



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Clonación y caracterización del ADN complementario (ADNc) que
codifica para una Fosfolípido Hidroperóxido Glutación Peroxidasa de
Taenia solium (TsPHGPX)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARÍA MAGDALENA ARROYO MOLINA

Director de tesis Dr. **ABRAHAM LANDA PIEDRA**



México. 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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el contrato 80134 que corresponde al proyecto “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. Proyecto “Utilización de enzimas glicolíticas el control de cisticercosis”.

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.

Albert Einstein.

A mi Mamá Lupe, mi Papá Manuel y Juan Carlos...

Agradecimientos

A mi señora mamá y mi señor papá, ustedes son el motivo de esto, mil gracias por su amor, consejos, cuidados, por quererme tal y como soy. Los amo.

A Juan Carlos cómplice de mis travesuras, gracias por apoyarme y empezar una vida que estará llena de mil motivos para seguir juntos. No pretendo rendirme de nuevo eso ya lo aprendí y se que tú estarás ahí.

A mis nanos Jaciel, Daniel y David, por aguantar a su mamá con sus traumas, espero que algún día lo entiendan.

Amis nanos hermanos Sonia, Jacob, Eva, Leo, Benjamín y Verónica, no hay imposibles, gracias por entender a su hermana que tanto los quiere.

Al Dr. Abraham Landa, por contagiarme de nuevo de esas ganas de ser diferente y el amor a la ciencia. Por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo, su gran paciencia y por ser no solo un Director de tesis, sino un amigo...

A todo el laboratorio de Biología Molecular, conformado por la M en C. Alicia Ochoa por enseñarme y estar conmigo en las buenas y muy malas gracias...por entenderme y no juzgarme. A el Dr. (QFB para mí) Richie por su infinita paciencia y apoyo en todo momento, a los M en C Aramis, Oscar y Vera por sus consejos pero sobre todo por su amistad. Al Dr. Víctor y Odín por su tan peculiar forma de ser. Gracias a todos por hacerme mi estancia más agradable y muy divertida.

A mis amigos que incondicionalmente estuvieron para no dejarme caer y motivarme a seguir adelante.

Pero sobre todo a Dios a pesar de mis dudas, al final comprendí que en el puedo confiar.

ÍNDICE	
Abreviaturas	1
Resumen	2
I. Introducción	3
1.1. Generalidades del parásito	6
1.1.1. Ciclo biológico	11
1.1.2. Epidemiología	13
1.1.3. Cuadro clínico	14
1.1.4. Diagnóstico	15
1.1.5. Tratamiento	16
1.2. Estrés oxidativo	17
1.2.1 Sistema antioxidante	19
1.2.2 Sistema antioxidante no enzimático	20
1.2.3 Sistema antioxidante enzimático	20
1.3. Generalidades de la Glutación peroxidasa (GPX)	21
II. Planteamiento del problema	25
III. Hipótesis	26
IV. Objetivos	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos particulares	27
V. Diseño de investigación	28
VI. Material y Métodos	29
6.1. Materiales	29
6.1.1. Material biológico	29
6.1.2. Reactivos	29
6.2. Métodos	30
6.2.1. Obtención de la sonda	30
6.2.2. Marcaje radioactivo	30
6.2.3. Tamizaje para el aislamiento de clonas	31
6.2.4. Purificación de ADN a partir de fagos	32

6.2.5. Digestión con endonucleasas	33
6.2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
6.2.7. Ligación y transformación bacteriana	34
6.2.8. Preparación alcalina de ADN plasmídico	34
6.2.9. Secuenciación y su análisis	35
6.2.10. Ensayo de cultivo de cisticercos <i>T. crassiceps</i> con Hidróxido de cumeno	36
6.2.11. Determinación de la viabilidad	36
VII. Resultados	38
VIII. Discusión de resultados	46
IX. Conclusiones	50
X. Anexo	51
XI. Referencias	53

ABREVIATURAS

2X:	<i>Dos veces la concentración</i>
5X:	<i>Cinco veces la concentración</i>
10X:	<i>Diez veces la concentración</i>
$\alpha^{32}P$:	<i>Fósforo 32 alfa</i>
ADN:	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
ADNc:	<i>Ácido desoxirribonucleico complementario</i>
ARN:	<i>Ácido ribonucleico</i>
°C:	<i>Grados centígrados</i>
c.b.p:	<i>Cuanto baste para</i>
cm.	<i>Centímetros</i>
ddATP:	<i>Trifosfato de dideoxiadenosina</i>
ddCTP:	<i>Trifosfato de dideoxicitosina</i>
ddGTP:	<i>Trifosfato de dideoxiguanina</i>
ddTTP:	<i>Trifosfato de dideoxitimina</i>
ddNTPs:	<i>Trifosfato de dideoxinucleótidos</i>
dNTP's:	<i>Trifosfato de desoxirribonucleótidos</i>
GS:	<i>Glutación sintetasa</i>
GSH:	<i>Glutación reducido</i>
GSSG:	<i>Glutación oxidado</i>
GPX:	<i>Glutación peroxidasa</i>
EDTA:	<i>Etilendiaminotetracetato</i>
EIT:	<i>enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay</i>
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
IRM:	<i>Imagen de resonancia magnetica</i>
Kb:	<i>kilobases</i>
KDa:	<i>kilodaltones</i>
LCR:	<i>Líquido ceforraquídeo</i>
NC:	<i>Neurocisticercosis</i>
OMS	<i>Organización Mundial de Salud</i>
ORF:	<i>Marco de lectura abierto</i>
Pb:	<i>Pares de bases</i>
PCR:	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
PEG:	<i>Polietilenglicol</i>
PHGPX:	<i>Fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa</i>
rpm:	<i>Revoluciones por minuto</i>
ERO's:	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
RT-PCR:	<i>Reacción de la cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa</i>
SDS:	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
SNC:	<i>Sistema nervioso central</i>
TC:	<i>Tomografía computarizada</i>
<i>T.solium</i> :	<i>Taenia solium</i>
<i>T crapssiceps.</i> :	<i>Taenia crapssiceps</i>
ER:	<i>Explosión respiratoria</i>
SOD:	<i>Superóxido dismutasa</i>
pH:	<i>Potencial de hidrógeno</i>
NADPH:	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado en su forma reducida</i>

RESUMEN

La taeniosis y la cisticercosis causadas por *Taenia solium* representan un problema económico y de salud tanto en México como en otros países en vías de desarrollo. Por un lado, sus cisticercos en el sistema nervioso central (SNC) del hombre originan trastornos neurológicos que pueden llegar a matar al paciente. Por otro lado, pueden vivir décadas en sus hospederos sin ocasionarles síntomas. Adicionalmente, se ha observado que *Taenia solium* es cada vez más resistente a los tratamientos anticestocidas. Una posible explicación de la capacidad del parásito para sobrevivir a una gran variedad de especies reactivas producidas por sus procesos metabólicos, así como por los mecanismos inmunes de sus huéspedes, es debido a la cantidad de enzimas desintoxicantes que posee. Una de estas enzimas es la fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa (PHGPx), la cual cataliza la reducción de lipopéroxido (L-OOH), así como la del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) inhibiendo la peroxidación lipídica, por lo cual es clave para el mantenimiento de la estructura y función de las membranas biológicas del parásito.

En este trabajo se logró aislar y caracterizar el ADNc de un gen que codifica para la PHGPx de *Taenia solium*. La secuencia muestra un marco de lectura abierto (ORF) de 863 pb, lo que produjo una proteína de 165 aminoácidos con un peso molecular predictivo de 18,670 Da y un punto isoeléctrico (pI) predictivo de 8.48. Se identificaron los sitios clásicos de inicio y término, así como el sitio de poliadenilación, un codón de término (TAG) característico de las GPx's el cual codifica para una seleniocisteína, así como los aminoácidos característicos de el sitio catalítico. Al comparar la secuencia primaria presentó una identidad de 59% con la PHGPx de *Clonorchis sinensis* isoforma 1, 59% con PHGPx de *Clonorchis sinensis* isoforma 3, 56% con la HPGPX de *Schistosoma mansoni*, y 55% con la HGPx de *Hydra vulgaris*. Asimismo, se observó que la secuencia obtenida presenta una identidad de 55% con la HPGPX de *Homo sapiens* (humano) isoforma C y con la HPGPX de *Sus Scrofa* (hospedero intermediario). Se observó el efecto producido por hidróxido de cumeno en cisticercos de *T. crassiceps*, el cual afectó la viabilidad y el desarrollo del parásito, mostrando que la dosis letal media (DL₅₀) de este es de 2.0 Mm.

I. INTRODUCCIÓN

La taeniosis y la cisticercosis causadas por *Taenia solium* son enfermedades con considerables efectos en salud pública y en economía, en lugares del mundo, como América Latina, Asia y África. Se ha señalado que las condiciones en las que se realiza la transmisión se favorecen por la exposición a ciertos factores de riesgo, como la convivencia con un portador de *Taenia solium*, el bajo nivel económico de los individuos o comunidades, la inadecuada higiene personal, la falta de letrinas, la carencia de drenaje, la ausencia de agua potable y de pavimento, y la coprofagia en cerdos¹⁻². Se cree que actualmente existen alrededor de 50 millones de personas infectadas con *T. solium* y que aproximadamente 50,000 personas mueren anualmente a causa de la cisticercosis³. Así mismo existen reportes que indican un aumento de casos en países desarrollados con un alto índice de migración de individuos de zonas endémicas⁴⁻⁵.

La cisticercosis es la enfermedad parasitaria más frecuente del Sistema Nervioso Central (SNC); afecta del 2 al 4% de la población general en áreas endémicas⁶. La Neurocisticercosis (NC) es la forma más grave de la cisticercosis y es la primera causa de epilepsia tardía en zonas endémicas⁷⁻⁸⁻⁹. En los servicios especializados de neurología, la NC es la quinta causa más frecuente de consulta (4.3%)¹⁰⁻¹¹, es motivo del 25% de las craneotomías, y se la encuentra en el 2% de las autopsias del Hospital General de México¹² y del Centro Médico Siglo XXI¹³. Por otro lado, se ha sugerido que la principal consecuencia de la taeniosis en la salud es la desnutrición, aunque aún no se ha demostrado en forma concluyente como con otras parasitosis.¹⁻² La cisticercosis ha sido estudiada en el hombre, en el cerdo y en varios modelos, como se ha hecho con la *Taenia crassiceps* en ratones¹⁴. Se conoce que las infecciones por cestodos pueden ser eliminadas por mecanismos inmunes y con fármacos.

Para explicar la manera en que *T. solium* evita la respuesta inmune, se ha postulado el empleo por el parásito de diversos mecanismos de evasión inmune¹⁵. Los metacéstodos presentan alrededor de ellos una reacción inflamatoria abundante y sobreviven durante largos periodos en su hospedero,

debido a que los parásitos pueden regular la respuesta inmune por medio de mecanismos de evasión, entre los que podemos mencionar: la liberación de factores líticos para diferentes estirpes celulares (eosinófilos, macrófagos); inactivación del complemento; disminución de linfocitos T vía apoptosis, factores inhibitorios de inflamación, y la presencia de un receptor para el fragmento Fc de anticuerpos. Particularmente, los encargados de bloquear el daño oxidativo o estrés oxidativo son de los más recientemente considerados^{16,17,18,19,20,21,22,23}.

Una consecuencia por activar a las células inflamatorias con antígenos es que desarrollen la “explosión respiratoria” (ER). La ER de las células inflamatorias, como un proceso inflamatorio, consiste en un consumo elevado de oxígeno por parte de la célula y que utiliza para producir estrés oxidativo por medio de especies reactivas de oxígeno (ERO's)²⁴. La excesiva producción de ERO's origina un daño a todo tipo de moléculas biológicas, Así el estrés oxidativo podría estar involucrado en diversos procesos como mutagénesis, carcinogénesis, daño a membranas, peroxidación lipídica, oxidación y fragmentación tanto a proteínas como a carbohidratos²⁵. Una forma de bloquear o evitar la acción de las ERO's, es por la acción de las enzimas antioxidantes presentes en diversos parásitos²⁶.

Las enzimas juegan un papel muy importante en la fisiología y establecimiento de los parásitos en sus hospederos, e inclusive la falta de alguna de ellas puede ser letal. Se ha demostrado que las enzimas desintoxicantes del metabolismo oxidativo son capaces de inactivar a las ERO's producidas por la respuesta inmune, por lo que se ha sugerido como un mecanismo de evasión.

Taenia solium posee varias enzimas antioxidantes capaces de inactivar ERO's y varios xenobióticos. Estas enzimas se encuentran en el tegumento del parásito en gran abundancia y pueden ser blancos del sistema inmune o para fármacos. Cabe mencionar que las enzimas que participan en la producción de energía (Glucólisis) y en los procesos de desintoxicación de ERO's son importantes para la sobrevivencia del parásito e inclusive algunas esenciales para esta función, tal es el caso de la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la conversión enzimática del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y agua.

En este parásito existen también dos glutatión transferasas (GSTs), ambas conjugan glutatión a una gran variedad de ERO's, fármacos y xenobióticos, inactivándolos. Las peroxiredoxinas de tipo 2-Cys de este parásito están involucradas en procesos de desintoxicación y regulación redox. Esta enzima es tan abundante alrededor de 3% e inducible como las GSTs. Esta enzima inactiva hidroperóxidos lipídicos y H_2O_2 ²⁷.

La Fosfolípido Hidroperóxido Glutatión Peroxidasa (PHGPx) es una de las enzimas que inhibe la peroxidación producida por el H_2O_2 . La peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce muerte celular. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno. La PHGPx, protege la membrana celular de lipohidroperóxidos^{28,29}. La pérdida de la actividad de la PHGPx permitiría un incremento en las ERO's, con el subsecuente daño a proteínas esenciales en toda la célula y a ácidos grasos insaturados de las membranas^{30,31}.

La meta de este proyecto es clonar y caracterizar el gen que codifica para la enzima Fosfolípido Hidroperóxido Glutatión Peroxidasa (PHGPx) del metabolismo de *T. solium*. Así como, estudiar el papel que juega la enzima en los estadios del parásito bajo ciertas condiciones, y su papel en el metabolismo desintoxicante. Hasta el momento en este parásito no se había descrito una enzima para desintoxicar a los fosfolípidos. Lo que permitiría en el futuro utilizarla como blanco para desarrollar vacunas o fármacos contra el parásito.

1.1. Generalidades del parásito

Clasificación taxonómica:

Reino:	<i>Metazoa</i>
Subreino:	<i>Eumetazoa</i>
Rama:	<i>Bilateria</i>
Grado:	<i>Acoelomata</i>
Phylum:	<i>Platyhelminthes</i>
Clase:	<i>Cestoda</i>
Subclase:	<i>Eucestoda</i>
Orden:	<i>Cyclophyllidea</i>
Familia:	<i>Taeniidae</i>
Género:	<i>Taenia</i>
Especie:	<i>Taenia solium</i> .

El parásito adulto (Fig.1) es un gusano plano que habita de manera natural solo en los seres humanos y mide entre 2 y 7 metros de largo³². El parásito se divide en 3 regiones. El escólex también denominada cabeza es un órgano de fijación del parásito, debido a que presenta cuatro ventosas y un rostelo armado con una doble corona de 22 a 32 ganchos, con un tamaño de 110 a 180 micras de largo (Fig. 2). El cuello es corto, de aproximadamente la mitad del grosor del escólex, en el cuello se encuentran células pluripotenciales también conocidas como células “madre” que son las responsables de la formación de nuevos proglótidos³³. El estróbilo es un conjunto de proglótidos unidos entre sí en forma de cadena o de cinta (Fig.3) y puede alcanzar varios metros de largo³⁴. Los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, sin órganos sexuales desarrollados; van mostrando un grado creciente de desarrollo y diferenciación a medida que se alejan del escólex, hasta aparecer segmentos maduros en la parte media del estróbilo, cada proglótido maduro posee órganos genitales masculinos y femeninos que lo convierten en una unidad de reproducción. Los proglótidos más alejados del escólex muestran un útero grávido ramificado, lleno de huevos aproximadamente 50.000 en cada uno. Cada proglótido mide entre 0.5 y 2 cm; los grávidos son liberados espontáneamente por la *Taenia* en las heces.



Figura 1. Parásito adulto de *T. solium*. Fotografías tomadas de Parasite Imagen Library. www.dpd.cdc.gov.

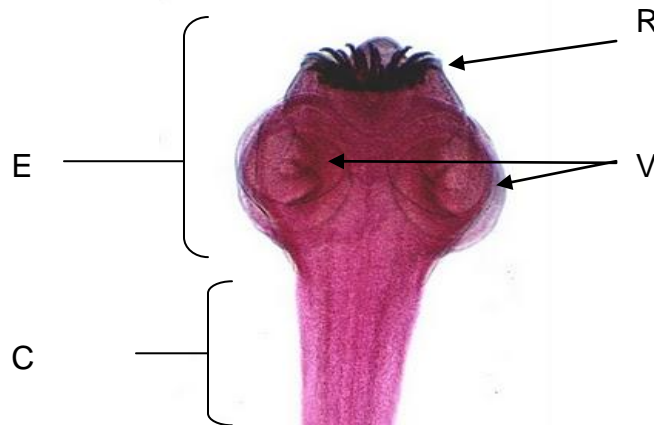


Figura 2. Escólex (E) del parásito adulto, en la cual se observa el rostelo de doble corona de ganchos (R), par de las 4 ventosas que posee (v), que le permiten anclarse en la pared intestinal del hospedero. (C) Cuello donde se encuentran células pluripotenciales que son las responsables de la formación de nuevos proglótidos. (by P.W Pappasand S.M. Wardropo.) tenicis.zip.net/images/Tenia_solium_scolex.jpg.

