



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización molecular de un  
ADN complementario (ADNc) que codifica  
para la Glioxalasa-II de *Taenia solium*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

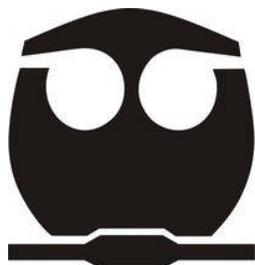
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARELI

AGAMA

SARABIA



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

**VOCAL:** Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

**SECRETARIO:** Profesor: ABRAHAM LANDA PIEDRA

**1er. SUPLENTE:** Profesora: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

**2do. SUPLENTE:** Profesor: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ

**LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE *Taenia solium* FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

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

**SUSTENTANTE:** ARELI AGAMA SARABIA  
(Nombre y firma)

## DEDICATORIA

Si puedes imaginarlo, lo puedes lograr.  
Si lo puedes soñar, lo puedes llegar a ser.

William Arthur Ward.

Dedico esta tesis a mis padres Néstor y Alejandra, porque juntos lo imaginamos, juntos lo soñamos y ahora juntos lo estamos logrando.

Este gran logro es por ustedes y para ustedes. Los amo.

## AGRADECIMIENTOS

“Tener gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo”.

William Arthur Ward.

Principalmente quiero agradecerte a ti Dios por darme la fortaleza y sabiduría para culminar uno de los logros más importantes de mi vida, pero sobre todo gracias por rodearme de personas extraordinarias como las que has puesto en mi camino a lo largo de mi vida. ¡GRACIAS!

A mis padres Néstor Agama y Alejandra Sarabia, no tengo palabras para agradecerles cada uno de sus consejos, esfuerzos y sacrificios, simplemente quiero que sepan que estoy inmensamente orgullosa de ser su hija y por siempre agradecida de haber hecho de mí la mujer que soy.

A mi hermano Adiel, porque siempre has sido mi ejemplo de lo que debo y no debo de hacer jejeje, he aprendido mucho de ti y sé que puedo cumplir todas mis metas siempre y cuando me esfuerce por ellas.

A mi hermanita Liz, que has sido una bendición en nuestras vidas y has venido a llenarnos de alegría, gracias por confiar en mí y desvelarte conmigo platicándome tus aventuras adolescentes jejeje.

Te agradezco a ti Rod por siempre escucharme, alentarme y ayudarme, por compartir momentos inolvidables pero sobre todo por ser mi mejor amigo y acompañarme en toda esta trayectoria.

Agradezco a mis amigas Eri, Zuzy y Sarita, que juntas comenzamos esta aventura desde la ENP 2, gracias por sus consejos, por tan buenos momentos vividos y porque nuestra amistad ha perdurado a pesar de los años. Eri eres mi ángel. Zuzy eres como una hermana y Sarita eres una gran amiga. Gracias por todo.

Mil gracias a mis amigos y amigas hechos en CU porque ustedes siempre han estado conmigo en las buenas, en las malas y en las peores y eso no tiene palabras: Rodrigo, Rafael, Gabriel, Guillermo, Giovanni, Miriam, Angélica, Narda y Noelia,

muchas gracias por su apoyo incondicional, por todos los buenos momentos y su buen sentido del humor.

Un agradecimiento especial para mi amiga GLO I que me ha acompañado en todo momento, en cada paso feliz y en cada tropiezo, por vivir conmigo cosas que sólo nos pasan a nosotras. Mil gracias.

Agradezco profundamente a mi director de tesis el Dr. Abraham Landa Piedra por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio, así como a su gran equipo de trabajo que siempre me apoyaron y ayudaron en todo momento, Dra. Lucía Jiménez García y a la M. en C. Alicia Ochoa Sánchez.

Muchas gracias al gran equipo Landa, que siempre nos ayudaron y explicaron, gracias por su buen humor, sus tips y consejos, Dr. Ricardo, Dr. Víctor, próximos M. en C. Oscar, Aramis, Vera, y Magda, y a las próximas Q.F.B's Yanet, Sandra, Vera.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 80134-M que corresponde al proyecto “Desarrollo de fármacos biológicos contra *Taenia solium*”.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b>	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	4
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	7
<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>1. RESUMEN</b>	10
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	11
2.1 <i>Taenia solium</i>	11
2.1.1 Agente etiológico	11
2.1.2 Ciclo biológico	13
2.2 Teniosis causada por <i>Taenia solium</i>	14
2.2.1 Epidemiología	15
2.2.2 Cuadro clínico	15
2.2.3 Diagnóstico	15
2.2.4 Tratamiento	16
2.3 Cisticercosis por <i>Taenia solium</i>	17
2.3.1 El cisticerco	17
2.3.2 Cisticercosis humana	17
2.3.2.1 Epidemiología	17
2.3.2.2 Cuadro clínico	18
2.3.2.3 Diagnóstico	19
2.3.2.4 Tratamiento	21
2.4 Sistema de las glioxalasa	22
2.4.1 Generalidades	22
2.4.2 Características de la enzima Glioxalasa II	22
<b>3. HIPÓTESIS</b>	24
<b>4. OBJETIVOS</b>	
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25

<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1 Material biológico	26
5.2 Producción de la sonda por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	26
5.3 Purificación de la sonda de ADNc	26
5.4 Marcaje de la sonda	27
5.5 Titulación de la biblioteca $\lambda$ gt10	27
5.6 Tamizaje de la sonda	28
5.7 Obtención de lisado de fagos (PLATE STOCK)	29
5.8 Digestión con enzimas de restricción	30
5.9 PCR de ADN de fagos	30
5.10 Ligación	30
5.11 Efectos del metilglioxal en cisticercos	31
<b>6. RESULTADOS</b>	32
<b>7. DISCUSIÓN</b>	38
<b>8. CONCLUSIONES</b>	41
<b>9. ANEXO</b>	42
<b>10. REFERENCIAS</b>	43

## ABREVIATURAS

<b>2X</b>	Dos veces la concentración.
<b>5X</b>	Cinco veces la concentración.
<b>°C</b>	Grados Celsius.
<b>aa</b>	Aminoácidos.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético.
<b>h</b>	Horas.
<b>kDa</b>	Kilo Daltones.
<b>min</b>	Minutos.
<b>NCC</b>	Neurocisticercosis.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PEG</b>	Polietilenglicol.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio.
<b>seg</b>	Segundos.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.
<b>V</b>	Voltios.

## 1. RESUMEN

*Taenia solium* es el agente etiológico de la teniasis y cisticercosis, siendo la neurocisticercosis la forma letal producida por la larva, dichas enfermedades representan un problema de salud pública en países subdesarrollados como lo es México, ya que no existe un gran desarrollo de infraestructura de salud en estos países.

Debido a su amplia distribución mundial e infectividad de este parásito, el estudio sobre *Taenia solium* se basa en la posibilidad de romper el ciclo biológico de este parásito para lograr erradicar la problemática de salud y las pérdidas económicas que producen estas enfermedades. Una estrategia viable se basa en la posibilidad de inhibir enzimas que son importantes en el metabolismo de este parásito y que forman parte de su sistema de desintoxicación, entre estas enzimas se encuentran las glioxalosas I y II. Ambas conforman al sistema de glioxalosas que se encarga de desintoxicar a la célula de una sustancia tóxica llamada metilglioxal (MGO). La importancia de este sistema radica en que esta vía de desintoxicación protege contra el daño celular causado por oxoaldehídos altamente reactivos, como el metilglioxal producto del metabolismo de la vía de la glucólisis.

Conocido lo anterior este trabajo tuvo como primer paso encontrar una clona en una biblioteca de ADNc por medio de tamizajes, una vez encontrada el segundo paso fue la purificación, clonación y caracterización de la enzima GLO-II de *Taenia solium*. Obteniendo como resultado la secuencia compuesta de 962 nucleótidos, con un marco de lectura abierto que comienza en el nucleótido 64. El ADNc codifica para una proteína de 251 aminoácidos.

Así mismo se probaron varias dosis de MGO a diferentes tiempos en cisticercos de *Taenia crassiceps* para valorar el daño que causa este tóxico, y conocer a qué dosis se produce el mayor daño y posteriormente la muerte.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1 *Taenia solium***

#### **2.1.1 AGENTE ETIOLÓGICO.**

Clasificación taxonómica. [9,21]

Reino: Animalia

*Phylum: Platyhelminths*

Clase: Céstoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia solium*

Especie: *Taenia solium*

Su ciclo de vida comprende tres estadios: huevo, larva y adulto.

*Taenia solium* es un parásito que pertenece a la clase de los cestodos o gusanos acintados, que se caracterizan por ser planos dorsoventralmente, puede dividirse de forma general en tres regiones: escólex, cuello y estróbilo.

