica para 294 aa.
- ❖ La DL<sub>50</sub> de MGO determinada en los ensayos *in vitro* con cisticercos de *Taenia crassiceps* fue de 30 mM.
- ❖ Ensayo *in vitro* con cisticercos de *Taenia crassiceps* incubados con MGO, muestran reducción en la movilidad y daño a la membrana.
- ❖ Este proyecto abre nuevos senderos para seguir estudiando el mecanismo, regulación, estructura, función y aplicaciones del sistema de las glioxalidas.

## **CAPITULO IX**

### **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, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y agar bacteriológico 0.7% (p/v).

Agar top SOBM: Triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 0.7% (p/v).

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

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

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

Medio SM: NaCl 0.58% (p/v), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (p/v), Tris-HCl 0.05% (p/v) pH 7.5

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

Solución 1 (lisis alcalina): EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0

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

Solución 3 (lisis alcalina): Acetato de amonio 7.5 M

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 2 M en 2% (v/v).

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

Solución alcalina desnaturizante: NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M

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

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

## ANEXO II

### Enzimas de restricción.

BamH1    5'- G GATCC-3'  
          3'- C C TAGG-5'

HindIII    5'- A A GCT T-3'  
          3'- T T CGA A-5'

## CAPITULO X

### BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abbas Abulk, "Inmunología celular y molecular", 4, Mc Graw Hill, España, 2002.
- 2) Álvarez RE, Torres GR (2004), "Neurocisticercosis: recomendaciones de tratamiento a propósito de tres casos", *Parasitology*, **21**: 382-386.
- 3) Baskaran S, Prasanna Rajan D, Balasubramania A (1989), "Formation of methylglyoxal by bacteria isolated from human faeces", *Journal of Medical Microbiology*, **28**: 211-215.
- 4) Birkenmeier G, Stegemann C, Hoffmann R, Gunther R, Huser K, Birkemeyer C (2010), "Posttranslational modification of human glyoxalase-I indicates redox-dependent regulation", *PLoS One*, **5**: 1-13.
- 5) Cárdenas G, Carrillo-Mezo R, Jung H, Sciutto E, Soto Hernández JL, Fleury A (2010), "Subarachnoidal neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drugs: a case series", *BMC Neurology*, **10**:1-5.
- 6) Castellanos A, Jiménez L, Landa A (2002), "Cloning, production and characterisation of superoxide dismutase from *Taenia solium* a recombinant Cu/Zn", *International Journal for Parasitology*, **32**: 1175–1182.
- 7) Chauhan SC, Madhubala R (2009), "Glyoxalase I gene deletion mutants of *Leishmania donovani* exhibit reduced methylglyoxal detoxification", *PLoS One*, **4**: 1-11.
- 8) Çimen K (2010), "Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally induced diabetes: effects of antioxidant treatment", *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, **4**: 240-256.
- 9) Creighton DJ, Hamilton DS (2001), "Brief history of glyoxalase I and what we have learned about metal ion-dependent, enzyme-catalyzed: isomerizations", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **387**: 1-10.

- 10) De Hemptinne V, Rondas D, Toepoel M, Vancompernelle K (2009), "Phosphorylation on Thr-106 and NO-modification of glyoxalase I suppress the TNF-induced transcriptional activity of NF- $\kappa$ B", *Molecular and Cellular Biochemistry*, **325**: 169-178.
- 11) Dongyi X, Xianwei L, Cong G, Jindong Z (2006), "Methylglyoxal detoxification by an aldo-keto reductase in the *Cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002*", *Journal of Microbiology*, **152**: 2013–2021.
- 12) Flisser A, Madrazo I, Delgado H (1997), "Cisticercosis humana", 2ª, El Manual Moderno, México.
- 13) Flisser A, Vargas PL, Laclette JP (2006), "*Taenia solium*: Un parásito cosmopolita", *Investigación y Ciencia*, **356**: 24-33.
- 14) Frickel E.M, Jemrh P (2001), "Yeast glyoxalase I is a monomeric enzyme with two active sites", *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 1845-1849.
- 15) García H, González A, Evans C, Gilman R (2003), "*Taenia solium* cisticercosis", *The Lancet*, **361**(8): 547-556.
- 16) Gutiérrez I (2003) "Fisiopatología del síndrome urémico", *Hospital General Dr. Manuel Gea González*, **6**: 13-24.
- 17) Iozefa R, Rahlfsa S, Changa T, Schirmerb H, Becker K (2003), "Glyoxalase I of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: evidence for subunit fusion", *FEBS Letters*, **554**: 284-288.
- 18) Ispolnov K, Gomes RA, Silva MS, Freire AP, (2008), Extracellular methylglyoxal toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*: role of glucose and phosphate ions, *Journal of Applied Microbiology*, **104**: 1092–1102.
- 19) Jaime Gallegos Berenguer (2003), "Manual de parasitología (morfología y biología de los parásitos de interés sanitario)", 2ª, Ed. EB, Barcelona.
- 20) Jomova K, Valko M (2011) "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease", *Toxicology*, **34**: 1-9.