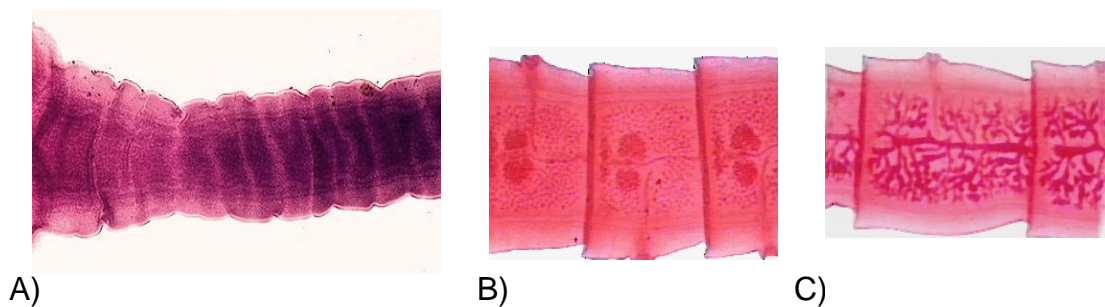
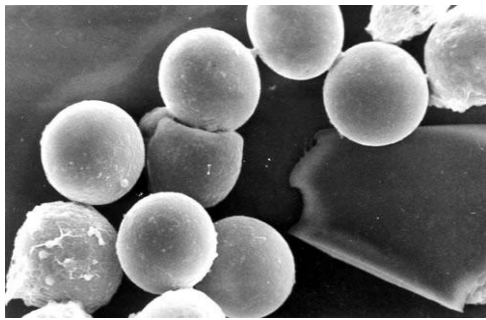
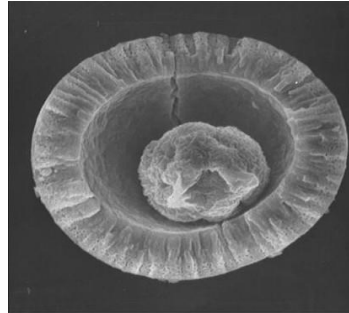


Figura 3. Estructura de proglótidos A) inmaduros, B) maduros y C) grávidos (by P.W Pappasand S.M. Wardropo.) tenicis.zip.net/images/Tenia_solium_scolex.jpg.

Los huevos son estructuras esféricas que miden de 30 a 45 μm de diámetro que están rodeados de una delgada membrana hialina³⁵ denominada vitelo o cápsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio. La siguiente envoltura es el embrióforo, formado por pequeños bloques proteicos unidos entre sí por un material cementante. Esta envoltura, además de ser la más importante en la protección de la oncósfera, confiere a los huevos su apariencia estriada característica³⁶. A su vez, el embrióforo es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embrióforal. Finalmente, la membrana oncósfera rodea directamente al embrión hexacanto llamado así por poseer tres pares de ganchos³⁷ (Fig.4). Generalmente su coloración es blanquecina o ligeramente amarillenta aunque varía de acuerdo con los pigmentos que absorben en el intestino del hospedero³⁸. La primera expulsión de huevos de *T. solium* generalmente ocurre de dos a tres meses después de la infección³⁴.



A)



B)

Figura 4. Huevos de *Taenia solium*. **A)** Micrografía electrónica de barrido. Se observa la forma característica de los huevos. **B)** Micrografía electrónica de barrido. Huevo en corte transversal donde se observa el embrióforo estriado que protege a la oncósfera © Dr. Juan Pedro Laclette y Dra. Kaethe Willms, Facultad de Medicina, UNAM. (Fotografías tomadas de Aguilar-Díaz et al., 2006.)

El cisticerco o larva (Fig.5) es una vesícula blanquecina esférica llena de fluido acuoso que es contenido por la pared vesicular, tiene un tamaño de 0.5-1.5 cm y contienen en su interior a la larva con su escólex invaginado, enrollada en forma de espiral. El cisticerco comienza su etapa de activación al entrar en contacto con el ácido gástrico y las secreciones biliares del hospedero. La evaginación o salida del escólex comienza con el ensanchamiento de la apertura de la membrana vesicular y concluye cuando el escólex y el cuello emergen de la vesícula interior del cisticerco y quedan expuestos al medio intestinal³⁹.



Figura 5 Cisticercos de *Taenia solium*. Se observa la pared vesicular que contiene al líquido vesicular y al escólex. © Dr. Jorge Tay Zavala, Facultad de Medicina, UNAM. © Dra. Irene de Haro Arteaga, Facultad de Medicina, UNAM.

Los cestodos carecen de sistema digestivo y en su lugar, poseen una superficie externa o tegumento (Fig.6) de gran importancia fisiológica, con gran actividad metabólica, por la que a través de ella absorbe y excreta selectivamente por difusión o transporte activo las sustancias que requieren para su desecho, defensa o nutrición. El elemento más externo del tegumento es el glicocálix, una cubierta protectora que inactiva algunas enzimas del hospedero y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos. La glucosa es el nutriente más importante, ya que esta es la fuente de energía primaria de los cestodos. También los aminoácidos y purinas, pirimidinas y nucleósidos son absorbidos por esta superficie, y utilizados para sintetizar sus propias vitaminas y ácidos nucleicos³³. La estructura tegumental que recorre el cuerpo del parásito está cubierta por una membrana con microvellosidades llamadas microtricas que aumentan el área de absorción del parásito. Debajo de las microtricas se encuentra el citoplasma distal conformado por varias células subtegumentales que contienen gran cantidad de vesículas, cuerpos de alta densidad electrónica y numerosas mitocondrias, este citoplasma continuo, es un sincicio que se conecta a otras estructuras a través del proceso internuncial, el cual corre a través de la pared muscular³³.

El parénquima, es delimitado por una membrana basal (colágena tipo IV) que tiene la función de sostén. Este también es considerado como centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno, es un tejido en el que se encuentran los sistemas de excreción, sistema nervioso, así como los paquetes de fibras musculares³³.

El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios del escólex, unidos mediante comisuras transversales. De estos ganglios salen cuatro cordones nerviosos amielínicos, dos anteriores que inervan el escólex y dos posteriores que corren a lo largo del estróbilo, enervándolo totalmente y conectándose por medio de comisuras transversales interproglotídeas. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones laterales. Algunos de los neuropéptidos de importancia en la transmisión de estímulos son la serotonina y la acetilcolina³³.

Su sistema excretor es rudimentario y es referido como sistema protonefridal, está constituido por las células en flama que alimenta los canales principales de excreción, estos canales se encuentran en posición ventrolateral y dorsolateral a lo largo del estróbilo que desemboca en una vejiga con un poro que da hacia el exterior. Los ductos de excreción están alineados con las microvellosidades lo que sugiere que tiene una función de transporte no sólo de desechos sino también de fluidos con iones que permiten la osmorregulación. *T. solium* produce unas concreciones minerales denominadas corpúsculos calcáreos que se forman en el lumen de los ductos protonefridiales y no intracelularmente como se ha descrito para otros céstodos⁴⁰. Debido a su localización, es probable que dichos corpúsculos participen en procesos de desintoxicación.

Los órganos reproductivos femeninos y masculinos están presentes en cada segmento o proglótido, por lo cual son hermafroditas. El ovario libera los óvulos hacia el oviducto, donde se lleva a cabo la fertilización dentro del mismo proglótido o podría ser entre diferentes segmentos cuando el parásito se encuentra doblado sobre sí mismo, o bien entre proglótidos de diferentes gusanos cuando hay dos o más de ellos en el mismo hospedero⁴¹.

Los cisticercos utilizan tanto rutas metabólicas aeróbicas como anaeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio y obtienen sus nutrientes. A diferencia de los parásitos nemátodos que poseen láminas o cutículas fibrosas, la superficie del cisticerco en contacto con el hospedero es la membrana plasmática tegumental, que, como tal, debiera ser susceptible al daño por los diversos mecanismos defensivos del hospedero, como son el

complemento, las células efectoras, los compuestos tóxicos, etc. Sin embargo, a pesar de que el hospedero desarrolla una respuesta inmunológica específica, la superficie del parásito no sufre daño aparente, al menos durante ciertos períodos.

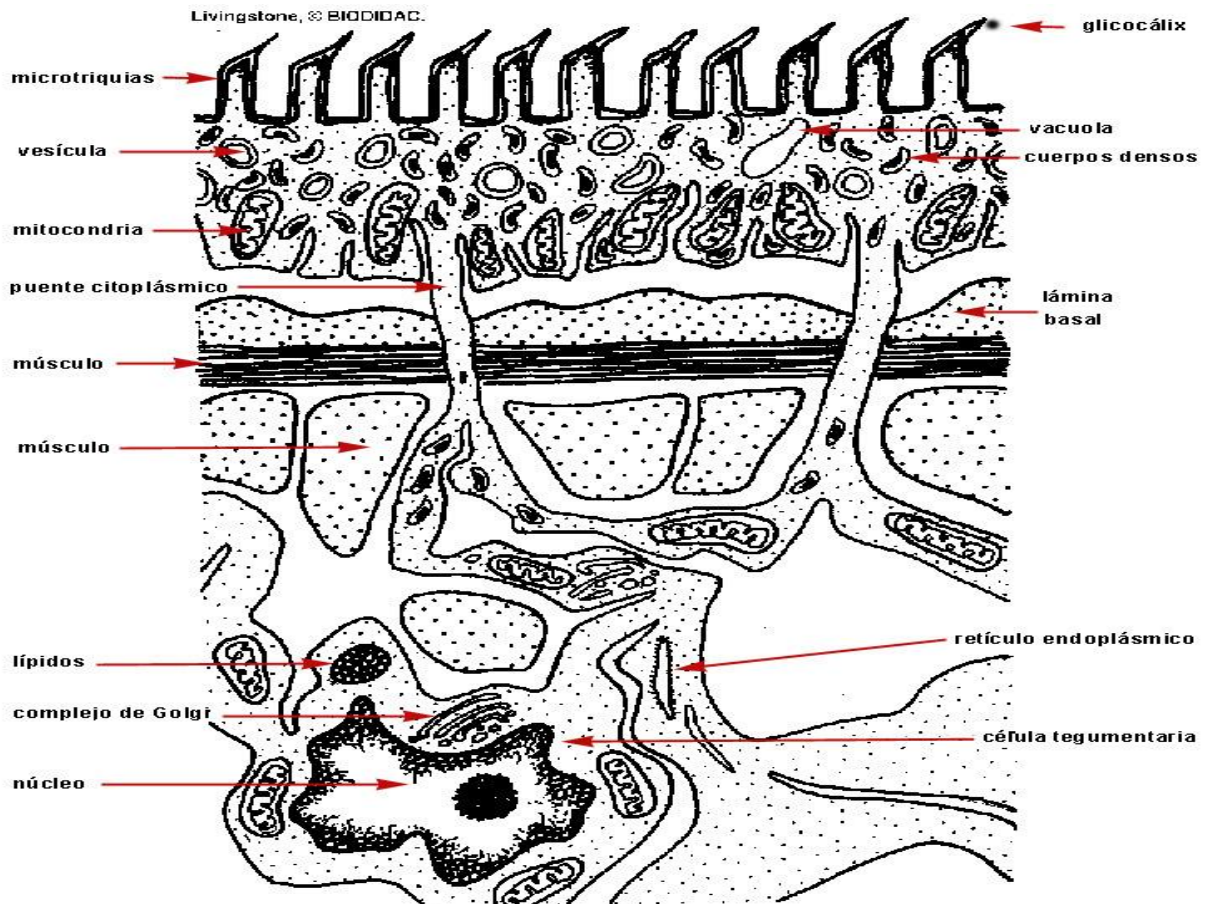


Figura 6. Esquema de la pared vesicular de un cestodo (adaptado de BIODIDAC, University of Ottawa)

1.1.1. Ciclo Biológico

Taenia solium tiene tres estadios: el adulto, el huevo y la larva. El ciclo de vida empieza cuando el humano (hospedero definitivo) infectado con el gusano adulto libera huevos del parásito en las heces. Al ser ingerido por el cerdo (hospedero intermediario), los huevos son atacados por los jugos gástricos y enzimas proteolíticas en el estómago, proceso mediante el cual se digiere el embrión y se libera la oncosfera. Al llegar al intestino delgado estas son bañadas por las secreciones biliares, las cuales originan su activación y

penetración del epitelio intestinal, por medio de la secreción de enzimas proteolíticas del parásito. De esta forma alcanzan los capilares sanguíneos y linfáticos, y se distribuyen a todo el organismo, como el músculo estriado, órganos como el hígado, corazón, pulmones, así como el cerebro. Una vez que se establecen las oncósferas en el tejido comienzan a desarrollarse hasta convertirse en el cisticerco, esto tarda al menos 10 semanas. De igual forma, cuando el ser humano ingiere los huevos del parásito mediante contaminación fecal-oral del portador del gusano adulto o por el consumo de alimentos contaminados con huevos del parásito, las oncósferas se van a distribuir por sus tejidos de la misma manera que lo hacen en el cerdo. El ciclo de vida se completa entonces cuando los seres humanos ingieren cerdo contaminado con cisticercos⁴². Al llegar por vía oral, el cisticerco evagina por la acción enzimática y biliar, y mediante su escólex y ventosas se ancla en el intestino delgado para continuar su desarrollo hasta alcanzar la forma adulta o de solitaria en un tiempo de cuatro meses (figura 7).

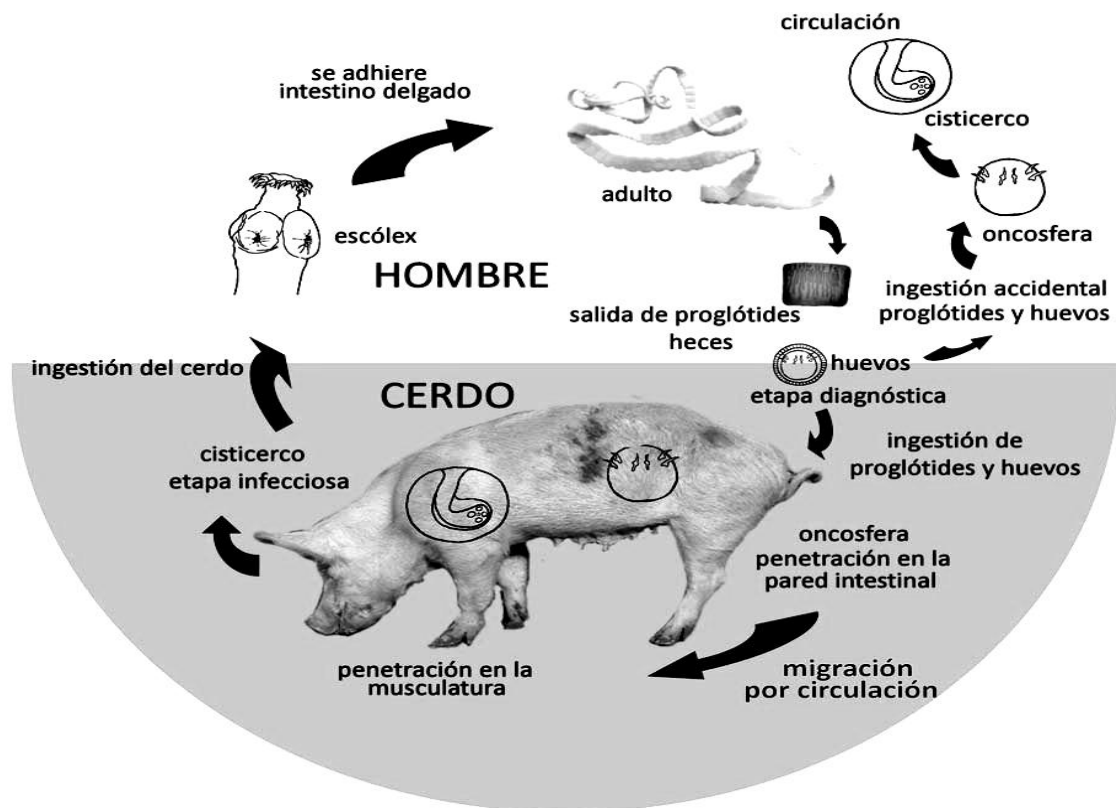


Figura 7 ciclo biológico de *T. solium*. www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-plate...

1.1.2. Epidemiología

La distribución del cisticerco de *T. solium* es mundial y coincide con la distribución de la infección por la tenia adulta⁴². La taeniosis/cisticercosis es altamente endémica en Latinoamérica, China, India, sureste de Asia y África no musulmana⁴³. Aproximadamente 15- 50 millones de personas corren el riesgo de infección⁴⁴. Las malas condiciones de higiene y de vida permiten que los cerdos accedan a las heces humanas, poniendo a las personas en riesgo de desarrollar taeniosis y eventualmente cisticercosis.