En su cabeza o escólex (Figura 1), posee una doble corona de ganchos, además de cuatro ventosas en forma de copa, debido a que es un órgano de fijación con el cual se adhiere a la mucosa intestinal de su hospedero definitivo. [16, 26, 31]

Después del escólex sigue el cuello, que es la zona no segmentada del cuerpo del parásito, es metabólicamente activo y contiene células madre que originan los segmentos individuales del parásito que se conocen como proglótidos los cuales conforman el cuerpo del parásito; estos se clasifican en inmaduros, maduros y grávidos, se localizan según su estado de madurez reproductiva; los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados mientras que los proglótidos maduros son hermafroditas, es decir, poseen órganos genitales masculinos y

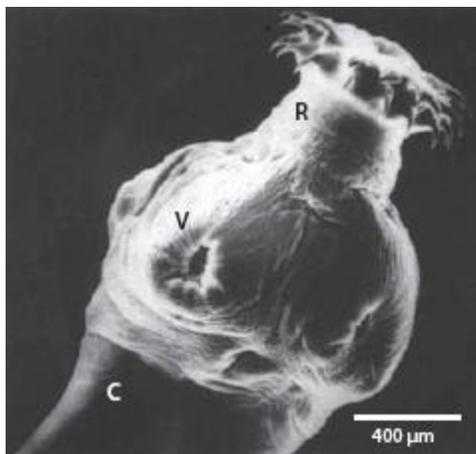
femeninos, los proglótidos grávidos contienen miles de huevos en su útero, pueden contener hasta 50,000 huevos cada uno. Cada huevo es esférico de color café, no son diferenciables de los de *Taenia saginata* y mide entre 31 a 43µm de diámetro, poseen una pared gruesa y radiada llamada embrióforo provista de una membrana delgada hialina, dentro de la membrana se encuentra la oncósfera o embrión hexacanto (seis ganchos), la cual es la forma infectante. [32, 33]

La cadena de proglótidos se conoce como estróbilo. Su tamaño varía según el número de segmentos que conformen al estróbilo. [7, 9, 17, 26, 32].

En su cubierta externa del estróbilo se lleva a cabo una intensa actividad metabólica ya que se absorben los nutrientes por difusión o transporte activo, debido a que como cualquier otro cestodo carece de aparato digestivo, esto se lleva a cabo por un tejido llamado tegumento, el cual está conformado por una capa externa cubierta de microvellosidades llamadas microtricas que aumentan el área de absorción. [16]

El espacio que limita el tegumento se denomina parénquima, un tejido fibroso que sirve de sostén al parásito, además es el centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno, principal sustrato energético; también se encuentran los aparatos reproductor y excretor así como las fibras musculares, que dividen en dos zonas el parénquima: cortical y medular. [16]

A)



B)



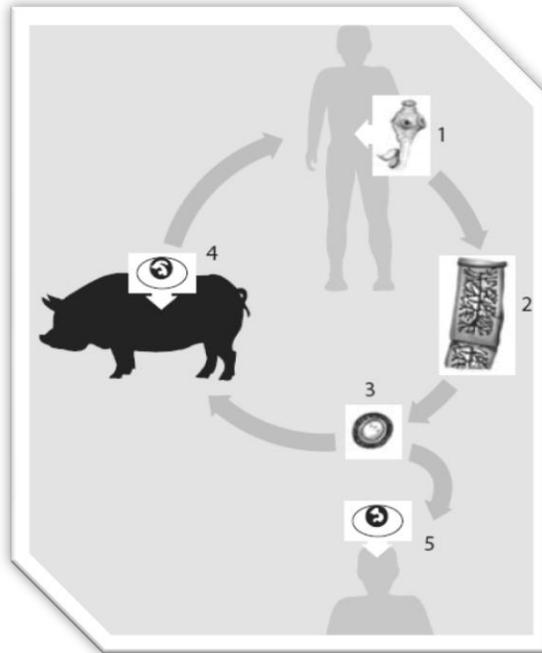
**Figura 1.** Micrografía electrónica del escólex del parásito adulto de A) *Taenia solium* y B) *Taenia saginata* donde puede observarse el róstelo (R), ventosas (V) y el cuello (C). [16]

### 2.4.3 CICLO BIOLÓGICO.

Su ciclo requiere de dos huéspedes para que se lleve a cabo: el hombre (hospedero definitivo del adulto y hospedero accidental de la larva) y el cerdo (hospedero intermedio de la larva). [4, 16, 33]

Su ciclo biológico se inicia cuando los proglótidos grávidos se desprenden del extremo distal de la *Taenia* y salen del intestino delgado del hombre en sus heces fecales liberando huevos en el medio ambiente, los cuales son viables durante largo tiempo y pueden ser ingeridas por los cerdos en lugares donde la higiene es inadecuada, una vez ingeridas, en el estómago por el efecto de la digestión (enzimas digestivas) los huevos pierden su cubierta y se liberan las oncosferas, que penetran en la mucosa y entran a torrente sanguíneo donde son transportados a los tejidos del cerdo, músculo estriado principalmente y cerebro, ahí se enquistan como metacéstodos (*Cysticercus cellulosae*) [9, 32, 37].

Una vez que el hombre consume carne de cerdo contaminada con cisticercos, en el estómago la larva es liberada ya que por acción de enzimas proteolíticas y sales biliares pierden su cubierta, entonces evaginan (sacan la cabeza o escólex) y se adhiere gracias a sus órganos de fijación a la porción superior del intestino delgado, en donde evolucionará al estadio adulto, generalmente sólo existe uno, de ahí el nombre común de “solitaria”, estas tenias se desarrollan hasta alcanzar de 2 a 8 m de longitud y pueden sobrevivir de 10 a 20 años. [4, 21, 33]



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Taenia solium*. (1) El ser humano infectado con una tenia (2) elimina con las heces los proglótidos o huevos maduros al ambiente, donde el suelo, aire, agua y materia vegetal se contamina con las heces. (3) Los huevos embrionados son ingeridos por un cerdo, (4) en su intestino eclosiona la oncosfera y penetra la mucosa, ingresan a la circulación y migran al músculo esquelético para enquistarse (cisticerco), en donde es ingerido por el hombre, el escólex evagina y se adhiere a la mucosa del intestino. [17, 38]

## 2.2 TENIOSIS.

Es la parasitosis producida por los helmintos de la familia *Taeniidae* en su forma adulta, las especies son *Taenia solium* y *Taenia saginata*, cuyo hospedero definitivo es el hombre. [37]

Esta infección es conocida desde la antigüedad, a comienzos del siglo XIV, Arnau de Vilanova fue el primero en hacer una descripción de la especie. [7]

La forma de transmisión es debida al bajo nivel socioeconómico de los individuos e inadecuada higiene y se ocasiona por la ingesta de carne de cerdo mal cocida o cruda con la forma larvaria del parásito (cisticerco), lo que provoca la infestación del intestino delgado del humano por la forma adulta, hay que tener en cuenta que la

teniosis por *Taenia solium* es producida por alimentos de ganado porcino, y que además se puede adquirir cisticercosis por autoinfección. [4, 31, 32, 37]

### 2.2.2 EPIDEMIOLOGÍA

Según estadísticas oficiales de 1986 a 1990 se presentaron alrededor de trece mil casos anuales, y después de 1991 hubo una disminución del 38% de casos, reportándose ocho mil casos. Para el 2008, según el boletín semanal de epidemiología de la secretaría de salud reportó 332 casos, en el 2009 290 casos cuyos estados con mayor incidencia son Oaxaca, Guerrero, Chiapas y Veracruz. [13, 31]

### 2.2.3 CUADRO CLÍNICO

La teniosis puede ser asintomática o presentar síntomas gastrointestinales genéricos como dolor abdominal, sensación de hambre, diarrea y cefalea, incluso puede causar sensación de frecuente cansancio y somnolencia. Esto se debe ya que a pesar del gran tamaño que puede llegar a alcanzar el parásito adulto (2-8 m) prácticamente no genera daños o estos son mínimos como irritación de la mucosa intestinal ya que es el sitio donde está adherida a la pared intestinal y lo que hace es tomar nutrientes de la luz intestinal antes de que se absorban para la utilidad del organismo humano, en casos excepcionales puede presentarse oclusión intestinal, intoxicación por absorción de desechos metabólicos y peritonitis al perforar el escólex la mucosa intestinal. [4, 8, 16]

### 2.2.4 DIAGNÓSTICO

Detectar la teniosis presenta dos problemas, la pobre sensibilidad del coproparasitoscópico y la semejanza morfológica entre los huevecillos de otras especies de *Tenias*.