- 21) Kizil G, Wilks K (2000), "Detection and characterization of the genes encoding glyoxalase I, and II from *Neisseria meningitidis*", *Journal of Medical Microbiology*, **49**: 669-673.
- 22) Koneman EW, Allen S, Woods GL (2006), "Koneman Diagnóstico microbiológico", 6ª, Panamericana, Buenos Aires.
- 23) Kurz A, Rabbani N, Walter M, Bonin, Thornalley P, Auburger G, Gispert S (2011) "Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress", *Celular and Molecular Life Science*, **68**: 721–733.
- 24) Lan Y, Lu T, Lauett PS, Creighton DJ (1995), "Evidence for a (triosephosphate isomerase like) "catalytic loop" near the active site of glyoxalase I, *The Journal of Biological Chemistry*, **270**: 12957-12960.
- 25) Larralde C, Aluja A (2007) "Cisticercosis guía para profesionales de la salud" 1ª Ed. Biblioteca de la salud. Fondo de Cultura Económica, México.
- 26) Mathews CK, "Bioquímica", Prentice Hall, 3ª, Madrid, 2002.
- 27) Mayta H, Gilman RH, Prendergast E, Castillo JP, Tinoco YO, Garcia HH, Gonzalez AE, Sterling C (2008), "Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis", *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 286-289.
- 28) Miller A, Tan G, Binger K. J, Pickering R. J, Thomas M.C, Nagaraj R. H, Cooper E, Wilkinson-Berka\_J (2011) "Candesartan attenuates diabetic retinal vascular pathology by restoring glyoxalase-I function", *Diabetes*, **59**: 3208-3215.
- 29) Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltrán C, Villalobos A, Aluja A, Rodarte L, Sciutto E, Larralde C (2002), "Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis", *Veterinary Parasitology* **108**: 41-48.
- 30) Palomares F, Palencia G, Ambrosio J.R, Ortiz A, Jung-Cook H (2006), "Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cysts: in vitro studies", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**: 482–488.

- 31) Robles Clemente (1997), "Tratamiento de la neurocisticercosis", 2ª, Facultad de Medicina, UNAM.
- 32) Sáenz B, Fragoso G, Sciutto E, Fleury A (2008), "Human and porcine neurocysticercosis: differences in the distribution and developmental stages of cysticerci" *Tropical Medicine & International Health*, **13**: 697-702.
- 33) Sarti E (1997), "La teniasis y cisticercos por *Taenia solium*", *Salud Pública de México*, **39**: 67-82.
- 34) Sellin S, Mannerv B (1984) "Metal dissociation constants for glyoxalase I reconstituted with Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>", *The Journal of Biological Chemistry*, **259**: 11426-11429.
- 35) Sellin S y Mannervik B (1983) "Reversal of the reaction catalyzed by glyoxalase I", *The Journal of Biological Chemistry*, **258**: 8872-8875.
- 36) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema único de información (2007), "Aspectos relevantes del Binomio Teniasis/Cisticercosis" *Vigilancia Epidemiológica* **24**: 1-5.
- 37) Sommer A, Fischer P, Krause K, Boettcher K, Brophy P, Walter R.D, Liebau E (2001), "A stress-responsive glyoxalase I from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*", *Biochemical Journal*, **353**: 445-452.
- 38) Sorvillo F, Wilkins P, Shafir S y Eberhard M (2010), "Public health implications of cysticercosis acquired in the United States", *Emerging Infectious Diseases*, **17**: 1-5.
- 39) Sukdeo N, Clugston S, Daub E (2004), "Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes", *Biochemical Journal*, **384**: 111–117.
- 40) Tatsunami R, Oba T, Takahashi K, y Tampo Y (2009) "Methylglyoxal causes dysfunction of thioredoxin and thioredoxin reductase in endothelial cells", *Journal of Pharmacology Science*, **111**: 426 – 432.
- 41) Tay-Zavala J, "Microbiología y Parasitología Médicas", 3ª, Méndez Editores, México, 2003.

- 42) Guzmán Ruiz Esteban Omar (2010), "Caracterización del ADN complementario que codifica para una tiorredoxina (TRX) citósolica de *Taenia solium*", Tesis de licenciatura de la carrera de Química Farmacéutico Biológica Facultad de Química UNAM.
- 43) Rodríguez Lima Oscar (2009), "Caracterización del ADN complementario que codifica para una proteína de Unión a caja TATA (PUT) en los genes de *Taenia solium*", Tesis de licenciatura de la carrera de Química Farmacéutico Biológica Facultad de Química UNAM.
- 44) Torres Rivera Anayetzin (2004), "Aislamiento y caracterización del ADNc que codifica para la isoforma de la Glutación S-transferasa de 26.5 kDa de *Taenia solium*", Tesis de licenciatura de la carrera de Química Farmacéutico Biológica Facultad de Química UNAM.
- 45) Thornalley Paul J (1990), "The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life", *Biochemical Journal*, **269**: 1-11.
- 46) Thornalley P.J (2003), "Glyoxalase I-Structure, function and critical role", *Biochemical Society Transactions*, **31**: 1343-1348.
- 47) Thornalley P.J, Langborg A (1999), "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose", *Biochemical Journal*, **344**: 109-116.
- 48) Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH (2004), "A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**: 13186-1319.
- 49) Villalobos Perozo R (2003), "Clinical manifestations in the presentation of neurocysticercosis", *Kasmera*, **31**(2): 80-85.
- 50) Wang W, Ballatori N (1998), "Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions", *Pharmacological Reviews*, **50**: 1-21.
- 51) Wautier JL, Schmid AM (2004), "Protein glycation endothelial cell dysfunction", *Circulation Research*, **95**: 233-238.

- 52) Yomano LP, York SW, Shanmugam KT, Ingram LO (2009) "Deletion of methylglyoxal synthase gene (mgsA) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*", *Biotechnology Letters*, **31**: 1389–1398.

## REFERENCIAS

### Electrónicas

- 1) Gen Bank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, 17-Dic-11 12:00 am
- 2) Organización Mundial de la Salud:  
<http://www.who.int/whosis/en/index.html>, 11-Nov-10, 10:30 pm
- 3) Protein Data Bank:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=VOK>, 6-Dic-11 13:00 pm.
- 4) SSA Mexico: [www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem43/pdf/edit4107](http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem43/pdf/edit4107), 7-Nov-10, 14:00 pm.