En México y algunos otros países, los estudios y estadísticas del porcentaje de población humana y porcina afectada no son reales ya que no existe el seguimiento bien documentado de la incidencia y prevalencia de éste parásito, así que solo existen estimados provenientes de fuentes diversas como son las investigaciones científicas y las estadísticas oficiales derivadas de estudios hospitalarios y necropsias⁴⁵.

La obtención de información epidemiológica sobre la cisticercosis se dificulta por diversos factores tales como la pobreza o nula vigilancia epidemiológica, alto número de infecciones asintomáticas, pleomorfismo de las manifestaciones clínicas, carencia de pruebas serológicas con límite de detección de un solo cisticerco y necesidad de estudios de neuroimagen de alto costo en el diagnóstico⁴⁶. Estos factores repercuten en la ausencia de cifras epidemiológicas reales, lo cual ha originado la falsa percepción de que la cisticercosis es un padecimiento de poca importancia. Por ejemplo, estudios epidemiológicos han demostrado que la cisticercosis humana en México tiene una presencia alta que abarca desde 4-12% de seropositividad en zonas endémicas. A nivel mundial las cifras también reflejan una alta seroprevalencia en zonas endémicas. Por ejemplo en Perú éstas alcanzan el 21%, mientras que en Bolivia, Guatemala y Ecuador llegan a 10, 17, 22% respectivamente⁴⁷. Así mismo en los continentes Asiático y Africano se han registrado valores seropositivos tan altos como 50% en Irian Jaya, Indonesia; 16% en Sichuan, China y de hasta el 1% de la población total de Camerún^{48, 49,50}. Un estudio epidemiológico demostró que los familiares de los pacientes con NC tuvieron un riesgo tres veces mayor de

positividad serológica para cisticercosis, en comparación con la población general⁵¹.

En México las cifras oficiales muestran un promedio anual de de 500 casos de cisticercosis con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100 000 habitantes⁵². Desde el año de 1990 hasta el año 2005, la disminución de la incidencia de taeniosis ha sido considerable, ya que en 1990 se tenía un reporte nacional de 14,013 casos de taeniosis y 586 casos de cisticercosis, y en 2005 fue de 393 casos de taeniosis y 306 de cisticercosis⁵³. En el año 2000 se informó de 637 casos de NC; de ellos, tan sólo en el estado de Jalisco fueron notificados 136 (12.29%) y en Guerrero nueve⁵⁴. Asimismo, otros estudios demostraron que las personas que tenían un historial de eliminación de proglótidos con presencia de huevos de *T. solium* en sus heces, convivían en las mismas casas con individuos que presentaban anticuerpos contra cisticercosis o sintomatología compatible con NC. Además, se encontró que el 50% de las personas seropositivas vivían cerca de las casas de portadores del parásito adulto⁴⁷. Por esta razón, se considera al portador de la *Tenia* como el mayor factor de riesgo para adquirir la NC humana y la cisticercosis porcina^{55, 56}. La migración de personas de lugares endémicos a países desarrollados, ha traído como consecuencia, un incremento de los casos de NC en estos países⁵⁷.

1.1.3. Cuadro clínico

La taeniosis por lo general sigue un curso benigno y a menudo es asintomática; cuando se presentan síntomas, éstos pueden ser leves o moderados. Por lo común, el paciente afectado no recurre al médico, manteniendo la infección por años³². Las manifestaciones clínicas son ligeras produciéndose en 2 a 3 meses después de la ingestión de los cisticercos. Inicia con malestar general, aumento o pérdida de apetito y pérdida de peso. En ocasiones se puede presentar también astenia, adinamia, dolor abdominal, náuseas de predominio matutino, diarrea que puede alternarse con periodos de constipación y el prurito anal es frecuente⁵⁸.

La sintomatología y el diagnóstico clínico de la cisticercosis dependen del número de cisticercos, de la ubicación y del estado evolutivo de éstos, así como de la respuesta inmune del hospedero contra el parásito^{59, 60}. La NC se adquiere cuando el parásito se aloja en el Sistema Nervioso Central, la expresión clínica es polimórfica y va desde asintomático, hasta provocar lesiones cerebrales que causan cefalea, convulsiones, vómito, mareo, epilepsia, cambios de personalidad, déficit sensorial, trastornos de lenguaje, movimientos involuntarios, deterioro intelectual, alucinaciones, comportamiento violento, confusión, demencia, hipertensión endocraneal o la muerte⁵. Estas manifestaciones clínicas son comunes a distintos desórdenes neurológicos y no existen signos patognomónicos de la NC. La mayoría de estas manifestaciones clínicas se desarrollan durante un período de unos pocos días, semanas, o meses, con períodos de remisión y recaídas, probablemente debido a diferentes estados evolutivos del parásito.

1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico para la *taeniosis* se realiza por la identificación de proglótidos expulsados en las heces, los cuales deben ser observados al microscopio para la identificación de la especie, o bien, por el análisis de los huevos mediante técnicas coproparasitológicas de sedimentación y flotación^{45,61}. Estos métodos de detección son muy inespecíficos. Sin embargo, por su bajo costo y cuando se utiliza en forma seriada, es un buen método para detectar portadores de *Taenia* sp⁶². Para hacer el diagnóstico diferencial es necesario encontrar el escólex y observar en él la doble corona de ganchos presente en *T. solium* o los proglótidos para encontrar el número de ramas uterinas más de trece corresponden a *Taenia saginata* y menos de trece corresponden a *T. solium*. Recientemente se han desarrollado el análisis de detección de coproantígenos. Aplicado este análisis en un ELISA de captura que utiliza sueros hiperinmunes de conejo producidos contra extractos somáticos de adultos que ha mostrado tener un 99% de sensibilidad y un 99% de especificidad para *Taenia* sp⁶³.

Por otro lado, el examen de detección de anticuerpos mediante EIT, utilizando un antígeno de excreción/secreción de *T. solium*, este presenta un 95% de sensibilidad y 100% de especificidad. Esto se debe a que la prueba no reacciona con sueros de individuos con cisticercosis, sino sólo con los de individuos confirmados de estar infectados con la forma adulta de *T. solium*⁶⁴. Sin embargo, aún no se conoce la duración de los anticuerpos circulantes, por lo que una persona podría permanecer seropositiva por varios años sin tener al parásito⁶².

El diagnóstico diferencial de ADN ha mostrado al menos en escala experimental en el laboratorio una identificación del céstodos humanos incluyendo a *T. solium*. Estas pruebas involucran sondas de ADN, PCR o PCR acoplado a fragmentos de restricción para observar polimorfismos⁶⁵.

El diagnóstico para la cisticercosis se basa en los hallazgos clínicos, epidemiológicos y/o serológicos. En el caso que los cisticercos se ubiquen en un lugar accesible del tejido subcutáneo, éstos pueden ser palpados bajo la piel como pequeñas tumoraciones menores a 1cm de diámetro. En este caso es frecuente la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial con lipomas u otros tumores mediante biopsias⁶⁶. Las técnicas de imagen tales como tomografía axial computarizada (TC) o resonancia magnética (RM) han mejorado considerablemente el diagnóstico, pero rara vez son utilizadas en estudios epidemiológicos o de control debido a los costos que implica y a la limitada disponibilidad de equipos en áreas endémicas⁶⁷. Actualmente el único método funcional para el diagnóstico de cisticercosis en un laboratorio es la detección serológica de anticuerpos en contra del cisticerco, en especial la inmunoelectrotransferencia que utiliza como antígenos las glicoproteínas descritas por Tsang⁶⁸.

1.1.5 Tratamiento

El medicamento de elección hasta hace algunos años era la niclosamida, que actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero. No tiene acción contra los huevos ni

contra los cisticercos. Dicho fármaco puso en riesgo al paciente de contraer cisticercosis, pues destruye a los proglótidos y libera los huevos dentro de la luz intestinal. Lo que hizo que este quedará en desuso⁶⁹.

El albendazol es un fármaco de elección, sobre todo en menores de cinco años de edad. Tiene la ventaja de que no sólo actúa contra las larvas y adultos de *T. solium*, sino también contra la mayoría de helmintos y nemátodos⁶⁹. Su mecanismo de acción involucra ciertas alteraciones en la captación y la utilización de los carbohidratos por el parásito, mediante el bloqueo de receptores específicos en la estructura de la tubulina, como consecuencia no existe el intercambio metabólico nutricional entre la membrana y las estructuras internas de la célula, quedando el parásito inmóvil hasta su muerte⁷⁰. Otra de las acciones es la de inhibir a la fumarato reductasa, enzima que participa activamente en la síntesis de ATP, fuente de energía indispensable para el parásito⁷¹. Como antihelmíntico de segunda elección se utiliza prazicuantel este lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva interfiriendo con los canales iónicos principalmente el de calcio⁷². Así como drogas anti-inflamatorias y anti-epilépticas en el caso de la NC.

1.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico proporcionado por la producción excesiva de especies reactivas que provocan daño a las biomoléculas y que no pueden ser contrarrestados por los sistemas antioxidantes. Las especies reactivas son especies químicas que son capaces de extraer electrones de las moléculas vecinas para completar su orbital; convirtiéndose en componentes altamente reactivos y en las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos⁷³.

La respuesta inmune del hospedero en contra de la *Tenia* tiene componentes tanto celular como humoral. Estas células del sistema inmune son capaces de producir proteínas citotóxicas, enzimas proteolíticas o bien liberar especies reactivas de oxígeno (ERO's) capaces de generar graves daños al parásito⁷⁴.

Las ERO's son generadas por la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria y como productos de reacciones metabólicas normales en el citoplasma, retículo endoplásmico, en la membrana plasmática y en los peroxisomas y por neutrófilos, eosinófilos y macrófagos activados. Estas especies causan daño a toda clase de moléculas tales como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos ^{75, 76, 77}.

Las principales ERO's que se conocen son: superóxido (O_2^-) es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de perhidroxilo (HO_2^-) convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. No es particularmente reactivo con lípidos, glúcidos o ácidos nucleicos y exhibe reactividad limitada con determinadas proteínas. El O_2^- reacciona con proteínas que contienen metales en su grupo prostético. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , precursor de radical) es la forma menos reactiva de las ERO's, participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de ERO's, atraviesa con facilidad las membranas biológicas con lo que pueden dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción. Se puede originar a partir de diversas fuentes: por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones, por disminución del superóxido o como producto de algunas reacciones por las enzimas (glucosa oxidasa, uricasa), así como por reacciones químicas de autooxidación ^{78, 79}. El hidroxilo ($OH\cdot$), sin embargo, reacciona con cualquier molécula que tenga cerca, sin especificidad alguna y el peligro radica en la importancia funcional del compartimento celular en el que se origina o la molécula a la que ataque. El óxido nítrico: (NO) es otro de los radicales libres que es sintetizado en el organismo por la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de arginina y NADPH. El NO puede reaccionar con el O_2^- y formar Peroxinitrito (ONOO), compuesto que tiene la propiedad de oxidar ácidos grasos y generar el radical $OH\cdot$. El ácido conjugado del peroxinitrito es el ácido peroxinitroso (HOONO) potente oxidante que tiene la capacidad de transferir un átomo de oxígeno a la membrana y formar la metionina sulfóxido.

Un ejemplo de cómo se generan las especies reactivas es la "explosión respiratoria" (ER). Un hecho común a todo tipo de inflamación es la infiltración en el tejido afectado de células capaces de moverse libremente (leucocitos,

neutrófilos, monocitos o macrófagos). Estas células se activan y llevan a cabo la fagocitosis a través de un mecanismo de consumo de oxígeno. Dicho consumo puede llegar a ser de hasta veinte a treinta veces superior al que existe previo a la activación. Utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente $O_2^{\cdot -}$. Por otra parte, dichas células también generan óxido nítrico (NO), por acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular, como mecanismo de defensa. La combinación del $O_2^{\cdot -}$ con el NO da lugar a la formación del ONOO⁻ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas y destruir así las membranas celulares^{80, 81}.

1.2.1 Sistema antioxidante

Para contrarrestar los efectos destructivos de las ERO's células, tejidos, órganos y organismos utilizan muchos niveles de defensas antioxidantes de remoción de daños, reemplazo o sistemas de reparación para lidiar con los daños causados por el oxígeno. Un antioxidante es cualquier sustancia que en presencia o a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de un sustrato. Para detener este proceso destructivo los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos o no enzimáticos de protección al daño producido por los oxidantes. Esta protección puede ser **Preventiva**: Diversas proteínas con núcleos enlazados o coordinados a metales (albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, cobre); ferritina, transferrina y mioglobina, así como hierro, previenen la formación de ERO's que se generan por encima de los niveles normales del organismo. **Reparadora**: Enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de radicales libres, tales como superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPx), Glutación reductasa y Catalasa. **Secuestradora**: Cuya acción es secuestrar y limitar la exposición a los iones Fe^{+3} y Cu^{+2} , ya que su exceso promueve la generación de radicales libres. Las proteínas que cumplen esta función son: Ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina. Y otros como Tocoferol, Betacaroteno, Acido ascórbico y Flavonoides. Un componente adicional en la red antioxidante, son las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos^{82, 83}.

1.2.2 Sistema antioxidante no enzimático

Este sistema lo constituyen un heterogéneo grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. En esencia, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Algunos solubles en agua como el ácido ascórbico, tioles urato, y piruvato, así como algunos lípidos solubles como la vitamina E y el betacaroteno^{82, 83}.

1.2.3. Sistema antioxidante enzimático

El principal sistema de defensa contra los radicales libres lo constituyen proteínas antioxidantes enzimáticas que incluyen la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx)^{84,85}. La eficacia de esta tríada enzimática reside en una triple acción defensiva al disminuir la producción de estas especies oxigénicas e impedir la interacción de estas entre sí, para dar lugar a especies más estables de menor reactividad y evitar la peroxidación de las macromoléculas. Catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas. Frente a una situación de exposición prolongada a ERO's, puede ocurrir una disminución en las concentraciones del NADPH, necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos antioxidantes enzimáticos no consumen cofactores. El descubrimiento de estos sistemas de estos sistemas ayudará a entender como los parásitos se defienden del estrés oxidativo⁸³.

1.3. Generalidades de la GPX

Uno de los mecanismos que las células emplean para matar a los parásitos es la liberación de ERO's producidos en el sistema de explosión respiratoria o liberación de óxido nítrico^{26, 86,87}. Pueden atacar a los lípidos de membrana del parásito y afectar su integridad⁸⁸. Glutatión peroxidasa (GPX) asume un papel importante en la desintoxicación de los lípidos y el peróxido de hidrógeno que rápidamente se forman durante la fagocitosis o el metabolismo fisiológico.

La GPX es una enzima selenio dependiente, puede reducir peróxidos lipídicos, así como el peróxido de hidrógeno, es probablemente el mayor eliminador de H₂O₂ en células de mamíferos. Utiliza como agente reductor, el glutatión reducido (GSH) (Fig. 8A). Es un enzima muy importante para el mantenimiento de la estructura y función de las membranas biológicas. En organismos superiores, la GPX aparece en gran parte para suplantar la necesidad de la catalasa^{82, 89-94}. Se han descrito GPX's en los animales, en las plantas, en los esporozoarios, en algunas algas, hongos y bacterias. En células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune. También se ha encontrado en tejido testicular y en espermatozoides de mamíferos, realizando un papel estructural en la cápsula mitocondrial en la parte media y en el flagelo de los espermatozoides cumpliendo de esta manera una función metabólica importante como antioxidante^{95, 96, 97,98}.

Se han encontrado al menos 5 isoenzimas de la GPX en mamíferos. Sus niveles de expresión varían dependiendo del tipo de tejido. **La glutatión clásica o forma celular (GPx-c ó GPX1)** se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune.^{99, 100}. Tiene mayor afinidad por el H₂O₂ que por el lipoperóxido, puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres a expensas del glutatión y convertirlos en agua y alcoholes. **La gastrointestinal (La GPX2)**, representa la principal peroxidasa dependiente de glutatión en el tracto gastrointestinal. Es importante en la reducción de

hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos. **La extracelular o plasmática (GPX3 ó GPx-p)** es una glicoproteína purificada, no sólo está en el plasma sanguíneo sino que en la mayoría de secreciones corporales. Se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón y de ahí es liberada a la sangre. Se detecta en la mayoría de los tejidos excepto en el tracto gastrointestinal, presenta afinidad para ambos sustratos, reduce lípidos complejos, como el hidroperóxido de fosfatidilcolina o hidroperóxidos en algunas proteínas como la tioredoxina^{94, 95,98}. **La glutatión fosfolípido hidropoxidasa (GPX4 o PHGPX)**, se encuentra en la mayoría de tejidos, localizándose tanto en el citosol como en la membrana. Se expresa mayormente en células del epitelio renal y en los testículos. Su función biológica primaria es proteger contra la lipoperoxidación, Tiene afinidad específica para los lipoperóxidos, puede reducir directamente a hidroperóxidos lipídicos, ácidos grasos e hidroperóxidos de colesterol que se producen en la peroxidación de membranas y lipoproteínas oxidadas¹⁰¹. Además, esta enzima se requiere durante la espermatogénesis para oxidar los tioles de las proteínas que estabilizan la cápsula mitocondrial que contiene los espermatozoides. También se requiere de otra enzima similar pero con un extremo N-terminal distinto y rico en argininas, resultado de un ensamble alternativo de exones ("splicing"). Esta enzima oxida las cisteínas de la protamina que condensa la cromatina del espermatozoide¹⁰². **La GPX5**, que se expresa específicamente en ratón¹⁰³.