Debido a que la infección por tenias maduras es intraluminal, el diagnóstico más práctico es el examen parasitológico, para la identificación de los proglótidos grávidos y escólex en materia fecal, los cuales deben ser observados al microscopio para la identificación de la especie, o bien, por el análisis de los huevos mediante técnicas coproparasitoscópicas de sedimentación y flotación, cuya sensibilidad no es mayor de 60%. [9, 21, 31]

#### 2.2.5 TRATAMIENTO

Una vez diagnosticada la teniosis debe comenzarse el tratamiento inmediatamente, el tratamiento se basa principalmente con la administración de antihelmínticos, los cuales son fármacos que actúan de forma local para expulsar a los parásitos del tubo digestivo o, a nivel sistémico para erradicar tanto la forma adulta como las formas intermedias que invaden órganos y tejidos. [10]

Según la secretaría de salud, el medicamento de elección es el prazicuantel.

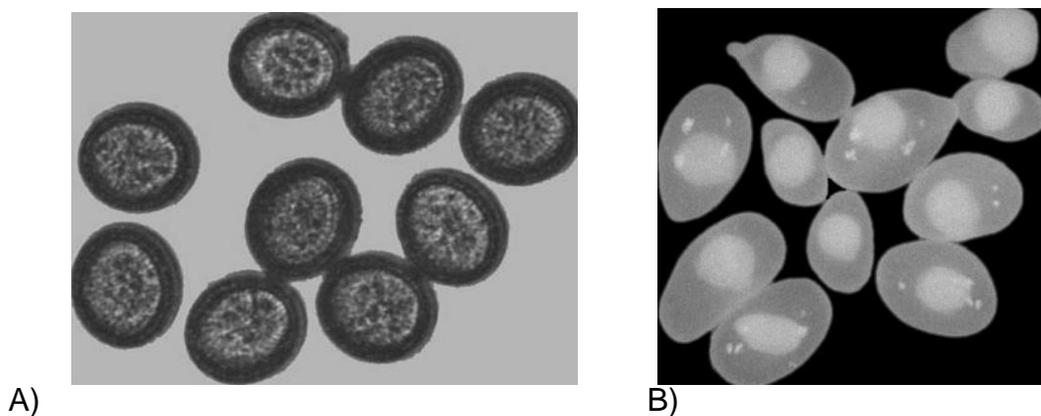
El prazicuantel, el cual es un derivado pirazinoisoquinolínico de amplio espectro, actúa a dosis bajas incrementando su actividad muscular seguida de contracción y parálisis espástica, a dosis levemente mayores causa daño en el tegumento que determina su vacuolización, desintegración y fagocitosis; las membranas constituyen al parecer el objetivo primario del fármaco, ya que incrementa la permeabilidad de la membrana a algunos cationes monovalentes, en particular la del calcio, con pérdida intracelular de este que favorece la contracción muscular y la parálisis espástica, sin embargo, no es bien conocido su mecanismo de acción.

Algunos efectos adversos que se presentan son malestar, cefalea, mareos, incomodidad abdominal, náuseas, fiebre, urticaria e insuficiencia hepática, generalmente es bien tolerado. Su administración es por vía oral, en adultos y pacientes geriátricos se administra una dosis única de 10 a 20 mg/kg con 99% de efectividad y en niños se administran de 5 a 20mg/kg, aún no se establece su eficacia y seguridad en niños menores de 4 años; su eliminación se efectúa vía renal en un 70% a las 24 horas. [13]

## 2.3 CISTICERCOSIS

La cisticercosis es producida por la larva de *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*), tras la ingestión de huevos por contaminación de alimentos o agua, estos se incuban en el estómago del humano, se liberan las oncosferas que después eclosionan en el intestino causando daño mínimo, logran llegar al torrente sanguíneo y se diseminan a diversos órganos albergándose en tejidos sólidos donde se desarrollan hasta cisticercos, preferentemente en el ser humano. [9,17, 37]

Los cisticercos son pequeñas vesículas de forma ovoide que miden de 8 a 10 mm de largo por 5 mm de ancho, que en su interior poseen un escólex invaginado rodeado por un líquido cristalino. [16, 17]



**Figura 4.** A) Huevos de *Taenia solium*. B) Cisticercos de *Taenia solium* disecados de músculo esquelético de cerdo. Observados a través de microscopio óptico [7, 17]

### 2.3.1 EPIDEMIOLOGÍA

La cisticercosis es un gran problema de salud pública tanto para países en desarrollo, como los desarrollados resultado de los crecientes movimientos migratorios, su distribución en países de América como Brasil, El Salvador, Perú y México, también en Europa oriental, India y algunos países de África, causan un grave problema

médico y económico. La frecuencia más elevada de casos de NCC es en Honduras (30%). [29]

En México se reportó el primer caso de cisticercosis en 1901 por el doctor Ignacio Gómez Izquierdo, hasta 1997 las estadísticas oficiales de prevalencia eran de un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, el grupo más afectado es de 15-44 años de edad. [17, 31]

### 2.3.2 CUADRO CLÍNICO

Las principales causas de morbilidad de la cisticercosis son la cisticercosis ocular que frecuentemente se localiza en la sub-retiniana o flotando libremente en el vítreo, causando como consecuencia alteraciones en la visión y la cisticercosis del sistema nervioso central o neurocisticercosis (NCC), que es la forma más letal de la cisticercosis, ya se ha convertido en un problema de salud pública debido a su alta incidencia, el elevado costo del diagnóstico y tratamiento además del daño que causa en el cerebro. [6, 8]



**Figura 5.** Distribución mundial de la prevalencia de la cisticercosis. [7]

Las infecciones en otras partes del organismo son detectadas muy esporádicamente, la cisticercosis subcutánea es asintomática, la cisticercosis muscular es encontrada por casualidad al tomarse una radiografía por otras razones y la cisticercosis miocárdica es usualmente un hallazgo de necropsia no relacionado a la causa de muerte. [8]

En cuanto a la NCC presenta como manifestación clínica la epilepsia de inicio tardío principalmente y cefalea, estas crisis pueden ser parciales o generalizadas [8, 31], sin embargo, no es sencillo establecer el diagnóstico debido a que las manifestaciones que se confunden con otros padecimientos neurológicos. [24]

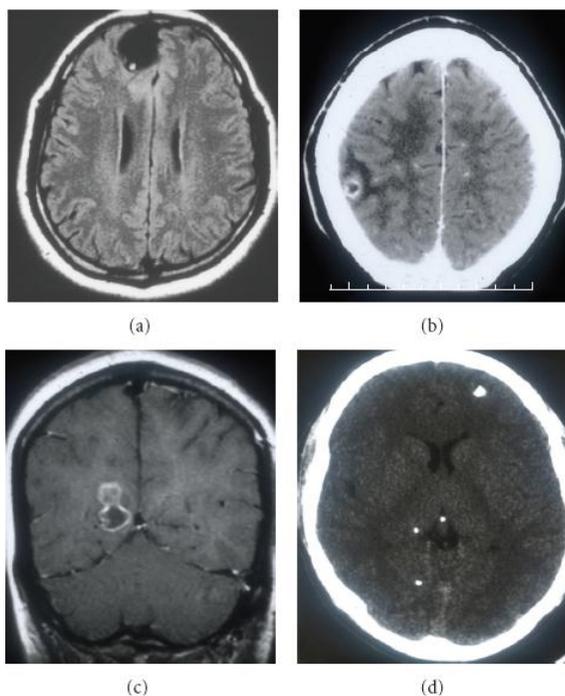
Su localización más frecuente es en la zona subaracnoidea seguido de la parenquimatosa. [9]

### 2.3.3 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico para la NCC, es complejo ya que se trata de una enfermedad pleomórfica debido a las diferentes formas evolutivas, por lo que se necesita una correcta interpretación de los exámenes de neuroimagen e inmunológicos para un diagnóstico certero, en el ojo se pueden detectar por un examen oftalmoscópico o fundoscopia, en el tejido subcutáneo y tejido muscular mediante radiografías simples o por palpación, aunque debido a que los síntomas no son específicos no es nada sencillo su diagnóstico, algunos métodos que son las principales herramientas para el diagnóstico de la NCC es la imagen, que incluye la tomografía computarizada (TC) y la imagen por resonancia magnética (IRM) debido a que permiten no sólo visualizar el número y localización del parásito, sino también su estado evolutivo, ya que se observan las imágenes quísticas redondeadas así como aquéllas en la que es aparente el escólex, son claras y decisivas, sin embargo, la principal desventaja de estas técnicas para la mayoría de la población no son accesibles debido a su elevado costo.