La glutatión peroxidasa es una glicoproteína tetramérica, compuesta por 4 subunidades idénticas entre sí y cada una de éstas contiene un átomo de Selenio (Se) unido covalentemente a una molécula de cisteína, con excepción de la PHGPX que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras glutatión peroxidases. La secuencia de aminoácidos de las subunidades de la GPx-c es diferente a la secuencia de la GPx-p, esta última además es una proteína glicosilada y posee puentes disulfuros intramoleculares. El peso molecular de la GPx-c es de 22 kDa, mientras que el de la GPx-p es de 25 kDa, con un total aproximado de 221 aminoácidos por subunidad, el peso molecular total es de aproximadamente 80 KDa^{104, 105}. Las subunidades por separado no presentan actividad catalítica, sin embargo, la PHGPx es una enzima monomérica que también posee un átomo de Se, su peso molecular es

de 20 kDa y presenta actividad catalítica¹⁰⁶. Se han observado diferencias entre los sexos con respecto a la actividad de la enzima, los niveles de ARNm y las concentraciones de Se en el hígado de ratas y ratones; estas diferencias favorecieron al sexo femenino¹⁰⁷. Cada subunidad está constituida por una estructura central de dos cadenas paralelas y dos antiparalelas de hojas plegadas, rodeada por cuatro α -hélice; una de las hélices corre antiparalela a la cadena β vecina.

En los mamíferos estas enzimas tienen la particularidad de tener en su sitio activo una **selenocisteína**, una cisteína en la cual el azufre ha sido reemplazado por Se (Fig. 8B). También se han detectado selenoproteínas en procariotas y recientemente en plantas. Éste residuo de selenocisteína se encuentra localizado dentro de una concavidad plana, rodeada por residuos de aminoácidos aromáticos y representa el sitio activo. La selenocisteína está codificada por el codón de terminación UGA pero el mecanismo de traducción reconoce una determinada conformación del ARNm e introduce en ese codón un ARNt con una serina transformada enzimáticamente en selenocisteína. El Se está como selenol y reacciona con el H_2O_2 para formar ácido selénico y agua, o alcohol en el caso de los alquilperóxidos. El glutatión reacciona con el ácido selénico para formar otra molécula de agua y una segunda molécula de glutatión reacciona con el glutatión unido para formar disulfuro de glutatión (Fig. 8C)¹⁰⁸.

El mantenimiento de la defensa contra las oxidaciones mediadas por el peroxinitrito es también una función de la GPX y de otras selenoproteínas que contienen selenocisteína o selenometioninas^{109, 110}.

La GPx, actúa junto con el superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) para catalizar la degradación intracelular de hidroperóxidos lipídicos, evitando de esta forma posibles daños oxidativos a las proteínas y a las membranas de los organelos, pudiendo llegar a causar alteraciones al ADN en los espermatozoides^{96,111}.

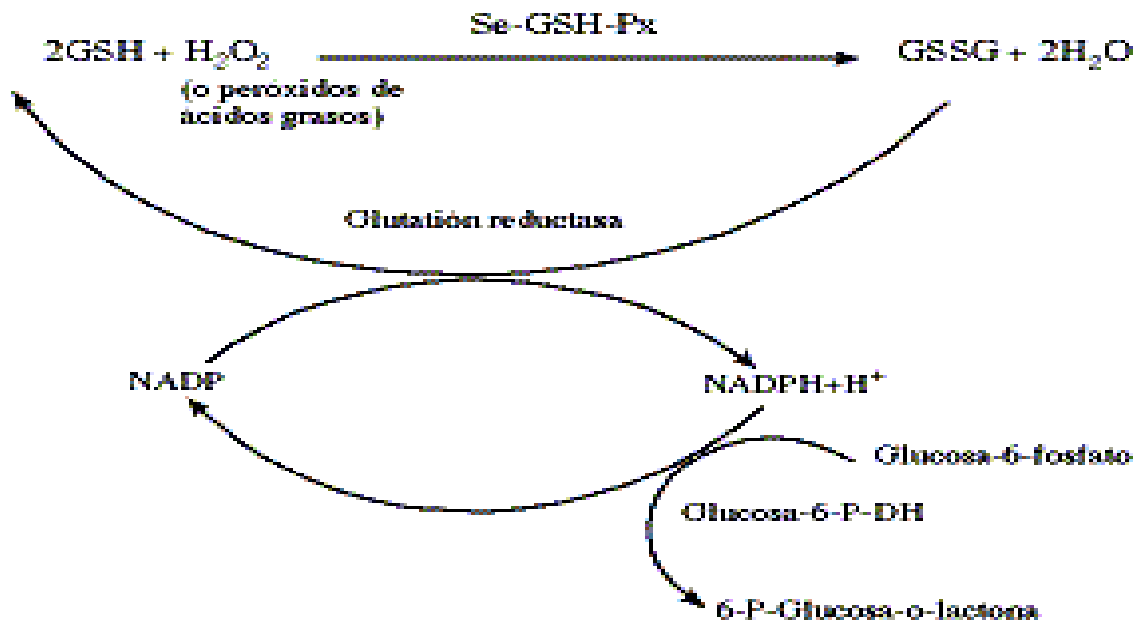


Figura 8A. Reacciones en las que participa la glutatión peroxidasa (Maas, 1990).

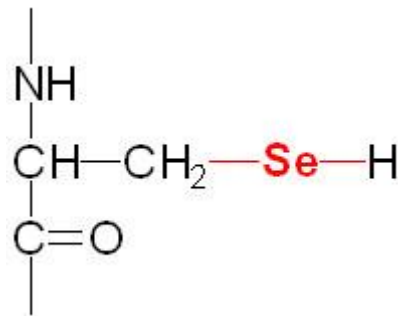


Figura 8B. Estructura de él residuo de una Selenocisteina (Lenninger 1987)

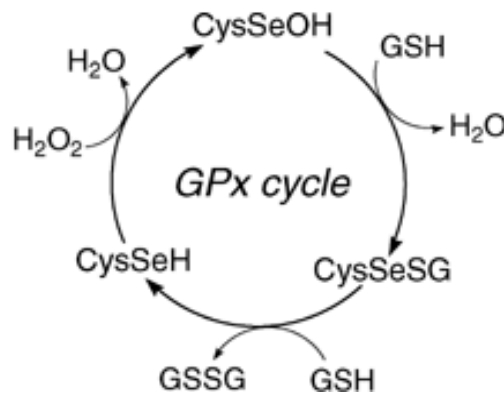


Figura 8C. Mecanismo de ping-pong de la Glutatión Peroxidasa.

III. Planteamiento del problema

Dada la importancia de la taeniosis y la cisticercosis producidas por *T. solium* y siendo ambos padecimientos un problema económico y de salud, es necesario no solo conocer el ciclo biológico para prevenir y controlar a dicho parásito, sino también caracterizar sus genes y productos enzimáticos involucrados en los procesos fisiológicos importantes para el parásito. Esto se ha convertido en objeto de intensos estudios en varios países.

T. solium cuenta con numerosas enzimas que le permiten su instalación y supervivencia dentro del hospedero. En la búsqueda de eliminar al parásito se ha optado por caracterizar al gen que codifica para Fosfolípido Hidroperóxido-Glutatión Peroxidasa de este parásito. El conocimiento molecular, genético, bioquímico e inmunológico de la enzima nos permitiría establecer estrategias para comenzar a determinar vías de ataque específicas a blancos esenciales, lo cual podría ser utilizado con el fin de impedir la instalación y propagación de este parásito en sus hospederos y en un futuro realizar experimentos inmunológicos y de regulación con este gen. Por lo cual, han sido propuestas como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos o vacunas. Dado que aun no se conoce el genoma de *T. solium* este trabajo es importante pues la clonación del ADNc que codifica para la PHGPX permitirá que se encuentren otras vías de defensa en contra de este parásito.

IV. HIPÓTESIS

La lipoperoxidación de membranas es producida por la generación de radicales libres producidos por la respuesta inmune del hospedero, por lo cual es posible que *Taenia solium* pueda contar con la enzima PHGPX para protegerse de este daño.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- *Aislar y caracterizar el ADN complementario (ADNc) que codifica para la Fosfolípido Hidroperóxido Glutación Peroxidasa (PHGPX) de T. solium.*

4.2. Objetivos particulares:

- *Producción de una sonda de ADN que sirva para aislar el ADNc que codifique para la PHGPX.*
- *Aislamiento del ADNc que codifique para la PHGPX de T. solium.*
- *Analizar la secuencia de nucleótidos del ADNc.*
- *Comparar la secuencia de aminoácidos de la PHGPX de Taenia solium con GPX's de otras especies y determinar su identidad.*
- *Evaluación del efecto de estrés oxidativo por hidroperóxido sobre cisticercos.*
- *Determinación de la dosis letal de hidroperóxido de cumeno para cisticercos.*

V. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de estudio que se aplicó al presente proyecto fue de tipo experimental prospectivo, descriptivo y transversal.

Población:

DNAc de una biblioteca de DNAc de larva de Taenia solium.

Criterios de inclusión

- *Clonas con el inserto deseado para posterior secuenciación*
- *Cisticercos de Taenia solium*
- *Bacterias transformadas con el ADNc clonado en un vector pCRII.*

Criterios de exclusión

- *Bacterias no transformadas con el inserto*
- *DNA impuro con proteínas o fenol*
- *Cisticercos de Taenia crassiceps calcificados.*
- *Material reciclado o sucio*
- *Geles de agarosa mayores del 3%*

Variables:

- **Independiente:** *condiciones de temperatura, tiempo y concentraciones de las reacciones*
- **Dependiente:** *ADNc obtenido*

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.1. Material biológico

Cepas de *Escherichia coli* TOP10, cepa C600hfl y el vector pCRII fueron obtenidos de la casa Invitrogen. Cisticercos de *T. solium*, cisticercos de *T. crassiceps* cepa WFU y ratones Balb/c de 6 semanas. El ARN total obtenido por la técnica de trizol y almacenado a -70°C, la biblioteca de ADNc construida en el fago λ gt10 fueron proporcionados por el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

6.1.2. Reactivos

Los oligonucleótidos GPX-L1E y GPX-L2E diseñados a partir de los sitios AFPCNQF y WNFTKFL secuencias altamente conservadas en varias glutatión peroxidasas así como los oligonucleótidos denominados λ gt10-si5' y λ gt10-si3' que flanquean la región de clonación del fago λ gt10. El estuche para la reacción de la reverso-transcripción (RT-PCR) fue el Superscript One-Step RT-PCR y el estuche para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la casa Invitrogen. Las endonucleasas de restricción Eco RI y Hind III fueron obtenidas de la casa comercial GIBCO BRL, también de esta casa proviene el estuche RedPrime DNA Labeling System con el cual se realizó el marcaje radioactivo de la sonda. El isótopo radioactivo $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP fue comprado a la casa comercial Amersham Bioscience. Las placas de rayos X utilizadas para las autorradiografía de las membranas del tamizaje fueron de la marca KODAK. Las membranas de nitrocelulosa fueron adquiridas de la casa comercial Millipore, mientras que las de Nylon Hybond fueron de Amersham Bioscience. El medio RPMI de la casa comercial GIBCO. Cámara de electroforesis de la casa Life-Technologies, secuenciador automático SEQ4X4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech, centrifugas (Centra CL2, IEC y Biofuge fresco Heraeus Kendro, Eppendorf Centrifuge 5415C), Stratalinker 2400 de la casa Stratagene, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) columna de Sefarosa CL4B, campana de seguridad, Vortex. Tubos Eppendorf, matraces, pipetas, cajas Petri, placas de cultivo. Todos los demás reactivos para preparar las soluciones y medios fueron de la más alta calidad posible que se encontraban disponibles en el laboratorio de Biología Molecular de parásitos de la Facultad de Medicina UNAM.

6.2. Métodos

6.2.1. Obtención de una sonda

Para generar la sonda para la GPx se utilizó la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con los oligonucleótidos GPX-L1E y GPX-L2E y 1 µg de RNA total proveniente de la larva de *T. solium*. El programa de RT-PCR consistió en un ciclo de 50°C por 25 minutos para la síntesis del ADNc y para la PCR se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C por 15 segundos (desnaturalización), 50°C por 30 segundos (alineamiento) y 72°C por 60 segundos (extensión) y un ciclo adicional de 72°C por 7 minutos. El fragmento obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio corriéndose en una cámara de electroforesis de la casa Life-Technologies, a 100V por 1 hora. El fragmento obtenido fue cortado del gel y disuelto en una solución de NaI 6M a 37°C por 15 minutos. Después de que se ha disuelto la agarosa, a la mezcla se le agregó 2 µL de perlas de vidrio, se agitó y se incubó a 4°C por 2 horas. Inmediatamente se centrifugó a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 30 segundos y se desechó el sobrenadante. Se lavaron las perlas una vez con 500 µL de NaI, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 segundos, se adicionó una solución de etanol al 50% en Tris-HCl, se resuspendieron las perlas de vidrio y se centrifugó como antes, este paso se repite 2 veces más. Finalmente después de desechar el sobrenadante, las perlas se secaron a 37°C y el ADN se eluyó, resuspendiendo las perlas en 25 µL de amortiguador TE e incubando a 37°C por 30 minutos. El fragmento de ADN obtenido fue amplificado por PCR y ligado en el vector pCRII TOPO. Con la ligación anterior se transformaron bacterias de *E. coli* de la cepa TOP10. Se encontró una clona positiva que contenía el fragmento, la cual se secuenció en un secuenciador automático SEQ4X4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

6.2.2. Marcaje radioactivo

Para realizar el marcaje radioactivo de la sonda se utilizó el estuche Radom Prime Labelling System de la casa GE Healthcare. Para esta metodología se necesitó 25 ng del fragmento puro (Sonda GPX) en un volumen de 45 µL de amortiguador

TE. Se calentó a 100°C por 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo el mismo tiempo. La mezcla se colocó en el tubo de reacción del estuche para marcaje RedPrime, se adicionaron 5 µL de ³²P-dCTP al tubo de reacción y se incubó durante 10 minutos a 37°C, transcurrido el tiempo se detiene la reacción con 5µL de EDTA 0.2M. Finalmente antes de utilizar la sonda, ésta se desnaturalizó a 100°C por 3 minutos y se mantuvo a 4°C por 2 minutos antes de ser utilizada en el tamizaje.

6.2.3. Tamizaje para el aislamiento de las clonas

Bacterias C600hfl de *E. coli*, fueron inoculadas en 50 mL de medio SOBMB e incubadas a 37°C toda la noche. Una vez crecido el cultivo, se centrifugó a 3,500 rpm (Centra CL2, IEC) por 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en MgSO₄ 10mM. La titulación de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo utilizando diferentes diluciones de la biblioteca clonada en el vector λgt10. Se tomaron 300µL de bacterias y se infectaron con diferentes volúmenes de las diluciones de biblioteca por 15 minutos, para después mezclarse con medio SOBMB-TOP líquido a 55°C, se agitó y se sembraron en cajas Petri con medio SOBMB-agar. Una vez solidificado el medio se incubaron toda la noche a 37° C. se cuenta el número de placas líticas se multiplica por la dilución y se obtiene el título de la biblioteca. Se sembraron 45,000 fagos en tres cajas Petri de 180mm de diámetro, siguiendo el protocolo antes mencionado. Las placas líticas producidas por los fagos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa sobre el tapete crecido en la caja petri, estas membranas se mantuvieron por 2 minutos, se marcaron con tinta china para tener puntos de referencia que permitieron relacionar las autorradiografías con la posición de las placas líticas. Las membranas fueron colocadas sobre una solución alcalina (ver anexo) por 2 minutos, para desnaturalizar el ADN del fago, las membranas se neutralizaron por 2 minutos con una solución de Tris-HCl (ver anexo). Finalmente las membranas se lavan con una solución de citratos 5x (SSC 5x ver anexo) durante 2 minutos. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y el ADN fijado con luz ultravioleta en un Stratalinker 2400 de la casa Stratagene.