Los hallazgos con estas técnicas dependen del grado de viabilidad de los cisticercos, los más comunes son las lesiones quísticas bien definidas en las que se identifica el

escólex invaginado (más prevalentes en pacientes con epilepsia que en los asintomáticos) y en la etapa nodular calcificada. [5, 17, 24]



**Figura 6.** Imagen de resonancia magnética que revela la presencia de cisticerco (el punto central representa el escólex) (a). Quiste empezando a degenerar con edema perilesional (b). Quiste en la etapa granular sin edema perilesional (c). Tomografía computarizada que revela la presencia de múltiples calcificaciones (d). [5]

Existen otros estudios para el diagnóstico basados en técnicas inmunológicas, cuyo fundamento es la búsqueda de anticuerpos anticisticerco en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en suero, han tenido gran impacto y aceptación por su accesibilidad y bajo costo, además de su alta sensibilidad y buena especificidad, estos ensayos inmunoenzimáticos son el ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) y la Inmunolectrotransferencia (IET). [5]

Estas pruebas son un complemento importante de los estudios de neuroimagen, sin embargo, no deben ser utilizadas de forma aislada para confirmar o descartar el diagnóstico de NCC, ya que existe un elevado número de falsos positivos y negativos, de estas pruebas serológicas la Inmunolectrotransferencia es más sensible, esta utiliza una fracción de glicoproteínas, que tienen una especificidad del 100% y un 98% de sensibilidad para el diagnóstico, sin embargo, en pacientes con un solo cisticerco

cerebral o cisticercos calcificados la sensibilidad disminuye a 25% o no es detectado, en el caso del ELISA, en muestras de suero es muy baja la sensibilidad para el diagnóstico.[ 5, 24, 34]

#### 2.3.4 TRATAMIENTO

El tratamiento de esta parasitosis, depende del lugar en donde esté alojado el cisticerco, por lo que principalmente cuando es cisticercosis ocular o subcutánea debe ser un tratamiento quirúrgico y temprano, en el caso del ojo debe ser una extirpación de todo el parásito vivo, ya que la muerte del parásito conduciría a una reacción inflamatoria y esta puede provocar severas lesiones en el ojo.

La NCC debe ser tratada con analgésicos, anticolvulsivantes, la cirugía es variable dependiendo de la localización, el medicamento de primera elección es el albendazol, el cual es un carbamato de benzimidazol, cuyo mecanismo de acción se debe a los cambios bioquímicos como la inhibición de la fumarato reductasa de las mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, su acción determina la inmovilización, fallecimiento y eliminación del parásito. La principal sustancia del albendazol se distribuye a través de todo el cuerpo incluyendo el líquido y cerebroespinal, es oxidada y forma una sulfona inactiva que se elimina por riñón. Algunas de las precauciones es realizarse periódicamente el estudio de biometría hemática ya que se han publicado casos de granulocitopenia, agranulocitosis y pancitopenia. [13]

Los efectos adversos que se reportan son disfunción hepática, dolor abdominal, náuseas, vómito, cefalea, mareo, vértigo, alopecia reversible, falla renal aguda así como aumento de la presión intracraneana. La dosis en general es por vía oral de 15mg/kg/día, dividida en tres dosis administradas con alimentación grasa, por 8 a 28 días. Además de emplear fenitoína, fenobarbital y corticosteroides. El medicamento alternativo que se emplea es el praziquantel en una dosis oral de 50mg/kg por día, durante 15 días, dividido con los alimentos. [13]

## 2.4 SISTEMA DE LAS GLIOXALASAS

### 2.4.1 GENERALIDADES.

Las glioxalosas se conocen hace más de ochenta años en los sistemas microbianos y animales, sin duda es una vía con alta conservación durante la evolución, sin embargo, el significado fisiológico de este sistemas aún no se conoce por completo, aparentemente el sistema juega un rol crítico en el proceso celular de desintoxicación, especialmente del potente y citotóxico metilglioxal (MGO). [11, 39]

El sistema de glioxalosas también está implicado en la protección contra otros  $\alpha$ -oxoaldehídos citotóxicos, así como en la regulación de la división celular y proliferación, movilización vesicular, crecimiento de tumores y complicaciones clínicas asociadas a varias enfermedades, entre ellas la *diabetes mellitus*. [11]

El MGO también conocido como 2-oxopropanal, piruvaldehído, acetil formaldehido, es generado por las enzimas, metilglioxal sintasa, isoenzimas del citocromo P450 y la amino oxidasa; y por una vía no enzimática como subproducto de la glucólisis; en el paso de interconversión del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DAP).

Este es un compuesto conocido por contribuir a la generación de productos finales de glicación avanzada: AGE's (advance glycosylation end products), con daños probablemente irreversible a los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, en particular en las mitocodrias. [2] El MGO es eliminado a través del sistema enzimático de glioxalosas que consta de dos enzimas. [2, 14, 15]

### 2.4.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA GLIOXALASA II.

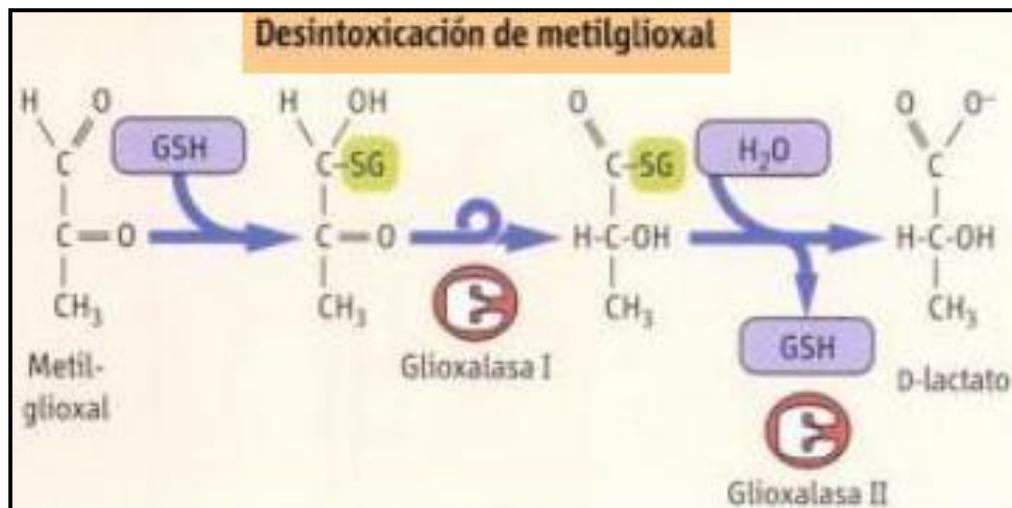
El sistema de las glioxalosas fue descubierto en 1913, en ese momento se creyó que se trataba de una sola enzima, ahora se sabe que consta de dos metaloenzimas, la glioxalasa I (GLO I) (EC.4.4.1.5) y la glioxalasa II (GLO II) (EC.3.1.2.6). [11, 14]

La GLO-II familia de las metalo- $\beta$ -lactamasas, las cuales consisten en un motivo de sándwich  $\alpha\beta/\beta\alpha$ , compuesto de una unidad central de dos hojas  $\beta$ , rodeado por hélices. La GLO II al igual que otros miembros de esta familia contiene un motivo HXHXD conservado que se ha demostrado que se une a Zn (II), Fe y Mn. En el caso de la GLO II humana está reportado que contiene un centro dinuclear de Zn (II). [18, 19]

El sistema de glioxalasa está presente en el citosol de las células y los organelos celulares, particularmente en la mitocondria. [35]

La GLO II tiene un peso molecular de 18-29kDa, esta enzima es un monómero. [19, 35]

En el primer paso de la vía, la lactoil glutatión liasa (GLO 1) cataliza la conversión de metilglioxal (MGO) y glutatión reducido (GSH) formando S-D-lactoil-glutatión (SLG), en el segundo paso, la hidroxiacetil glutatión (GLO II) cataliza la hidrólisis de SD-lactoil-glutatión a D-lactato y regenera el glutatión. [2,11, 35]



**Figura 8.** Vía de desintoxicación del metilglioxal llevada a cabo por el sistema de glioxalasa. [3]

#### **4. HIPÓTESIS**

Si *Taenia solium* utiliza la vía metabólica de la glucólisis para generar energía entonces deberá contar con enzimas relacionadas a los metabolismos desintoxicantes, entre ellas la glioxalasa II (GLO-II).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

Clonar y caracterizar el ADNc que codifica para la Glioxalasa- II (GLO-II) de *Taenia solium*.

### 5.2 Objetivos particulares:

1. Producción de una sonda de ADNc que codifique para la GLO-II.
2. Aislar el ADNc que codifica para la GLO-II completa de *Taenia solium*.
3. Caracterización de la secuencia nucleotídica del ADNc de la GLO-II.
4. Efecto de MGO en cisticercos de *Taenia crassiceps*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó *Escherichia coli* Cepa C600 hfl<sup>-</sup>, Fagos λgt10 y cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa (WFU).

### MÉTODOS

### 6.2 PRODUCCIÓN DE LA SONDA POR TRASCRIPCIÓN REVERSA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Para las reacciones de RT-PCR se utilizó RNA de *Taenia solium*, 2μL de cada uno de los oligonucleótidos específicos ATGCATGTTCTGACTATCCCCGC Y GTCGCAGTAAAGATGCCTTCTAA, 25μL de amortiguador y 5U de la enzima, la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50μL. Las condiciones utilizadas para obtener el fragmento de GLO-II que se utilizó como sonda fueron para la etapa de alineamiento 52°C y la transcripción a 50°C. Se utilizó el programa 52.

### 6.3 PURIFICACIÓN DE LA SONDA DE ADNc.

El fragmento amplificado fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en Tris-acetato (TAE 1X, ver anexo 1), cortado y purificado.

Se colocó la muestra en la columna y se agregaron 400μL de H1 (solución de unión), se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm, transcurrido este tiempo el sobrenadante se separó y se agregó H2 para lavar (buffer con etanol), se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante, finalmente se agregaron 50μL de TE (entre 45-70°C), al fragmento purificado (0,5ng/μL) se le realizó un PCR, para la reacción se utilizó 1μL de ADN, 1 μL de los iniciadores específicos, 5μL de nucleótidos (A, C, G, T), 2,5μL de MgCl<sub>2</sub> y 5U de la enzima Taq polimerasa, la

reacción se llevó a cabo en un volumen de 50µL. Las condiciones utilizadas fueron un ciclo de (3min, 95°C, 1min. 52°C, 2 min, 72°C), 30 ciclos (1min, 95°C, 1min. 52°C, 5 min, 72°C), y un ciclo final (1min, 95°C, 5min. 52°C, 5 min, 72°C), se agregaron 450µL de Buffer QG (para disolver la agarosa), se incubó a 50°C hasta que se disolvió agitando cada 3 minutos con vórtex, se agregó 150µL de isopropanol para ayudar al pegado de ADN en la columna, se colocó la mezcla en la columna y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min., se descartó el sobrenadante y se lavó con buffer PE (750µL), se centrifugó nuevamente 1 min. y se descartó el sobrenadante, se centrifugó una vez más y se colocó en un tubo de recuperación, se añadieron 50µL de buffer EB (buffer de elución), se incubó 1 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm/1 min.

Se obtuvo una concentración de 80 µg/mL.

#### 6.4 MARCAJE DE LA SONDA.

Se realizó un PCR a 57°C para la incorporación de dUTP biotina al ADN, los reactivos utilizados fueron: 5µL de amortiguador 10X, 5µL de dxTP's, 5µL dTTP, 2,5µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5µL de ADN, agua MQ, 0,5µL de bio-11-UTP y 0,5µL de Taq polimerasa. Se utilizó el mismo programa ya mencionado.

#### 6.5 TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA λgt10.

El título realizando las diluciones 1:100 (10<sup>-2</sup>) y 1:10,000 (10<sup>-4</sup>), donde el virus utilizado para infectar y formar las placas líticas es λgt10. Para la dilución 10<sup>-2</sup> se colocaron 99µL de amortiguador y 1 µL de virus, y en la dilución 10<sup>-4</sup> se tomó 1µL de la dilución anterior en 99µL de buffer, el buffer que se utilizó fue la solución SM.

Para llevar a cabo la titulación se utilizaron 300µL de bacterias C600hfl<sup>-</sup> y 10µL de la dilución, se prepararon 3 cajas para la biblioteca: total, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-4</sup>.

## 6.6 TAMIZAJE DE LA SONDA.

Se utilizaron 300µL de un cultivo de *E. coli* de la cepa C600hfl<sup>-</sup>, crecido durante toda la noche para infectar con 20,000 fagos de la biblioteca de ADNc de adulto de *T. solium*. La mezcla anterior se incubó a 37°C durante 15 minutos, se mezcló con agar TOP-SOBM fundido a 48°C y se sembró en 3 cajas petri de 120mm de diámetro con medio SOBM, las cajas se incubaron a 37°C hasta que se observaron placas líticas, una vez obtenido esto se cubrieron con membranas de nitrocelulosa durante 5 minutos y se le realizaron marcas asimétricas con tinta china, el proceso se repitió para obtener réplicas. Al DNA del fago incorporado a las membranas se le agregaron 3mL de la solución desnaturizante (ver anexo) y posteriormente se añadieron 3mL de la solución de neutralización (se llevaron a cabo 2 lavados), se colocó la solución SSC 2X para quitar los restos de bacterias, agitando suavemente. Se colocaron las membranas sobre un papel con los fagos hacia arriba y se dejó secar, una vez secos el DNA fue fijado a la membrana con luz ultravioleta en un UV Stratalinker 2400, utilizando las condiciones de 1200 seg x 100µj x cm<sup>2</sup>.

Las membranas fueron prehibridadas a 50°C durante 4 h. con solución SSC 6X, Denhart's 5X, SDS 0,5% y 100µg/mL de DNA de espermatozoos de salmón previamente desnaturizado a 100°C por 2 min. Una vez transcurrido el tiempo se cambió la solución por una similar a excepción del DNA de salmón, entonces se añadió la sonda marcada y las membranas fueron incubadas a 50°C durante toda la noche. Las membranas fueron lavadas 3 veces con la solución de lavado (SSC 2X y SDS 0,5%) cada 30 min. Posteriormente se llevó a cabo el procedimiento para detección de ácidos nucleicos inmovilizados, el cual consiste en colocar las membranas con los fagos hacia arriba y agregar el amortiguador de "bloqueo" hasta cubrir las y se incubó durante 15 minutos agitando suavemente, se decantó el amortiguador y se añadió la solución de conjugación y se incubó 15 min. con agitación suave, se transfirió la membrana a un nuevo contenedor y se enjuagó brevemente con 20mL con solución de lavado 1X, lavar la membrana 4 veces durante 5 min. con 20mL de la solución con agitación suave.

Se transfirieron las membranas a un nuevo contenedor y se agregaron 30mL de amortiguador de “sustrato equilibrio” y se incubaron las membranas durante 5 minutos nuevamente con agitación suave, se removió el amortiguador y cuidadosamente se secó por el borde con papel absorbente el exceso de amortiguador, se agregó la solución “sustrato de trabajo” sobre la membrana hasta que cubrió por completo la superficie, se colocaron las membranas con los ácidos nucleicos hacia abajo y se incubó 5 minutos sin agitación, se removieron las membranas de la solución, secando el exceso pero evitando que la membrana se seque, se preparó la solución quimioluminiscente no exponiéndola a la luz, adicionando 6mL de luminol a 6mL de solución “peróxido estable” y en completa oscuridad se agregó la solución a las membranas, después de 2 minutos se envolvieron las membranas en un plástico sin crear burbujas y arrugas. Finalmente, las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron expuestas a rayos X durante 24 horas.

Las clonas positivas del primer tamizaje fueron aisladas del agar y resuspendidas en 500µL de medio SM, se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se prepararon las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  para cada una de ellas, una vez hechas las diluciones, se llevó a cabo la misma técnica descrita anteriormente, en el último tamizaje (terciario) las clonas encontradas se colocaron por separado en cajas de SOBM más TOP SOBM para que se formaran placas líticas en toda la caja, para posteriormente ser recuperadas.

#### 6.7 OBTENCIÓN LISADO DE FAGOS (PLATE STOCK).

Se recuperaron fagos de las clonas 1, 3, 4, 6, 7 y 9. Se colocaron 5mL de SM en cada caja, se dejó agitando suavemente y a temperatura ambiente durante 1 h 30 min., se recuperaron en un tubo estéril con ayuda de una pipeta Pasteur estéril cada una de las clonas y posteriormente se colocaron 2 mL más de SM para lavar perfectamente, se dejó 1 hora más y se recuperó en el mismo tubo correspondiente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, este se vertió en un tubo falcon estéril y se agregaron 20 µL de cloroformo y se guardaron a 4°C (plate stock).

## 6.8 DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

Para realizar la digestión de las clonas obtenidas utilizaron las endonucleasas EcoRI y BamHI. Se utilizaron los siguientes reactivos: 5  $\mu$ L del fragmento clonado en el  $\lambda$  ADN del fago, 20  $\mu$ L de solución amortiguadora 10X que cada enzima requiere y agua grado M.Q, c.b.p 200  $\mu$ L, a cada mezcla de reacción se le incorporaron 3  $\mu$ L de la enzima correspondiente, se incubó la reacción a 37°C /4 h y para conocer el progreso de la digestión se corrió un gel de agarosa al 2 % con BrEt a 100 mVolts, colocando una muestra control del ADN sin digerir y también un marcador de peso molecular de 700 A 200pb.

## 6.9 PCR DE ADN DE FAGOS.

Se realizó un PCR empleando 1  $\mu$ L de ADN obtenido para que se llevara a cabo la amplificación de fagos, los oligonucleótidos utilizados fueron  $\lambda$ gt10 3'-Si y  $\lambda$ gt10 5'-Si, una vez amplificado se purificó por columna (como ya se mencionó anteriormente). Este fragmento se clonó.