El ADN fijado en las membranas se coloca en una solución de hibridación (ver anexo) por 1 hora a 42°C. Finalizado este tiempo se añadió la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP se dejó hibridar con las membranas toda la noche a 55°C. Las membranas se lavaron 3 veces con 100 mL de SSC 2x por 5 minutos en agitación, y se dejaron secar. Las membranas fueron expuestas a placas de rayos X a -70°C toda la noche. Las placas se revelaron utilizando revelador y fijador de la Casa Kodak. Las clonas positivas se aislaron y se almacenaron en 500 μL de medio SM a 4°C. Se realizaron un segundo y tercer tamizaje para obtener clonas de fagos aisladas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

6.2.4. Purificación de ADN a partir de fagos

Para la obtención de ADN de los fagos, se infectaron 300 μL de *E. coli* C600hfl con aproximadamente 1×10^6 fagos de cada clona positiva provenientes del tamizaje terciario, esta mezcla se incubó 15 minutos con las bacterias y se mezcló con 3 mL de medio SOMB-TOP para después ser sembrados en cajas Petri con SOB- agar. Se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Los fagos crecidos en las cajas se recuperaron con 7 mL de medio SM en dos rondas, en la primera se utilizó 5 mL de amortiguador y en la segunda 2 mL, agitando por una hora a temperatura ambiente, este líquido se transfirió a tubos falcón de 15 mL. Al líquido obtenido se le agregó 200 μL de cloroformo, se agitó y se centrifugó a 3400 rpm (Centra CL2, IEC) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante denominado plate stock, se colocó en un tubo nuevo y se almacenó a 4°C hasta su uso. Se tomaron 700 μL de la suspensión del fago (plate stock) a un tubo Eppendorf y se le adicionó 700 μL de la solución de PEG (20% + NaCl 2.5 M) y se mantuvo en hielo por 1 hora. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a temperatura ambiente, se tiró el sobrenadante y recentrifugó rápidamente, se desechó el sobrenadante remanente. El precipitado obtenido se resuspendió en 200 μL de SM, se adicionó 2 μL de RNasa A (1mg/ml) y 2 μL de DNasa (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dejándose incubar a 37°C por 30 minutos. Se le adicionó 2 μL de SDS 10% y 2 μL de EDTA 0.5 M pH 8.0, nuevamente se dejó incubar a 68°C por 15 minutos, luego se le adicionaron 200 μL de fenol saturado con TE, se agitó en vortex por 1 minuto y mantuvo 2

minutos a temperatura ambiente, se adicionó 200 μL de cloroformo y se agitó como antes. La mezcla se centrifugó 2 minutos y transfirió la fase acuosa en un tubo nuevo. Enseguida se adicionó un igual volumen de cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó por 1 minuto. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 200 μL de isopropanol y se agitó en vortex. Esta mezcla se guardó a -70°C por toda la noche. Pasado este tiempo Se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos a 4°C (Biofuge fresco Heraeus Kendro) se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 200 μL de etanol al 70% frío (-20°C), se centrifugó de nuevo por 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Se centrifugó nuevamente y rápidamente se removió el sobrenadante remanente con una micropipeta. Finalmente, el precipitado se secó en SpeedVac por 3 minutos y este se resuspendió en 30 μL de TE.

6.2.5. Digestión con endonucleasas

Para realizar la digestión del ADN de las clonas obtenidas se utilizaron las endonucleasas Eco RI y Hind III. En la mezcla de reacción se usó 5 μL de la preparación de ADN del fago, 5 μL de amortiguador de cada enzima, agua c.b.p. 50 μL y 2 μL de enzima (20 U/ μL). Las reacciones se dejaron incubar 3 horas a 37°C , para determinar el progreso de la digestión se corre en un gel de agarosa al 2% a 100 V con una muestra del ADN sin digerir y las muestras en digestión. En caso de que la digestión aun no sea la deseada se vuelve a agregar más enzima hasta obtener una digestión total.

6.2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para cada reacción de PCR se utilizaron las siguientes cantidades. En un tubo Eppendorf de 200 μL , se adicionó 2.5 μL amortiguador de reacción 10x, 2.5 μL de dNTP's 2 mM, 1.25 μL MgCl_2 20x, 1 μL de cada oligonucleótido, 0.25 μL de enzima Taq Polimerasa (5 U/ μL), 1 μL (100 ng) de ADNc y agua c. b. p para un volumen final de 25 μL . Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) empleando las siguientes condiciones de amplificación: un primer ciclo de 95°C durante 3 minutos, 50°C por un minuto y 72°C por 1 minuto, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 50°C por 1

minuto, 72° C por 1 minuto y finalmente un ciclo a 92 ° C por 1 minutos, 50°C por 2 minutos y 10 minutos a 72°C.

6.2.7. Ligación y transformación bacteriana

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el estuche de ligación TOPO-TA Cloning System de la casa Invitrogen, para lo cual se utilizó 1 µL del vector pCR II-TOPO, 1 µL de amortiguador de ligación con sales, 1 µL de agua y 3 µL de un PCR fresco de la clona positiva amplificada con λgt10-si5' y λgt10-si3'. Por último la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se tomaron 2 µL de la ligación anterior y se incuban con 50µL de bacterias *E. coli* TOP-10 competentes, durante 30 minutos en hielo, pasado este tiempo las bacterias se incubaron a 45°C por 30 segundos e inmediatamente se les adicionó 200 µL de medio SOC y se incubaron a 37°C por 1 hora en agitación constante. Posteriormente las bacterias se sembraron en una caja Petri con agar LB con ampicilina (100 µg /mL) y se incubaron a 37°C toda la noche. Se escogieron algunas colonias para preparar su ADN plasmídico y por medio de la PCR con los oligonucleotidos λgt10-si5' y λgt10-si3', se identificaron las clonas que contenían los insertos de interés.

6.2.8. Preparación alcalina de ADN plasmídico y selección de clonas.

Las colonias transformadas que presentaban el inserto de interés fueron crecidas toda la noche en 50 mL de medio LB-ampicilina. Para obtener el ADN plasmídico se recurrió a la lisis alcalina de las células. El cultivo anterior se centrifugó a 3,400 (Centra CL2, IEC) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y al precipitado se le adicionaron 5mL de solución 1 (ver anexo), el que se resuspendió vigorosamente y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se le adicionaron 10mL de la solución 2 (ver anexo) mezclando suavemente, invirtiendo los tubos 2 veces, se incubó en hielo por 10 minutos. Enseguida se le adicionaron 7.5 mL de la solución 3 (ver anexo), se agitó la mezcla y se mantuvo en hielo por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3,400 rpm por 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adiciona 15mL de isopropanol frío, se mantuvo en hielo por

10 minutos. Se centrifugó a 3,400 rpm por 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el precipitado resuspendido en TE. Se adicionaron 2 µL de ARNasa (10mg/mL) y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente la mezcla fue sometida a dos extracciones con fenol-cloroformo-fenol y la fase acuosa fue pasada por una columna de Sefarosa CL4B, previamente equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 500 µL, se realizó un gel de agarosa al 1% para determinar las fracciones que contenían el plásmido. Estas fracciones fueron precipitadas a -70°C con acetato de sodio 3M y etanol absoluto. Finalmente, las fracciones con el ADN fueron resuspendidas en 25 µL de TE. La cuantificación y pureza del ADN se determinó espectrofotométricamente mediante el cociente de absorbancia a 260 y 280 nm. Un valor entre 1.8 y 2.0 indican la no contaminación con proteínas y carbohidratos.

6.2.9. Secuenciación y su análisis

La secuenciación se llevó a cabo con el estuche Thermo Sequence Cy 5.5 Die Terminator Sequencing Kit, en el cual se necesitó un mínimo de 500ng de ADN plasmídico que se llevó a un volumen de 12 µL con agua desionizada. A la dilución anterior se le agregó 1 µL de los cebadores marcados con fluorocromos (2-5 µM) y se agitó suavemente la mezcla que se denomina “reacción maestra”. Para realizar las reacciones de terminación se necesitaron 3 µL de dideoxinucleótidos del estuche que son repartidos en sus respectivos tubos, uno para A, para C, para G y para T, a cada una de estas reacciones se le agregó 3 µL “reacción maestra”, para después someterse a un programa de PCR (20 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C 1 minuto). Terminado el programa se agregó 6 µL del amortiguador de cargado con formamida y colorante, se calentó a 72°C por 3 minutos y se cargan en el gel de secuencia sobre el secuenciador automático 4x4 de Pharmacia. Los análisis como la traducción de las secuencias obtenidas, los alineamientos e identidad con otras GPX's se realizaron utilizando los programas de PC/GENE versión 2.1, BLAST, CLUSTAL W y PROSITE disponibles en Internet.

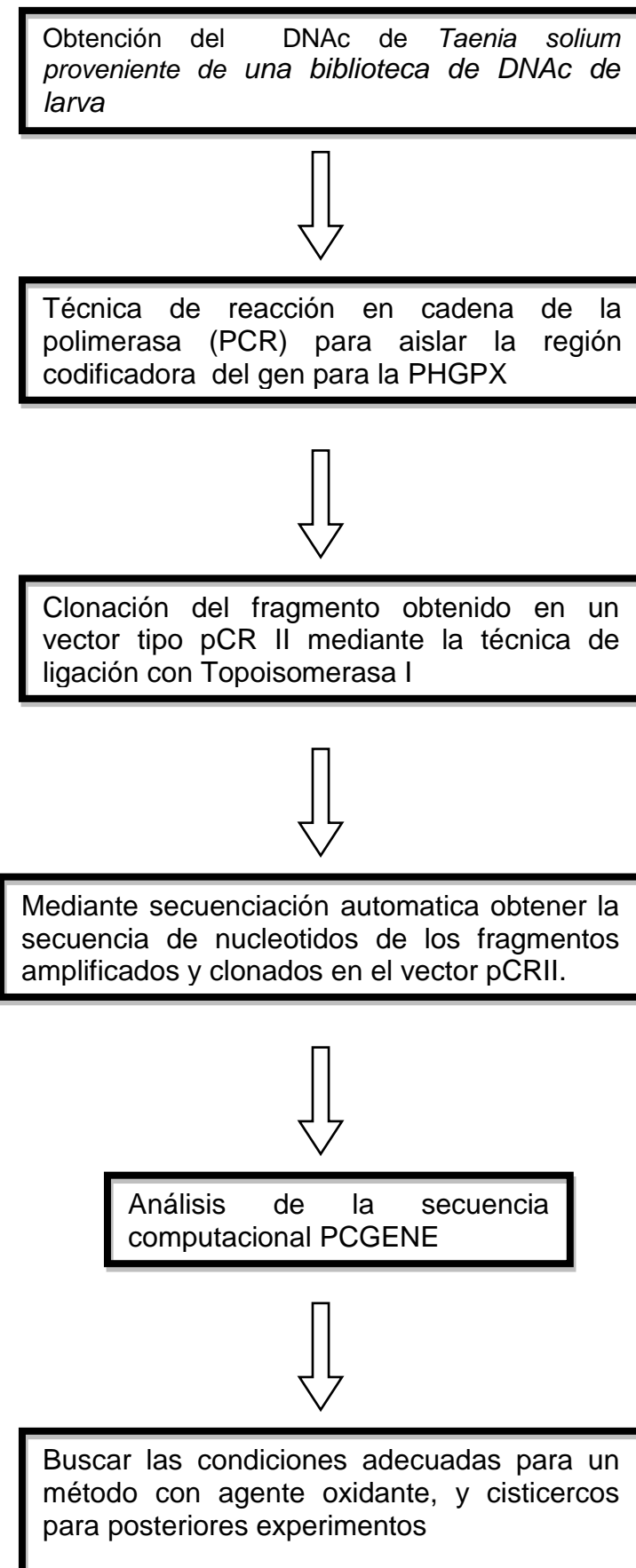
6.2.10. Ensayos de cultivo de cisticercos de *T. crassiceps* con hidróxido de cumeno.

Se utilizaron cisticercos de ratones de 5 meses de infección. Los ratones se sacrificaron, los cisticercos se obtienen del peritoneo del ratón, se lavaron 3 veces con 100 mL de PBS estéril. Se seleccionaron 10 parásitos de 2–3 mm por pozo, se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos y se incubaron por 4 horas en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado con piruvato de sodio (1mM), aminoácidos no esenciales (0.1mM), penicilina (100µg/mL) y estreptomicina (110µg/mL) a 37°C con 5% de CO₂, cumplido este tiempo los parásitos fueron cultivados con diferentes concentraciones de hidroxido de cumeno (sigma) (1.0, 2.0, 2.5, 7.5 y 10 mM) por 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

6.2.11. Determinación de la viabilidad

Se determinó primero la viabilidad para conocer el daño causado por el hidroperóxido de cumeno. Esta se determinó en cultivos incubados a 37°C en placas de ELISA de 24 pozos midiendo 3 parámetros: la evaginación, la movilidad y la morfología que presentaban los cisticercos por medio de un microscopio invertido. La determinación de los parámetros anteriores se realizó después del tratamiento de 30 minutos con diferentes concentraciones de cumeno. La movilidad fue determinada mediante la observación de movimientos característicos de la pared del parásito y se clasificó en alta, media, baja o nula. Así mismo la integridad de la morfología fue establecida por pérdida de fluido vesicular, daño a la pared y se clasificó en completa (ver tabla 1 y 2). La viabilidad del cisticercos se asumió como la capacidad de evaginar para seguir a su siguiente estadio de vida, la tenia o gusano adulto. La evaginación se determinó, adicionando bilis de cerdo (en proporción de 1 bilis por 3 de medio de cultivo) a los parásitos que se incubaron por 2 horas, observado la salida completa del escólex. Finalmente, para obtener la concentración letal 50 (CL 50) se gráfico el promedio de la viabilidad \pm desviación estándar (n=10) y se determinó la concentración en la cual la viabilidad es 50%.

Métodología general



VII. RESULTADOS

Producción de una sonda de GPX

Los oligonucleótidos GPX-L1E y GPX-L2E sintetizados a partir de dos secuencias conservadas (AFPCNQF y WNFTKFL) para las enzimas GPX's y el ADNc del parásito nos permitieron mediante la RT-PCR amplificar un único fragmento de ADN de aproximadamente 210 pb (Fig. 9A). Este fragmento se purificó, se clonó en el vector pCR11 y se secuenció como se describe en la metodología. Los análisis de BLAST de la secuencia nucleotídica y de la secuencia primaria obtenida a partir de la anterior (Fig. 9B) mostraron que el fragmento presentaba una alta identidad en secuencia primaria con varias GPX's.

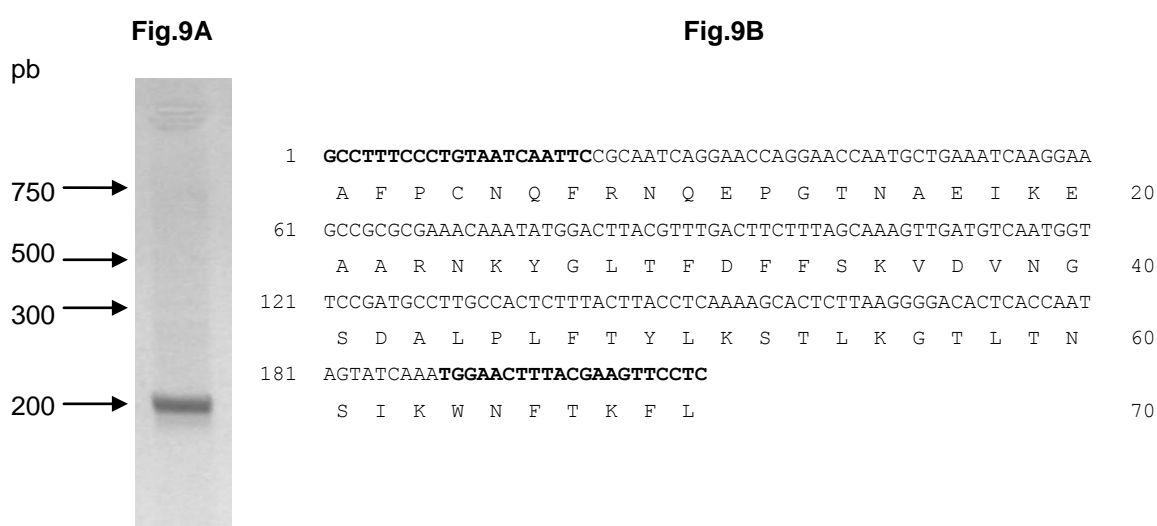


Figura 9. A) Gel de agarosa mostrando el fragmento que codifica para una GPX de *Taenia solium* obtenido mediante la RT-PCR, a la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores usados. **B)** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado. En negritas se muestran los aminoácidos con los que se diseñaron los cebadores GPX- L1E Y GPX-L2E.

Aislamiento y obtención de clonas

Una vez verificado que el fragmento de 210pb codificaba para una GPX's, este se marcó radiactivamente con α 32 P-dCTP y se utilizó como sonda para aislar clonas de GPX's. Se tamizaron 14,000 fagos provenientes de la biblioteca de ADNc de larva de *T. solium* construida en el fago lgt10. Al final del tamizaje terciario se obtuvieron tres clonas positivas que hibridaron fuertemente con la sonda, las clonas se denominaron 101B1, 101B2, 101B3.

Se purificó el ADN del fago de las 3 clonas aisladas del tamizaje terciario. Este ADN se utilizó como secuencia diana para por medio de la PCR y utilizando los oligonucleótidos (λ gt10si 5' y λ gt10si 3' que flanquean el sitio de clonación del fago λ gt10), obtener el ADNc que tienen clonado este vector (Fig.10). Puesto que las 3 clonas presentaban un tamaño similar de (~700 pb), se realizó un análisis con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III a estas clonas. Se observó una sola banda con cada una de las enzimas de restricción, lo que mostró que los patrones de restricción fueron idénticos, lo que a su vez sugería que las clonas aisladas eran la misma (Fig.11). Por lo que sólo se eligió la clona 101B1 para ser secuenciada. El fragmento de esta clona fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos de λ gt10 y se clonó en el vector pCR II.

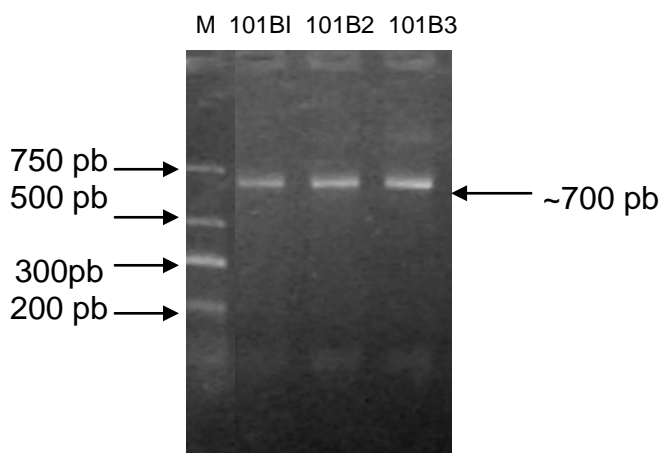


Figura 10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Donde se muestra el PCR del fragmento de ADNc contenido en las tres clonas de fagos obtenidas en el tamizaje de la biblioteca de *T. solium* clonada en el fago λ gt10. M. Los marcadores de tamaño usados, se muestran a la derecha del gel.

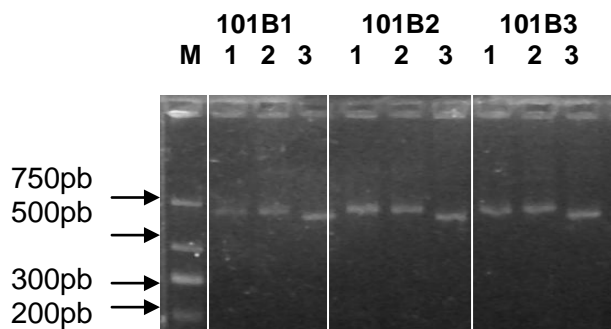


Figura 11. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio del patrón de digestión con las endonucleasas Eco RI y Hind III de los ADNc obtenido por PCR con los oligonucleótidos λ gt10si 5' y λ gt10si 3' de las 3 clonas que hibridan con la sonda de GPX. M es el marcador de tamaño. 1) ADNc sin digerir, 2) el ADNc digerido con Eco RI y 3) el ADNc digerido con Hind III respectivamente. El orden es el mismo para las otras clonas.

Caracterización del ADNc de la clona 10B1-1 de *T. solium*

La secuencia nucleotídica de la clona de ADNc (Fig.12) mostró que el inserto presentaba un tamaño de 863 pb y con un marco de lectura abierta (ORF) que principia con un codón de inicio ATG en la posición 43pb que codifica para la metionina de inicio y finaliza con un codón de término TAG en la posición 543pb, lo que produce una proteína de 165 aminoácidos con un PM predictivo de 18,670 Da y un punto isoelectrico (pI) predictivo de 8.48. El ORF presenta en la posición 160 de la secuencia un codón de término (TAG) característico para estas enzimas GPx's que se encuentra en el sitio activo de la enzima y que codifica para el aminoácido Seleniocisteína (SeC), motivo por el cual no se interrumpe el ORF de la clona. Asimismo, la secuencia presentaba una región 5' no traducida de 42pb y un región 3' no traducida de 339pb en la que podemos observar la secuencia del asa para la inserción de la SeC (SECIS) del nucleótido A en la posición 595 a la A con posición 689, la clásica señal de poliadenilación (AATAAA) en la posición 815pb de la secuencia, así como la cola de Poli A con 18 residuos de Adeninas. Cabe mencionar que 4 residuos no se lograron identificar que fueron marcados con la letra X.

Los análisis de alineamiento y comparación de la secuencia primaria obtenida con otras secuencias de GPx's depositadas en el banco de datos de GenBank (Fig. 13) mostraron identidades de 59% con la PHGPX de *Clonorchis sinensis* isoforma 1, 59% con PHGPx de *Clonorchis sinensis* isoforma 3, 56% con la HPGPX de *Schistosoma mansoni*, y 55% con la HGPX de *Hydra vulgaris*. Asimismo, se observó que la secuencia obtenida (Fig.14) presenta una identidad de 55% con la HPGPX de *Homo sapiens* (humano) isoforma C y con la HPGPX de *Sus Scrofa* (hospedero intermediario). También se logró observar los dominios conservados característicos de estas enzimas (AFPCNQF y WNFTKFL) que contienen dos de los tres aminoácidos característicos para la actividad catalítica [glutamina (Q⁷¹), triptófano (W¹²⁹)] así como la Seleniocisteina (SeC⁴⁰). En estos sitios se encontró una diferencia en el aminoácido 132, el cual es una glicina (G) en el caso de las PHGPX de ambas isoformas de *Clonorchis sinensis*, en la de *Homo sapiens*, *T. solium* y *Sus scrofa* presenta en su lugar es una treonina (T), y para la de *Schistosoma mansoni* e *Hydra vulgaris* es una serina (S). Estos análisis también confirmaron la presencia de sitios posibles de

glicosilación de tipo N localizados en DIDGN N VSMEK²⁰, SKVDV N GSDAL¹⁰³ y NSIKW N FTKFL¹²⁹. Se encontraron también cuatro sitios de fosforilación por proteína C kinasa localizados en MAS EKAKF³, ATLGL T QKNYD⁴², TYLKS T LKGTL¹¹⁷ y GTLTN S IKWNF¹²⁵.

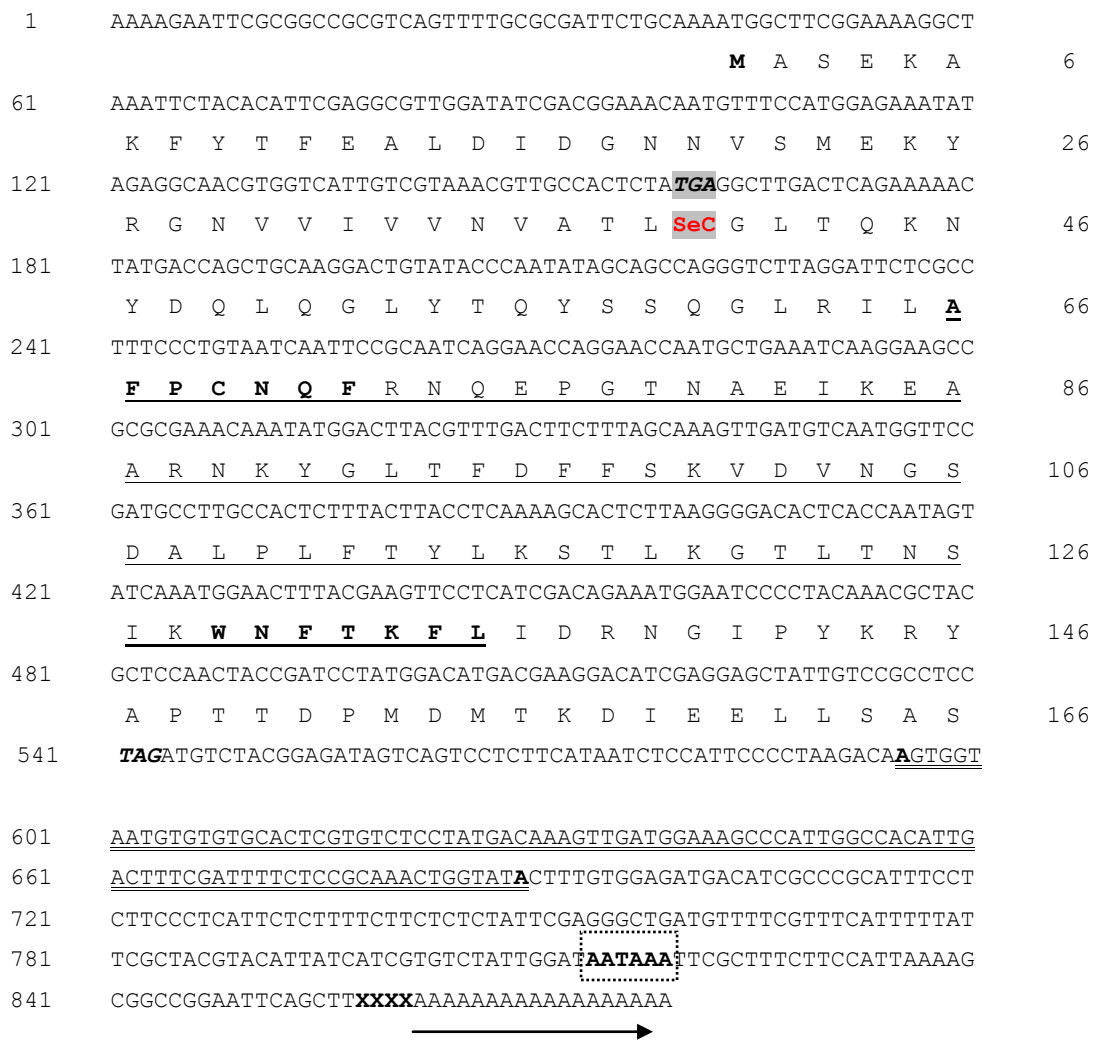


Figura 12. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida del fragmento de ADN que codifica para la HPGPX de Taenia solium. Sobre la secuencia de aminoácidos se resalta con negritas el codón de inicio (ATG) que codifica para la metionina y el codón de término (TAG⁵⁴³). Los aminoácidos subrayados corresponden aquellos que conforman la sonda, los aminoácidos subrayados y en negritas conforman la región donde se diseñaron el GPX-L1E y el GPX-L2E. En caja en gris el codón TGA¹⁶⁰ que codifica para la seleniocisteína (SeC⁴⁰) que es parte del sitio activo de la enzima. Los números a izquierda corresponden a pb, mientras que los números de la derecha señalan los aminoácidos. En caja punteada sobre la secuencia nucleotídica esta la señal de poliadenilación en la posición 815 de nucleótidos, con una fecha la cola poli A (Adenina), las XXXX corresponden bases no identificadas. Los nucleótidos que forman el asa SECIS están en subrayado doble.

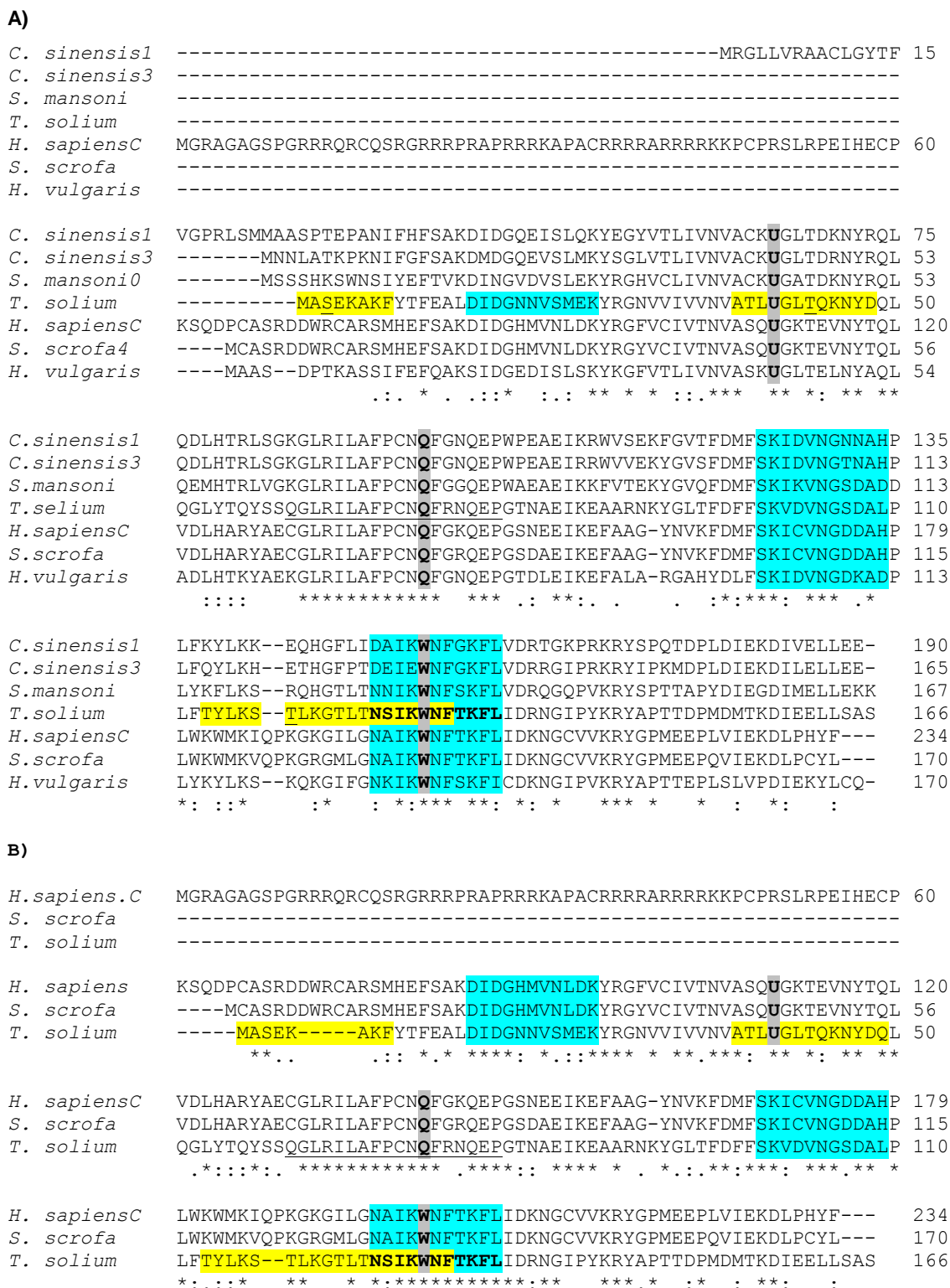


Figura 13. Alineamiento múltiple de varias Fosfolípido Hidroperóxido Glutatión Peroxidasas comparadas con la de *T. solium*. A) *Clonorchis. Sinensis* isoforma 1, *Clonorchis. Sinensis* isoforma 3, *Schistosoma mansoni*, *Homo sapiens* isoforma C, *Sus scrofa* e *Hydra vulgaris*. B) Alineamiento con sus hospederos, *Homo sapiens* isoforma C, *Sus scrofa* con la clona de *T. solium*. El número a la derecha corresponde a la cantidad de aminoácidos presentes de cada especie. Marcado con un asterisco se muestran los aminoácidos conservados en todas las especies. En negritas y en caja gris la triada catalítica de la enzima. En azul los sitios de N-glicosilación de la enzima. Resaltado con amarillo sitios de fosforilación de proteína C kinasa. En subrayado el sitio activo característico de la enzima. El aminoácido SeC se denominó como U en esta figura.

Efecto de estrés oxidativo por hidróxido de cumeno (HCU) sobre los cisticercos.

Para observar este efecto se procedió a la incubación de cisticercos con el HCU utilizando diferentes concentraciones del mismo y determinando el efecto a diferentes tiempos (Tabla 1). La evaginación, movilidad y daño a la pared de los cisticercos se vio afectada al aumentar la concentración y el tiempo de exposición al oxidante. Mostrando que concentraciones por arriba de 1.0 mM a 15 minutos causaban la disminución de la evaginación, así como del movimiento y la integridad de la membrana, la que se hace mas evidente a las 4 horas de exposición al oxidante. Para el caso de la concentración de 2.5mM determinada a los 30 minutos, se observó un daño drástico en la pared vesicular, con pequeñas fisuras, su movilidad fue media y sólo lograron evaginar 5 cisticercos. Esta misma concentración a 4 h fue letal para los parásitos, puesto que los cisticercos perdieron la capacidad de evaginar, moverse, así como gran daño en su pared vesicular donde se pueden observar fisuras, vacuolización y liberación de tejido al medio de cultivo. Tanto en la concentración 1.0mM y 2.5mM se puede observar que después de las 4 horas se mantiene un promedio de no evaginación entre el 40 y 90%, respectivamente. En el caso de la concentración de 5.0mM, el daño fue drástico a los 15 minutos e incrementa a los 30 minutos, observándose daño en la movilidad y la viabilidad del parásito. A partir de la concentración de 5mM a la hora se observó la pérdida total de la viabilidad, movilidad y pequeñas fisuras en la pared vesicular de los cisticercos. Cabe mencionar que en la concentración de 7.5mM los cisticercos no evaginaron y aún presentaban movilidad, no se observó daño en la membrana a los 15 minutos, en contraste en este tiempo con 10mM, perdieron la capacidad de evaginar, la movilidad y la pared vesicular está íntegra, sin embargo a partir de los 30 minutos el daño a la pared era evidente, observándose fisuras, así como liberación de tejido al medio de cultivo. Donde se observó un daño drástico en la integridad de la pared vesicular del cisticercos fue a las 6 horas de exposición al oxidante en las concentraciones 5mM, 7mM y 10mM, observándose grandes fisuras en la pared, vacuolización y una gran liberación de tejido al medio.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones milimolares (mM) de hidróxido de cumeno sobre cisticercos de *T. crassiceps* en cultivo determinado a diferentes tiempos.