## 6.10 LIGACIÓN.

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el estuche de clonación TOPO-TA Cloning System de la casa comercial Invitrogen, para lo cual se emplearon, 1  $\mu$ L del vector pCRII, 1  $\mu$ L de amortiguador salino, 1  $\mu$ L de agua y 3  $\mu$ L del PCR fresco (obtenido en el punto anterior). Finalmente, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, esta ligación fue denominada FgGLO-II- $\lambda$ gt10Si- F+R, clona 3 en pCRII. La ligación se diluyó (2  $\mu$ L de la ligación y 53  $\mu$ L de agua) y se electroporó (2  $\mu$ L de la dilución con 20  $\mu$ L de células competentes de *Escherichia coli* cepa TOP10). Las condiciones de electroporación fueron 1800 volts empleando un electroporador de la marca eppendorf modelo 2510, posteriormente se añadieron 180

µL de medio SOC en condiciones estériles a las células electroporadas para recuperarlas, se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones: se incubó durante 1 hora a 37°C y agitación de 200rpm.

Se sembraron 100 µL de las ligaciones transformadas en un medio SOBMs sólido con ampicilina 100 µg/mL utilizando una varilla de metal en L estéril. Las cajas fueron incubadas a 37°C/ 18 h para que hubiera buen crecimiento de colonias y evitar el crecimiento de microsátélites alrededor de las colonias.

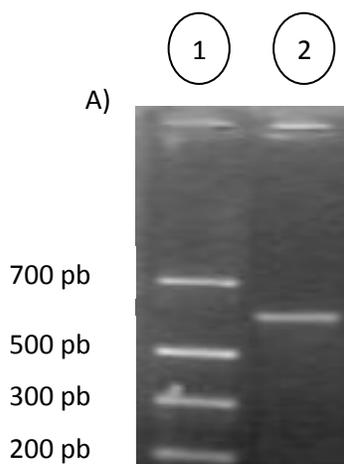
Por último se empleó la técnica de reacción en cadena acoplada a la polimerasa utilizando el programa alp50 que se corrió bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, 50°C por 1 minuto y 2 minutos a 72°C; 30 ciclos de 1 minuto a las temperaturas antes mencionadas y por último un ciclo de 95°C durante 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 5 minutos en un termociclador GeneAmp PCR system modelo 9700 (Applied Biosystem). Se mandó a secuenciar en un secuenciador automático y su secuencia fue analizada por el programa computacional PCGENE.

#### 6.10 EFECTOS DEL MGO EN CISTICERCOS.

Para conocer el efecto del MGO en cisticercos de *Taenia crassiceps* se utilizó un ratón con 2 meses de infección, se eligieron cisticercos de 2-3 mm sin gemas, lavados con PBS y antibióticos y se preincubaron por 24 h en una placa tipo ELISA con 1 mL de medio de cultivo RPMI grupos de diez cisticercos sanos, al segundo se cambió el medio por los tratamientos correspondientes, se probaron las dosis del tóxico en las siguientes concentraciones: control, 1,0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5mM, 10mM, 20mM y 40 mM, en tiempos de 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 24 h., transcurrido el tiempo correspondiente se retiró el tratamiento y se añadió una solución 1:3 de bilis con medio RPMI para observar la evaginación.

## 7. RESULTADOS.

Utilizando el método de la RT-PCR con RNA total del parásito y dos oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias conservadas de la enzima glioxalasa II, se produjo un fragmento de ADNc de tamaño de ~700pb y mediante la electroforesis en agarosa y purificación utilizando un método en columna de sílice que retiene el DNA, se puede observar en el gel de agarosa la pureza del fragmento eluido de la columna (Fig. 9).



**Figura 9.** A) Gel de agarosa al 1%, en el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular y en el 2 se trata del fragmento obtenido (sonda).

Después de obtener la sonda purificada se mandó a secuenciar el fragmento obtenido para verificar si este codificaba para una GLO-II. La secuencia nucleotídica obtenida y sus análisis computacionales con el programa PCGENE revelaron que la secuencia primaria de inicio a término codificaba para una enzima glioxalasa (Fig. 10), en la figura se señalan los oligonucleótidos utilizados para obtener la sonda. Se puede observar que la sonda codifica para una GLO-II completa, ya que presenta un codón para el ATG de inicio y un codón TAA de término.

```

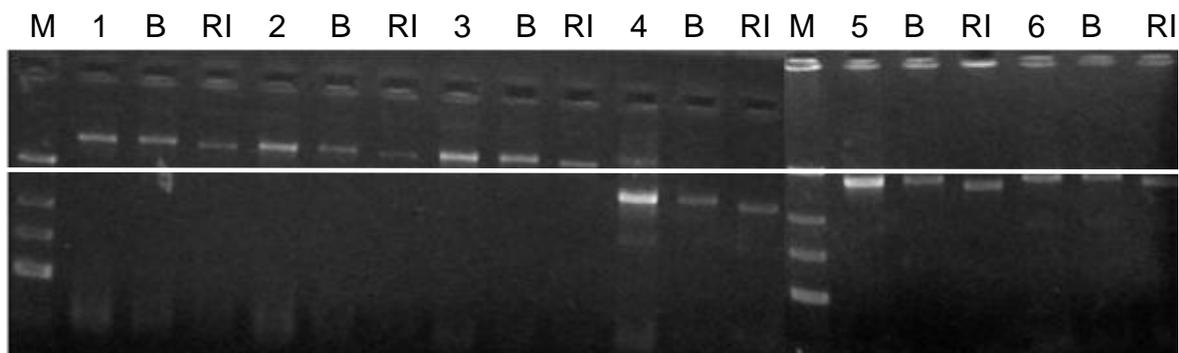
1  ATGCATGTTCTGACTATCCCCGCTTTGTCAGATAATTATATGTACCTGCTGATCGATGAC   60
   M H V L T I P A L S D N Y M Y L L I D D
61  AAGACAAAGCAATGTGCTGCAAGTTGATCCGGTAGAGCCCCCTAAAATCTTAGCTGAACTA   120
   K T K Q C A A V D P V E P P K I L A E L
121 AAGAAACGGGGTTTGACATTATCTTGCATCCTCACTACGCATCATCACTGGGATCACGCC   180
   K K R G L T L S C I L T T H H H W D H A
181 GGAGGCAATTGCGAGCTCTTGAAGTCTTTACCCTCTTCCATACCTGTCTATGGTGGTGGC   240
   G G N S E L L K S L P S S I P V Y G G G
241 AAAACGTTGGAGGCCGTCAGCAAAACAGGTTGCCACGGCGACCAAAATGCGGTAGGCAGT   300
   K N V E A V S K Q V A H G D Q I A V G S
301 GACATAACAGTGACTTGCTTGCACACACCCTGCCACACTAAAGATCATATCTGCTATTAC   360
   D I T V T C L H T P C H T K D H I C Y Y
361 GCCACTGAAACCGAGCGACTCGATGGCTGCGTCTTACCGGGTGACACGCTATTTCTAGGT   420
   A T E T E R L D G C V F T G D T L F L G
421 GGTTGCGGAAGATTTTTGAGGGTAATGCTCAACAAATGTATCACGCTCTTGTGGAAGTT   480
   G C G R F F E G N A Q Q M Y H A L V E V
481 CTAGGTAAACTTCCAGGCTCAACTAGGGTTTTATTGTGGTACAGGTACACCATGAAGAAC   520
   L G K L P G S T R V Y C G H E Y T M K N
521 TTTGATTTCGCGAAGTCCGTGGACGCCGGTAAACACGGCTCTTCTGGAGCGAATGGAGGCC   580
   F D F A K S V D A G N T A L L E R M E A
581 TCGCGAAGCTGCGCGCCGACCGACAACCGACAGTACCGGGCACGATAGCGGAGGAGCTT   640
   C A K L R A D R Q P T V P G T I A E E L
641 GCCACTAATCCCTTCATGCGAGTGTGATCCGGGCTGCAGAAGAATGTCAAGGCGAAG   700
   A T N P F M R V V D P G L Q K N V K A K
701 GATGCGGTTGACGCCATGGGCATCATTGCTGCGAGTAAAGATGCTCTCTAA   771
   D A V D A M G I I R R S K D A F -

```

**Figura 10.** Traducción de la secuencia nucleotídica del fragmento correspondiente a un ADNc que codifica para una glioxalasa de *T. solium* mediante la RT-PCR. Subrayado en negro se muestran los oligonucleótidos GLO II-3' y GLO II-5' utilizados.