TIEMPO (HORA)		CONTROL	1.0 mM	2.5 mM	5.0 mM	7.5 mM	10 mM
0.25	EVAG	10	8	6	2	0	0
	MOVI	++++	+++	+++	+	+	-
	Daño	membrana íntegra	Membrana íntegra	Membrana íntegra	Membrana íntegra	Membrana íntegra	Membrana íntegra
0.5	EVAG	10	7	5	1	0	0
	MOVI	++++	+++	++	+	+	-
	Daño	Membrana íntegra	Membrana íntegra	Alteración de membrana	Alteración de membrana	Alteración de membrana	Alteración de membrana
1	EVAG	10	5	3	0	0	0
	MOVI	++++	++	++	-	-	-
	Daño	Membrana íntegra	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana
2	EVAG	10	4	1	0	0	0
	MOVI	++++	++	+	-	-	-
	Daño	Membrana íntegra	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Fisuras y liberación de tejido al medio	Fisuras y liberación de tejido al medio
4	EVAG	10	3	0	0	0	0
	MOVI	++++	+	-	-	-	-
	Daño	Membrana íntegra	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras y vacuolas	Presencia de fisuras y vacuolas	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio
6	EVAG	10	5	1	0	0	0
	MOVI	++++	++	-	-	-	-
	Daño	Membrana íntegra	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio
24	EVAG	10	4	1	0	0	0
	MOVI	++++	+	-	-	-	-
	Daño	Membrana íntegra	Presencia de fisuras en membrana	Presencia de fisuras en membrana	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio	Fisuras, vacuolas y liberación de tejido al medio

Evaginación (**EVAG**): número de cisticercos evaginados.

Movilidad (**MOVI**): +++++ alta, +++ media, ++media, + baja, - nula.

En gris .Muestra la pérdida total de la viabilidad.

Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) del hidróxido de cumeno en cisticercos de *T. crassiceps*.

Se estableció una curva de viabilidad para cisticercos expuestos a diferentes concentraciones de hidróxido de cumeno durante 30 minutos. Se observó que la viabilidad del cisticerco se reduce a medida que la concentración del oxidante aumenta en el medio de cultivo. La viabilidad de los cisticercos no se alteró en la concentración de 0.25 mM, sin embargo después de esta decae hasta cero en la concentración de 7.5 mM. Esta cinética de viabilidad mostró que la dosis letal 50 (DL₅₀) del hidróxido de Cumeno para este parásito fue de 2.0 mM (Fig. 15).

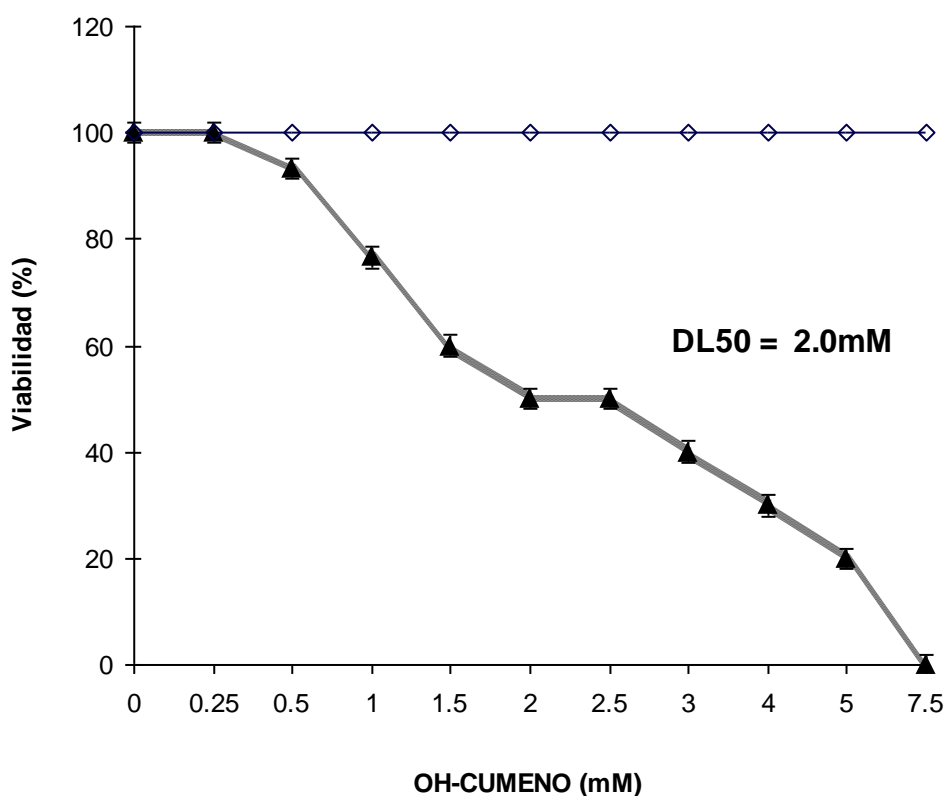


Figura 15. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) del hidróxido de cumeno en cisticercos de *T. crassiceps*. Los cisticercos fueron expuestos a diferentes concentraciones de Hidróxido de Cumeno por 30 minutos (triángulos). Parásitos incubados sin Hidróxido de cumeno fueron utilizados como controles (rombos). Los datos son el promedio \pm Desviación estándar (n=10).

VII. DISCUSIÓN

Se han realizado varios esfuerzos por erradicar a *T. solium*, por ejemplo se han puesto a prueba varias estrategias, desde el tratamiento masivo con fármacos, campañas de educación en salud hasta el desarrollo de vacunas. El principal problema radica en que este parásito se transmite debido a las condiciones insalubres de la vivienda rural y en la estrecha relación de los humanos con sus animales. Extendiéndose desde el traspatio hacia el medio urbano y a la ganadería tradicional hasta sitios remotos, debido a la progresiva y masiva migración³⁷, condiciones difíciles de cambiar en países subdesarrollados.

Como ya se había mencionado *T. solium* posee varios mecanismo de defensa que le permiten evitar su erradicación¹⁵. Uno de esto es el uso de las enzimas antioxidantes, como la PHGPX que evita el daño causado por las ERO.

El propósito de este trabajo fue clonar y caracterizar el ADNc de la PHGPX de *T. solium*. El primer paso fue el obtener un fragmento o sonda que codificará para una GPX. La cual se produjo mediante RT-PCR utilizando dos oligonucleótidos (GPX-L1E y GPX-L2E) diseñados a partir de secuencias conservadas de la enzima en distintos organismos. El fragmento obtenido de ADNc tuvo un tamaño de 210pb que era del tamaño que se esperaba (Fig. 9A). El análisis de la secuencia nucleotídica de este fragmento y su comparación con otras GPX's mostraron que este contenía motivos conservados presentes en varias GPX's (Fig. 9B).

Este fragmento fue utilizado como sonda para aislar 3 clonas que contenían un ADNc que codifica para la PHGPX de *T. solium* de una biblioteca el ADNc de *T. solium*. Los ADNc obtenidos de estas 3 clonas presentaron un tamaño similar de ~700 pb y un análisis de sus patrones de restricción con las enzimas Eco RI y Hind III, sugirieron que las clonas aisladas eran idénticas, lo que se comprobó al secuenciar dos de ellas (Fig.11).

El análisis de las clonas mostró que éstas codifican para una PHGPX. Los análisis de alineamiento y comparación de la secuencia nucleotídica y primaria con otras secuencias de GPx's depositadas en el banco de datos de GenBank, mostraron que la secuencia primaria presenta una secuencia de 863 pb lo que produce una proteína de 165 aminoácidos, con un peso molecular predictivo de 18,670 Da, lo cual difiere ligeramente del valor encontrado en la literatura que es de 20 kDa. De igual manera se identificó el codón de inicio y término de la transcripción, además de el sitio de poliadenilación, lo que sugiere que se logró aislar una clona completa. Asimismo, la secuencia contiene los sitios catalíticos característicos de la enzima como: (AFPCNQF y WNFTKFL) que contienen dos de los tres aminoácidos característicos para la actividad catalítica [glutamina (Q⁷¹), triptófano (W¹²⁹)] así como el aminoácido Seleniocisteína (SeC⁴⁰) en el sitio activo. Estudios realizados sugieren que la enzima aumenta la nucleofilicidad del selenol a través de las interacciones de puentes de hidrógeno con triptófano (W¹²⁹) y glutamina (Q⁷¹) y la α -hélice. La cadena lateral selenol se encuentra relativamente expuesta en la superficie de la proteína, próximo a un sitio de unión de él glutatión^{112, 113}. Todavía quedan muchas preguntas acerca del mecanismo de acción. Tales como la función que tiene otros aminoácidos que se encuentran en el sitio activo que aún no se han estudiado¹¹⁴. En estos sitios de catálisis se encontró una diferencia en el aminoácido 132, el cual es una glicina (G) en el caso de las PHGPX de ambas isoformas de *Clonorchis sinensis*, en la de *Homo sapiens*, *T. solium* y *Sus scrofa* presenta en su lugar es una treonina (T), y para la de *Schistosoma mansoni* e *Hydra vulgaris* es una serina (S). Lo cual puede influir en la interacción con el glutatión y su actividad¹¹³.

Se logró identificar la secuencia de inserción para el aminoácido Sec (SECIS) en la región 3 'no traducida de la secuencia nucleotídica característica de los mamíferos, que es vital para reconocer el codón de término (UGA) en la traducción de proteínas y que sirve para colocar la SeC en la secuencia primaria¹¹⁵.

Los análisis realizados con el programa PCGENE encontró la presencia de sitios putativos para la N- glicosilación dos de tipo N-X-S y otro de tipo N-X-T. Los

carbohidratos pueden enlazarse al átomo de nitrógeno amídico de la cadena lateral de la asparagina N-glicosilación o puede ser O-glicosilación (sobre residuos de serina o treonina). No obstante cuales de los sitios potenciales serán realmente glicosilados depende de varias variables, como de la estructura de la proteína, secuencia primaria y del tipo de célula en la que se expresa la enzima (PHGPX es considerada una glicoproteína)^{104, 105, 117}. Se ha observado que el tipo y grado de glicosilación influyen también en la antigenicidad de las moléculas reconocidos por linfocitos T¹¹⁵, así mismo se sabe que le confieren a la enzima una estructura estable (glicoproteína).

También se encontraron sitios putativos de fosforilación ASE³, GTQ⁴², STL¹¹⁷ y NSI¹²⁵. Los cuales promueve la hidrólisis de lípidos y regulan la actividad de la enzima estos se caracterizan por poseer un aminoácido de serina (S), Treonina (T) y Tirosina (Y)¹¹⁸. La encargada de transferir grupos fosfatos del ATP es la proteína cinasas fosforilando el aminoácido serina (S) o Treonina (T), estas serin/treocinasas participan en las vías de señalización de animales, plantas y hongos. El agregado del grupo fosfato a menudo cambia una proteína de una forma inactiva o una activa¹¹⁹. Esto sugiere que la enzima podría estar realizando otras funciones además de la de antioxidante y tal vez participe en vías de regulación refiriéndonos a su fosforilación, a severación que debe probarse en el futuro.

Por otro lado, en los alineamientos se observa que la secuencia obtenida tiene un porcentaje de identidad de 55% con sus hospederos lo que nos indica que a pesar de que existen regiones muy conservadas entre estas enzimas, también existen bloques de baja homología. Lo que sugiere que estos últimos podrían ser utilizados para producir epítopes antigénicos específicos de la enzima que podrían ser utilizados en la elaboración de vacunas evitando reacciones cruzadas con la enzima de su hospedero.

Los ensayos de exposición al oxidante, nos muestra que este parásito pierde su viabilidad a concentraciones por arriba de 2.5 mM, en donde se puede observar daños considerables tanto a nivel de movilidad, viabilidad e integridad de la membrana, Por otro lado, se encontró que la CL₅₀ de H-Cumeno para los

cisticercos de *T. crassiceps in vitro* es de 2.0mM. Esta concentración elevada esta fuera de los límites fisiológicos (10^{-10} M/ min), por ejemplo las moléculas oxidante generadas por la respuesta inmune alcanzan concentraciones nanomolares a micromolares, las cuales son inofensivas para *T. crassiceps*, lo que podría explicar la gran resistencia de estos parásitos a la respuesta inmune y a la permanencia en el tiempo dentro de sus hospederos.

El conocimiento de que *T. solium* posee la enzima PHGPX, la cual es una enzima desintoxicante de lípidos peroxidados a pesar de que estos se integren en la membrana celular, inactivándolos y evitar la producción de más ERO, su participación en la espermatogénesis, en la que realiza un papel estructural y de defensa ^{95,96,97,98}. Por esta razón ha sido considerada la principal línea de defensa enzimática, no solo en helmintos sino en varios organismos y por lo mismo ha sido propuesto como blanco para desarrollar vacunas o fármacos. La pérdida de la función de la enzima no solo afectaría la capacidad de defenderse del parásito sino también por consiguiente un daño irreversible en la reproducción de éste. Lo antes mencionado junto con la importancia que tiene estudiar la composición y función de las regiones estructurales y regulatorias de los genes involucrados en procesos como protección, reproducción, crecimiento y viabilidad ayudará para entender como éstos se establecen en sus hospederos y al mismo tiempo como establecer estrategias para erradicar a los helmintos parásitos como *T. solium*.

Finalmente, cabe mencionar que este es el primer gen que se caracteriza de un ténido que codifica para una selenio proteína.

IX. CONCLUSIONES

- El ADNc identificado codifica para una PHGPX.
- El ADNc identificado tiene un tamaño de 863 pb y codifica para una PHGPX de 165 aminoácidos, con un peso molecular predictivo de 18.670 KDa.
- La estructura primaria de la PHGPX muestra características semejantes a las PHGPX de otros mamíferos.
- Cisticercos de *T. crassiceps* tienen una DL_{50} para el hidróxido cumeno de 2Mm.

Los resultados de este trabajo abren camino para investigar varios aspectos de la enzima como ver su papel en reproducción, debido a que esta enzima tiene un rol protector en el proceso de espermatogénesis, muy importante para los helmintos parásitos. Así como para estudiar el proceso de la transcripción de las Selenio proteínas en este parásito.

X.ANEXO

Amortiguador de lisis

Tris	50 mM
EDTA	0.1 mM
Sarcosil	0.5 %
Ajustar a pH 8 y aforar a un litro	

Amortiguador salino de fosfatos (PBS 10X)

NaCl	137 mM	80.0 g
KCl	2.7 mM	2.0 g
Na ₂ PO ₄ 7H ₂ O	4.3 mM	11.5 g
Ajustar a pH 7.4 y aforar a un litro		

Amortiguador salino de fosfatos pH 7.8

K ₂ HPO ₄	50 mM	6.80 g
Ajustar a pH 7.8 y aforar a un litro		

Medio de cultivo Luria Betani (LB)

NaCl	5.8 g	
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.0 g	
Tris-HCl pH 7.5	1 M	50.0 mL
Gelatina al 2%	5.0 mL	

Todos los componentes del medio se diluyen y aforan a 1 L con agua desionizada. El pH del medio se ajusta a 7.0 y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 15Lb de presión en ciclo líquido.

Medio RPMI

Estreptomicina	0.1%	500 µL
Ampicilina	0.1%	500 µL
Aminoácidos esenciales		500 µL

Medio LB

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Aforar a 1 litro

TE

Tris 10 mM
EDTA 1 mM

Solución 1

Glucosa 50 mM
EDTA 10 mM
Tris 25 mM
Ajustar pH 8 y aforar a un litro

Solución 2

NaOH 0.2 mM
SDS 1.0 %
Aforar a un litro

Solución 3

NH₄Ac 7.5 M
Aforar a un litro

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 desnaturalizante: NaOH 0.5 M, NaCl 1.5M

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

XI. REFERENCIAS

1. Sarti E, Flisser A, Schantz P, Gleizer M, Loya M, Plancarte A et al. Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:127-132.
2. Sarti E. Epidemiología de la teniosis/cisticercosis. En: Flisser A, Malagón F, Cisticercosis humana y porcina. Ed Limusa, Noriega México, D.F. 1989: 233-241.
3. Eddi C, Nari A, Amanfu W. Veterinary Public health activities At FAO activites, FAO support possibilites. *Act Tropo*. 2003: 87:145-148.
4. De Giorgio C, Pietsch-Escueta S, Tsang V, Corral-Leyva G, Ng L, Medina MT, Astudillo S, Padilla N, Leyva P, Martinez L, Noh J, Levine M, del Villaseñor R, Sorvillo F. Seroprevalence of *Taenia solium* Cysticercosis and *Taenia solium* Taeniasis in California USA. *Act Neurological Scandinavian* 2005; 111: 84-88.
5. White A.C.Jr, Neurocysticercosis updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management, *Annu.Rev.Med.* (2000); 51 187-206.
6. Del Brutto OH, Sotelo J. Etiopatogenia de la cisticercosis. *Rev. Ecuat. Neurol.* 1993; 2:22-32.
7. Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the marn cause of late- anset epilepsy in México. *Arch Intern Med.* 1990; 150:323.
8. Del brutto O, Noboa C. Late Honest epilepsy in Ecuador: an etiology and Clinical features in 225 patients. *J Trop Geo Neurol* 1991; 1:31-34.
9. Garcia HH, Gillman R, Martinez M, Tsang VC, Pilcher JB, Herrera G, Díaz F, Alvarado M, Miranda E, Cysticercosis as major cause of epilepsy in Perú. *Lancet.* 1993; 197-200.
10. Jiménez-Marcial, M. E. y L. Velázquez) Morbilidad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía 'Manuel Velasco Suárez', *Gaceta Médica de México.* 2004; 1995- 2001 140(2):155-162.
11. Sciutto, E., G. Fragoso, A. Fleury, J. P. Lacleste, J. Sotelo, A. S. de Aluja, L.Vargas, C. Larralde. "Taenia solium disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions", *Microbes and Infection* 2000; 2(15):1875-1890.
12. Vega, R., D. Piñero, B. Ramanankandrasana, M. Dumas, B. Bouteille, A. Fleury, E. Sciutto, C. Larralde y G. Fragoso "Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology", *International Journal of Parasitology* 2003; 33(13):1479-1485.

- 13.** Rabiela-Cervantes, M. T., A. Rivas, J. Rodríguez, S. Castillo, F. Cancino), en A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán (comps.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, Nueva York, 1982 pp. 179-200.
- 14.** Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govenzensky T et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114:926-928.
- 15.** Eckert J. Interactions between cestodes and their vertebrate host. In: *Parasite-Host Associations, coexistence or conflict?* (eds. Toft, C., Aeschlimann, A., and Bolis), 1991; pp201-227 Oxford University Press, London
- 16.** Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology* 1992; 148:124-128.
- 17.** Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller, Shoemaker CB. cDNA Cloning and recombinant expression of collagen binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60: 343-7.
- 18.** Plancarte, Flisser A, Larralde C. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium* *Cytobios*. 1983; 36:83-93.
- 19.** Alvarez JI, Rivera J, Teale JM, Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e218.
- 20.** Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgoni U, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL, A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+T-cells, *Parasitol Res*. 2004; 92:197-204.
- 21.** Baigs S, Damian RT, Molinari JL, Tato P, Morales-Montor J, Welch M, Talhouk J, Hashmeys R, White AC Jr. Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG. *Parasitology* 2005; 131:411-6.
- 22.** Baz A, Carol H, Casabó L, Jones F, Dunne D, Nieto A. Fc-binding molecules specific for human IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite Immunol*. 1998; 20:399-404.
- 23.** Kalinna B, Mc Manus DP. An IgG (Fcγ)-binding protein of *Taenia crassiceps* (cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with *Schistosoma* paramyosin. *Parasitology* 1993; 106:289-296.
- 24.** Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*. 1998; 201: 1203-1209.

- 25.** Rice-Evans C. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological state. In: *Free radical damage and its control*. Rice-Evans C., Khan R (eds) 1994; pp-131-153 Elsevier Sci. London
- 26.** Brophy P.M, Pritchard D. Immunity to helminthes: ready to tip the biochemical balance? *Parasitol Today*. 1992. 8: 419-422.
- 27.** Vaca-Panniagua F, Torres A, Parra-Unda R, Landa A. *Taenia solium* antioxidante metabolismo enzymes as targets for cestocidal drug and vaccines. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 393-399.
- 28.** Jerlick A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(5):673-82.
- 29.** Reylli PM, Burkley GB. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 1990; 77:1324-5.
- 30.** Anzola, H. Algunas Descripciones de la Actividad Biológica y Fisiológica del Selenio. *Acovez* 1999; 24 (2):17-20.
- 31.** Hoekstra, W. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Feder. Procc.* 1975; 34 (11):2083-9.
- 32.** Flisser A. "Taenia solium, Taenia saginata and Hymenolepis nana". In: *Enteric Infection 2. Intestinal Helminths*. Farthing MJG, Keusch GT, Wakelin D, (eds), Chapman & Hall Medical, London, 1995; ISBN 0412391406, p 173-189.
- 33.** Schmidt G.D, Roberts .L.S, *Cestoidea: form, function, and classification of the tapeworms: foundations of parasitology* 6ª ed, M.Hill, USA. 2000;
- 34.** Silverman, PH. Studies on the biology of sometapeeworms of the genus *Taenia*,II. The morfology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propogation of gravid segments.*Annals of tropical Medicine an Parasitology*. 1954 48:356-66.
- 35.** Flisser A, Malagon F (eds). *Cisticercosis Humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega CONAyT. 1989.
- 36.** Laclette J. P, Y. Ornelas, M. T.Merchant y K.Willms (1982), "Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs", en A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltran (comps.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, Nueva York, pp. 375-388.
- 37.** Larralde C, Aluja A S. DE, Willms K, Vargas-Parada L, Laclette J. P. (coords). *Biología del parasito .Guía para profesionales de la Salud*. México DF: Fondo de Cultura Económica, 2006.

- 38.** J., W.K.S., *Cestodes. Principles and Practice of parasitology*. Ed. J. W.a.S. Ltd. 2001.
- 39.** Rabiela MT, Hornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del Rosal E, Flisser A. *evagination of taenia solium cysticerci: a histologic and electron microscopy study*. Arch Med Res., 2000 31:605-7.
- 40.** Vargas-Parada, L., M. T.Merchant, K.Willms y J. P. Laclette (1999), "Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium cysticerci*", *Parasitology Research* 85(2):88-92.
- 41.** Flisser A, Madrazo I, Delgado H, *Cisticercosis Humana. Manual Moderno*. México, D.F. 1997, 5-64.
- 42.** 7. Acha P, Szyfres B. 2003. *Zoonosis y enfermedades transmisibles, comunes al hombre y a los animales. Volumen III. 3ra edición*. Organización Panamericana de la Salud. *Publicación Técnica y Científica N° 580*.
- 43.** Pal, D.K., Carpio, A. & Sander, J.W.A.S. *Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries*. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* (2000) 68, 137–143.
- 44.** Garcia H.H., E.J. Pretell, R.H. Gilman, S.M. Martinez, L.H. Moulton, O.H. Del Brutto, G. Herrera, C.A. Evans, A.E., Gonzalez and Cysticercosis Working Group in Peru, *A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis*, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004), pp. 249–258.
- 45.** Sarti E. *La taeniasis y cisticercosis en México (revisión bibliográfica)*. *Salud Pública Mex* 1986; 28:556-563.
- 46.** Sotelo J, Del Brutto OH. *Brain cisticercosis*. Arch Med Res. 2000; 31:3-14.
- 47.** Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P, *Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas*. *Acta trop.* 2003; 87:43-51.
- 48.** Subahar R, Hamid A, Purba W, Wandra T, Karma C, Sako Y, Margono SS, Craig PS, Ito A. *Taenia solium infection in Irian Jaya (West Papua), Indonesia: a pilot serological survey of human and porcine cysticercosis in Jayawijaya district* *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001; 95:388-90.
- 49.** Li T, Craig PS, Ito A, Chen X, Qiu D, Qiu J, Sato MO, Wandra T, Bradshaw H, Li L, Yang Y, Wang Q, *Taeniasis/cisticercosis in a Tibetan population in Sichuan Province, China*. *Acta Trop.* 2006; 100:223-31.
- 50.** Praet N, Speybroeck N, Manzanedo R, Berkvens D, Nsame Nforinwe D, Zoli A, Quet F, Preux PM, Carabin H, Geerts S. *The Disease Burden of Taenia solium Cysticercosis in Cameroon*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3:e406.

- 51.** Goodman, K., Ballagh, S.A. and Carpio, A. Case control study of seropositivity for cysticercosis in Cuenca, Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, 60: 70-74.
- 52.** Correa MD, Flisser-Steinbruch A, Sarti-Gutiérrez E. Teniasis y cisticercosis. En: Valdespino-Gómez JL, Del Río-Zolezzi A, Velasco-Castrejón D, Escobar A, Ibáñez-Bernal S, Magos-López E, ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México, D.F.: Secretaría de Salud, 1994;(8):335-345.
- 53.** SSA México: www.degepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem41/pdf/edit4107.
- 54.** Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Boletín epidemiológico* 2000; 52(17):16.
- 55.** García, H. H.; R. H. Gilman; A. E. González; M. Verástegui; S. Rodríguez; C. Gavidia; V. C. Tsang; N. Falcón; A. G. Lescano; L. H. Moulton; T. Bernal y M. Tovar. Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003; 68(3): 268-75 p.
- 56.** Schantz P. *T. solium* cysticercosis: an overview of global distribution and transmission. En: Singh G, Prabhakar S eds. *Taenia solium* cysticercosis: From basics to clinical science. India. CABI Publishing 2002; 63-73.
- 57.** García-García M, Torres M, Correa D, Flisser A, Sosa A, Velasco O, Meza A, Plancarte A, Avila G. Prevalence and risk of cysticercosis and taeniasis in an urban population of soldiers and their relatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 61(3): 386–389.
- 58.** Tay zavalá J,(ed) 1992. *Microbiología y Parasitología médicas*. Méndez editores. México 2003; 541-542.
- 59.** Adamolekun, A., Carpio, A. and Carvalho-Filho, F. Relationship between epilepsy and tropical diseases. *Epilepsia*, 1994, 35: 89-93.
- 60.** Carpio, A. and Hauser, W.A. Manifestaciones clínicas: cisticercosis cerebral infantil. In: T. Alarcón (Ed.), *Cisticercosis del Sistema Nervioso Central*. Abad Cia, Guayaquil, 1999: 107- 131.
- 61.** Schantz P, Sarti E. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden* 1989; 57: 153-163.
- 62.** García H, Saavedra H, Pretell J, Bustos J, Rodríguez S, Verástegui M, González A, Porras M, Alvarado M, Martínez M. Problemas clínicos en neurología diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis. *Revista Peruana de Neurología* 2007; 10: 23-26.
- 63.** Allan J, Wilkins P, Tsang V, Craig P, "Inmunodiagnostic tools for taeniasis" *Acta Tropica*.2003; 87:87-93.

- 64.** Ferrer E. *Teniasis/Cisticercosis: del diagnóstico convencional al diagnóstico molecular. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo* 2007; 11(1): 57-61.
- 65.** Rodriguez Hidalgo, Geysen D, Benítez Ortiz W, Geerts S, Brandt J. *Comparison of conventional techniques to differentiate between Taenia solium and Taenia saginata and improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA. J. Parasitol.* 2002; 88:1007-1011.
- 66.** Atias A. *Cisticercosis. En: Atias A, eds. Parasitología médica Editorial Mediterráneo Chile.* 1998. p 355-358.
- 67.** Diop, A.G., de Boer, H.M., Mandlhate, C., Prilipko, L. and Meinardí, H. *The global campaigning against epilepsy in África. Acta Trop.* 2003; 87:149-159.
- 68.** Tsang V, García H. *Inmunoblot diagnostic test (EITB) for Taenia solium cysticercosis and its contribution to the definition of this under-recognized but serious public health problem. En: García H, Martínez S, eds. Taeniasis/Cysticercosis by Taenia solium. Section III. 2nd edition. Perú. Editorial Universo* 1999; 245-254.
- 69.** Sartí. E. *La taeniosis y cisticercosis. Por Taenia solium. Salud Pública México.* 1997; 39:3,225-231.
- 70.** Lacey, E. 1988. *The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. Int. J. Parasitol.* 18 (7): 805-893.
- 71.** Prichard, R. K. 1973. *The fumarate reductase reaction of Haemonchus contortus and the mode of action of some anthelmintics. Int. J. Parasitol.* 3: 409-417.
- 72.** Sotelo. J, Escobedo. F, Penagos. P. *Albendazole vs praziquantel Therapy of neurocysticercosis a controlled trial. Arch Neurol.* 1988; 45:1130-1133.
- 73.** Halliwell B, J.W. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free Radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? J Lab Clin Med,* 1992; 119(6):598-620.
- 74.** Klion, A, Nutman, T.B. *Immunity to parasitic worms. Encyclopedia of life Sciences,* 2002:5-8.
- 75.** Cross A.R. and O.T. Jones, *Enzymic mechanisms of superoxide production. Biochim Brophys. Acta,* 199; 1057(3): 281-98.
- 76.** Southorn, P.A. and G. Powis *Free radicals in Medicine II .Involvement in human disease, Mayo Clin Proc.* 1988 63(4): 390-408.
- 77.** Southorn, P.A. and G. Powis *Free radicals in Medicine I .Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc.* 1988 63(4): 381-9.

- 78.** Cheeseman, K H, and T.F. Slater, *An Introduction to free radical biochemistry. Br, Med Bull.* 1993.
- 79.** Fridovich I, *Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys,* 1986. 247 (1) p1-11.
- 80.** Nathan C, Xien QW. *Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem* 1994; 269(19): 13725-13728.
- 81.** Wallace DA. *Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington´s disease. Journal of Neuroscience Research* 2001; 64: 99-107.
- 82.** Chihuailaf, R.H.;Contreras,P.A.;Wittwer,F.G.Patogénesis del estrés Oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal *Veterinaria México* 2002. Volumen 33 Número 3.
- 83.** Parra Unda Jesús Ricardo. *Variación de la expresión del gen para la superóxido dismutasa Cu/Zn de taenia crassiceps bajo condiciones de estrés oxidativo. México: Posgrado en Ciencias Biológicas C.U., Facultad de Medicina,* 2006: 13-19.
- 84.** Betteridge J. *What is de Oxidative Stress?. Metabolism* 2000; 49 (2) S1: 3-8. 78.
- 85.** Fang YZ, Yang S, Wu G. *Free radicals, antioxidants and Nutrition. Nutrition* 2002; 18(10): 872-9.
- 86.** Callahan, H. L., R. K. Crouch, and E. R. James.. *Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? Parasitol. Today* 1988; 4:218–225.
- 87.** James, S. 1991. *The effector functions of nitrogen oxides in host defense against parasite. Exp. Parasitol.* 73:223–226.
- 88.** Gleich, G. J., and C. R. Adolphson. *The eosinophilic leukocyte: structure and function. Adv. Immunol.* 39:177–253. Gleich, G. J., and C. R. Adolphson. 1980. *The eosinophilic leukocyte: structure and function. Adv. Immunol.* 1980 39:177–253.
- 89.** Chance B, Sies H, Boveris A. *Hydroperoxide metabolism in mammalian Organs. Physiol Rev* 1979; 59(3): 527-605.
- 90.** Ursini F, Bindoli A. *The role of selenumperoxidases in the protection against oxidative damage of membranes. Chem Phya Lipids* 1987; 44(2-4): 225-276.
- 91.** Halliwell B. *Antioxidants in Human Health and Disease. Annual Review Nutrition* 1996; 16: 33.50.
- 92.** McCord JM. *The evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. Am J Med* 2000; 108: 652-659.

- 93.** Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany* 91:179-194.
- 94.** Venereo, G.J.R. Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002; 31(2):126-33.
- 95.** Cárdenas, R.N., Pedraza, C.J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química* 2006; 17(2):164-173.
- 96.** Verma A and Kanwar K.C. 1999. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl*; 1: 151-154.
- 97.** Kirchoff C. Molecular characterization of epididymal proteins *Reviews of Reproduction* 1998; 3: 86 – 95.
- 98.** Marin-Guzman J; Mahan D. C and Pate J. L. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J. Anim.Sci.* 2000; 78:1537–1543.
- 99.** Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A. Subcellular distribution of seleno proteins in the liver of rat. *Biochem Biophys Acta* 1990; 26(3):219-25.
- 100.** Pascual P, Martínez Lara E, Barcena JA, López Barea J, Toribio F. Direct assay of glutathione peroxidase activity using high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr* 1992; 581(1):49-56.
- 101.** Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakarawa Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1998; 273(4). 1990-1997.
- 102.** Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW y Behne D (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 15:1236-1238.
- 103.** Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D and Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J* 1998; 332: 251-255.
- 104.** Avissar N, Slemmon JR, Palmer IS. Partial sequence of human plasma GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme. *J Nutr* 1992; 12(6):1243-9.
- 105.** Dr. Elio Cisneros Prego, Dra. Judith Pupo Balboa y Dra. Ela Céspedes Miranda Stepanik TM, Ewing DD. Isolation of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase of human erythrocytes. *J Biochem Biophys Meth* 1993; 20:157-69.

- 106.** Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto C, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA. *J Biochem (Tokyo)* 1990; 108(2):145-8.
- 107.** Pigeolet E, Remacle J. Alteration of enzymes in ageing human fibroblast in culture V. Mechanism of GPx modification. *Mech Ageing Dev* 1991; 58(1):93-109.
- 108.** Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG y Ben-Hayyim G (2002). A selenoprotein in the plant kingdom: Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 277:25983-25991.
- 109.** Mates JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8): 595-603.
- 110.** Sies H, Sharov VS, Klots LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27812-27817.
- 111.** Tamer M. S; Ashok A; Rakesh K. Sharma, Anthony J. Thomas, Jr and Suresh C. Sikka. 2005. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate Fertility and Sterility. 83:95–103
- 112.** B. Ren, W. Huang, B. Mkesson, R. Ladenstein, *J. Mol. Biol.* 1997, 268, 869.
- 113.** O. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel, *Eur. J. Biochem.* 1983, 133, 51.
- 114.** Wendel, A. in *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jakoby, W. B., ed Academic Press, New York. 198; Vol. 1, pp. 333–353,
- 115.** Takaharu Mizutani, Toshinobu Fujiwara. SBP, SECIS binding protein, binds to the RNA fragment upstream of the Sec UGA codon in glutathione peroxidase mRNA. *Molecular Biology Reports* 2000; 27: 99–105.
- 116.** Mouritsen S, Meldal M, Christiansen-Brams I, Elsner H, Werdelin O. Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity. *Eur J Immunol* 1994; 24:1066-1072.
- 117.** Jeremy MB, Lubert S, John T. *Biochemistry*. 2007, Ed Reverte S.A.p 315-320
- 118.** David L. Nelson, Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2000, third edition. Ed. Wort. Cap. 5.
- 119.** Neil A. Campbell Jane B. Reece. *Biología*. Edición 6ª. Ed. Panamericana. 2000; 208-210.