Una vez obtenida la sonda específica para aislar el ADNc completo que codificara para la GLO-II, esta se marco con P<sup>32</sup> para el aislamiento e identificación de clonas mediante el tamizaje de una biblioteca de *Taenia solium*, se encontraron 6 clonas positivas al final del tamizaje terciario, dichas clonas fueron denominadas GLO II-1 hasta GLO II-6. Por medio de la técnica de PCR fue obtenido el ADN de los fagos positivos se observó que las clonas 1-3 presentan un tamaño similar de alrededor de 1 Kb, las clonas 5 y 6 un tamaño de ~900 pb y la clona 4 de ~600 pb. Los fragmento amplificados de las clonas digeridos por las endonucleasas EcoRI y BamHI,

mostraron que sus patrones de restricción son similares en todas las clonas formando una escalera (Figura 11).



**Figura 11.** Fragmentos de PCR de las clonas 1-6 aisladas con el tamizaje de la biblioteca de ADNc de *T. solium*, con sus respectivas digestiones con las endonucleasas BamHI (B) y EcoRI (RI). M: marcador de peso molecular (200pb-800pb).

La clona Glo II-3 fue elegida para clonarse porque tenía mayor tamaño y concentración con respecto a las demás (1 y 2), se amplificó por PCR y fue clonado directamente en el vector pCRII, esta ligación fue denominada FgGLO-II- $\lambda$ gt10Si-F+R, clona 3, una de las clonas obtenidas de esta ligación fue secuenciada. La figura 12, muestra su secuencia nucleotídica y de aminoácidos obtenidos mediante los análisis computacionales con el programa PCGENE. El ADNc está compuesto de 961 nucleótidos, con 63 pb en la región 5'-sin traducir y 127 pb en la región 3'-sin traducir con un sitio de poliadenilación clásico, un marco de lectura abierto que comienza en el nucleótido 64, con el codón de inicio ATG y termina en el nucleótido 836 con el codón de término TAA. El ADNc codifica para una proteína de 251 aa.

```

1  CCCTTTTAGGCGCTCTTTGCTTTGCGGCTTCAGGGTTCCTCCTCTGGGTGCTCGTATTGC
61  AGGGATGCATGTTCTGACTATCCCCGCTTTGTGAGATAATTATATGTACCTGCTGATCGA
    M H V L T I P A L S D N Y M Y L L I D      19
121 TGACAAGACAAAGCAATGTGCTGCAGTTGATCCGGTAGAGCCCCCTAAAATCTTAGCTGA
    D K T K Q C A A V D P V E P P K I L A E      39
181 ACTAAAGAAACGGGGTTTGGACATTATCTTGCATCCTCACTACGCATCATCACTGGGATCA
    L K K R G L T L S C I L T T H H H W D H      59
241 CGCCGGAGGCAATTCGGAGCTCTTGAAGTCTTTACCCTCTTCCATACCTGTCTATGGTGG
    A G G N S E L L K S L P S S I P V Y G G      79
301 TGGCAAAAACGTGGAGGCCGTCAGCAAACAGGTTGCCACGGCGACCAAATTCGGGTAGG
    G K N V E A V S K Q V A H G D Q I A V G      99
361 CAGTGACATAACAGTGACTTGCTTGCACACACCCTGCCACACTAAAGATCATATCTGCTA
    S D I T V T C L H T P C H T K D H I C Y      119
421 TTACGCCACTGAAACCGAGCGACTCGATGGCTGCGTCTTACGGGTGACACGCTATTTCT
    Y A T E T E R L D G C V F T G D T L F L      139
481 AGGTGGTTGCGGAAGATTTTTTCGAGGGTAATGCTCAACAAATGTATCACGCTCTTGTGGA
    G G C G R F F E G N A Q Q M Y H A L V E      159
541 AGTTCTAGGTAAACTTCCAGGCTCAACTAGGGTTTATTGTGGTCACGAGTACACCATGAA
    V L G K L P G S T R V Y C G H E Y T M K      179
601 GAACTTTGATTTTCGGAAGTCCGTGGACGCCGGTAACACGGCTCTTCTGGAGCGAATGGA
    N F D F A K S V D A G N T A L L E R M E      199
661 GGCCTGCGGAAGCTGCGCGCCGACCGACAACCGACAGTACCGGGCACGATAGCGGAGGA
    A C A K L R A D R Q P T V P G T I A E E      219
721 GCTTGCCACTAATCCCTTCATGCGAGTCGTCGATCCGGGCCTGCAGAAGAATGTCAAGGC
    L A T N P F M R V V D P G L Q K N V K A      239
781 GAAGGATGCGGTTGACGCCATGGGCATCATTTCGTCGCAGTAAAGATGCCTTCTAAGCGAA
    K D A V D A M G I I R R S K D A F -      256
841 TGTCTCGCCTTACGTTTACTACTTTCGCGCCCTTACGTATCCTTACTTTCGATGGCTACG
901 TGAATATTTTAGAAAACGTTTATAATAAATCTTCATGCGTTACATCTATTTCATTGATTCT

```

**Figura 12.** Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la clona GLO II- 3 correspondiente a un ADNc que codifica para la enzima glioxalasa II de *Taenia solium*. Los números de la izquierda corresponden a los nucleótidos y los de la derecha a los aminoácidos traducidos. El codón de inicio se muestra subrayado. En color rojo se muestran los oligonucleótidos GLO II-3' y GLO II-5' utilizados en la sonda que se empleó para el tamizaje. El sitio de poliadenilación se encuentra en negritas. En la caja negra se señala el motivo del sitio activo. En la caja verde se señalan los residuos de aa característicos del sitio activo, con amarillo se muestran los aa que conforman el sitio Zn<sub>1</sub> y en la caja rosa la secuencia de aa que conforman el sitio Zn<sub>2</sub>.

A partir de la secuencia primaria obtenida de la secuencia nucleotídica del ADNc de la clona 3, se realizó una comparación de la GLO II por medio de un alineamiento múltiple con homólogos de esta enzima en otros organismos biológicos (Figura 13), en el alineamiento se muestran subrayadas las secuencias características más importantes de las glioxalinas II. Por otro lado, los análisis de la secuencia de aminoácidos indican que la GLO II de *T. solium* presenta una identidad del 44% con la secuencia del *Homo sapiens*, 55% con *Schistosoma japonicum*, y 49% con la secuencia de *Schistosoma mansoni*.

```

HS1  MKVEVLPALTDNYMYLVIDDETKEAAIVDPVQPKVVDAAARKHGVKLTTLVLTTHHHWDHA 60
SJ2  MEVVILPALSDNYMYMVIDRASNICAVVDPVEPDKVLSVVKQRGLQLKSVLTTTHHSDHA 60
SM1  -----MSSE-----QLQDPVEPDKILSAVTQRGLRLESILTTTHHLLDHA 39
TS1  MHVLTIPALSDNYMYLLIDDKTKQCAAVDPVEPPKILAEKKRGLTLSCILTTTHHWDHA 60
      :   :                               ***** *:*:  :::** *..:***** **

HS1  GGNEKLVKLES----GLKVYGGDDRIGALTHKITHLSTLQVGS-LNVKCLATPCHTSGH 114
SJ2  GGNLDLIAKCKEQGLEALSVYGGDDRIGGLTVTVSHGYKMKIGNNLTVQCLATPCHTTGH 120
SM1  GGNLDLVTKCRKQGLEGLKVYGGDDRIGGLTDTVSHGYKXRLVATSTFIAWLHHRHTTGH 99
TS1  GGNSELLKSLP----SSIPVYGGGKNVEAVSKQVAHGDQIAVGSDITVTCLHTPCHTKDH 116
      *** *:*:  .   ..: *****...:  :::  *:*:  :   :   * . .   **..*

HS1  ICYFVSKPGGSEPPAVFTGDTLFLVAGCGKFFE+GTADEMCKALLEVLGRLPDTRVYCGHE 174
SJ2  ICYLVTEENSTKEGAVFTGDTLFLGGCGRFFE+GTAEQMFKALIEVLSKLPPTATKVYCGHE 180
SM1  ICYLVTEENSTKEGAVFTGDTLFLGGCGRFFE+GTAEQMFKALIEVLSKLPPTTKVYCGHE 159
TS1  ICYYAT-ETERLDGCVFTGDTLFLGGCGRFFE+GNAQQMYHALVEVLGKLPGSTRVYCGHE 175
      *** . * . .   :*.*****.*****.*:*:.*:*:*.*.***  :*:*****

HS1  YTINNLK+FARHVEPGNAAIREKLAWAKEKYSIGIPTVSTLAEFETYNP+FMRVREKTVQQ 234
SJ2  YTVKNLEFGLTIEPKNEALKHRLEAVKRLRASNQPSVPGTIGEELATNP+FMRVSEVDVLT 240
SM1  YTVKNLEFGLTVEPKNEALKHRLEAVKRLRASNQASVPGTIGEELATNP+LMRVSEPDVLA 219
TS1  YTMKNLDFAKSVDAGNTALLERMEACAKLRADRQPTVPGTIAEELATNP+FMRVVDPLQK 235
      **:***:.*.  :::.  * **  .:*:*  :***.*.*:*****.*****:*:*  :  .:

HS1  HAGETDPVTTMRAVREK+DQF 255
SJ1  HAKTTDPIKAMKIIREK+DHF 261
SM1  HAKTTDPIKAMKTIREK+DRF 240
TS1  NVKAKDAVDAMGIIRSK+DAF 256
      :.*:*.*..**  **..** *

```

**Figura 13.** Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la enzima GLO II de *T. solium* (TS1) con las glioxalinas de otros organismos. HS1: Humano, SJ2: *Schistosoma japonicum*, SM1: *Schistosoma mansoni*. Los residuos idénticos se indican con asteriscos, las sustituciones conservadas se indican con dos puntos y las semi-conservadas se indican con un punto. En amarillo se indica el motivo del pliegue  $\beta$ -lactamasas. La unión con el metal está indicada con una línea en medio y con el doble subrayado. En rosa se muestran los sitios que se unen con el sustrato.

Finalmente se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar el daño causado por el MGO a cisticercos de *Taenia crassiceps* a concentraciones y tiempos diferentes, con una n=10 de cisticercos en un pozo de la placa se agregó el tratamiento de MGO en concentraciones de 1,0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5mM, 10 mM, 20 mM y 40 mM respectivamente; y se dejó incubando en tiempos de 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 24 h; después de haber transcurrido el tiempo correspondiente se observó al microscopio estereoscópico los daños causados por el metilglioxal al cisticerco, se tomaron en cuenta parámetros como movilidad (+++ alta, ++ media, + baja, 0 nula), la turbidez en el medio (generada por el daños ocasionado en la membrana), y la viabilidad del cisticerco (por medio de la evaginación en presencia de bilis). En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos, se puede observar que a partir de las 4 horas a una concentración de 2,5 mM los cisticercos comienzan a perder la movilidad, los primeros daños en la membrana ocurren a partir de una concentración de 5 mM después de 6 horas y en mayores concentraciones a la misma hora se observa incremento en el daño ocasionado (ruptura) por lo que en ese mismo tiempo y a partir de la concentración de 5 mM se observa turbidez en el medio, a pesar de ello como se muestra en la tabla aún después de 24 horas aún a la concentración de 40 mM hay cisticercos que aún evaginan en presencia de bilis, la cantidad se ve disminuida, sin embargo, no se alcanza el cero.

Concentración de MGO/ Tiempo	control	1,0 mM	2,5 mM	5 mM	7,5 mM	10 mM	20 mM	40 mM
30 min	+++	+++	++	+	0	0	0	0
	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	9/10	8/10
1 h	+++	+++	++	+	0	0	0	0
	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	7/10	7/10	5/10
2 h	+++	+++	++	+	0	0	0	0
	10/10	9/10	10/10	8/10	8/10	7/10	6/10	3/10
4 h	+++	++	0	0	0	0	0	0
	10/10	9/10	9/10	8/10	6/10	7/10	4/10	4/10
6 h	+++	++	0	0*	0*	0*	0*	0*
	10/10	8/10	8/10	8/10	5/10	6/10	6/10	3/10
24 h	+++	+	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	10/10	8/10	7/10	6/10	5/10	3/10	3/10	3/10

**Tabla I.** Resultados promedio obtenidos de los ensayos *in vitro* realizados para observar los daños causados por el MGO a cisticercos de *T. crassiceps* a diferentes tiempos y concentraciones. Se tomaron en cuenta movilidad (+++ alta, ++ media, + baja, 0 nula), el número de cisticercos que evaginaron después de ser sometidos al tratamiento x/n=10, en amarillo se muestran los tiempos y concentraciones a las que se observó daño en la membrana de los cisticercos y con asterisco se indican los tiempos y concentraciones en las cuales se observó turbidez en el medio generada por la ruptura de la membrana.

## 8. DISCUSIÓN

*Taenia solium* es un parásito que afecta principalmente a humanos y cerdos, aunque la enfermedad que causa este parásito en los humanos (teniasis/neurocisticercosis) no figura entre las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en humanos del México actual como son: la hipertensión, la diabetes, el cáncer cervico-uterino, el cáncer de mama y pulmón, así como los accidentes, enfermedades neurodegenerativas, entre otras, sin embargo, impacta gravemente en su forma letal (neurocisticercosis) a la salud del enfermo, así como al presupuesto de la salud pública por tratarse de una enfermedad crónica que requiere para su diagnóstico y tratamiento altos costos. [17]

A pesar de que la teniasis/cisticercosis llegó probablemente a México hace más de 500 años, estas enfermedades siguen prevaleciendo en México y en países desarrollados, por ejemplo, en los servicios especializados de neurología, la neurocisticercosis es la quinta causa más frecuente de consulta (4,3%) [17].

En el presente trabajo, se aisló y caracterizó parcialmente un ADNc que codifica para la glioxalasa II de *T. solium*; se logró obtener una sonda de ADN de 751 pb que codifica para 256 residuos de aminoácidos del tamaño esperado, comprobando que los oligonucleótidos diseñados que se diseñaron sobre los sitios conservados en las glioxalosas II, demuestra que esta estrategia es un método para la obtención de sondas, así como para el aislamiento de genes a partir de bibliotecas de ADNc que codifican para proteínas que requieren ser clonadas.

Como fue el caso ya que con la sonda se aisló el ADNc de interés (GLO II) a través de tamizajes realizados a la biblioteca de ADNc de cisticerco construida en el fago  $\lambda$ gt10, utilizando 20,000 fagos de la biblioteca, en los que se obtuvieron 6 clonas, lo que indica que el transcrito está representado en la biblioteca en 0,03% lo que sugiere que existe en bajas concentraciones dentro del parásito. El análisis las clonas obtenidas por medio de una digestión con endonucleasas de restricción mostraron que las clonas eran similares a pesar de su diferentes tamaños. Cabe mencionar que la secuencia de la clona 4, no estaba completa pero fue idéntica a la clona GLO II-3

(dato no mostrado) lo que sugiere que todas las clonas eran idénticas y codificaban para la enzima Glo II de *T. solium*.

El ADNc que codifica para la GLO II fue clonado en el vector pCRII y su secuencia de aminoácidos y análisis computacionales confirmaron que codificaba para la GLO II de *T. solium* puesto que contenía todos los motivos característicos de esta enzima.

En la estructura de la glioxalasa II humana se presentan dos dominios: un sándwich de cuatro capas  $\alpha$  similar a la observada en la familia de las enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas y principalmente un dominio helicoidal, y al igual que las demás metalo- $\beta$ -lactamasas, el sitio que une al metal (sitio Zn<sub>1</sub>) consiste en tres residuos conservados de histidina y un puente de ácido aspártico (His54, His56, His110, puente Asp134) y un puente de agua/hidróxido. El segundo sitio de unión (sitio Zn<sub>2</sub>) es coordinado por His59, His173, Asp58, Asp 134 y termina con una molécula de agua en fase terminal y un puente de hidróxido/agua. En la secuencia obtenida de *Taenia solium* se encontraron los residuos de histidina característicos del sitio activo, que como se reporta está localizado entre la región de 45-70 aa (ver figura 12). Sin embargo los sitios Zn<sub>1</sub> que se unen al metal son His54, His56, His108, puente Asp121 y en el sitio de unión de Zn<sub>2</sub> es coordinado con His59, His174, Asp60, Asp 121.

Además presenta tres de los 5 aa presentes en el sitio activo de la glioxalasa II (Lys217, Tyr219, Tyr248) faltó localizar los aa Arg325 y Lys328, ya que la secuencia sólo cuenta con 256 aa, esto sugiere la presencia de un centro metálico dinuclear y puede utilizar a los derivados de glutatión como sustrato.

Finalmente, la secuencia N-terminal de aminoácidos comparada con la glioxalasa II de humano refleja entre ellos una distancia evolutiva.

*T. solium* M H V L T T P A L S

*H. sapiens* M K V E V L P A L T

El análisis de alineamiento de GLO II de *Taenia solium*, muestra un porcentaje de identidad del 55% con *S. japonicum*, 49% con *S. mansoni* y de un 44% con *H.*

*sapiens*, lo que nos indica que presenta un porcentaje de identidad muy similar (aproximadamente del 50%) con *S. japonicum* y *S. mansoni* ya que estos organismos pertenecen al mismo *Phylum* que *Taenia solium*, y como se observa tiene aún más baja identidad con respecto a las glioxalidas II de mamíferos, lo que es muy interesante ya que esta baja identidad, sugiere más regiones diferentes que podrían ser utilizadas como antígenos para vacunas.

En conclusión la GLO II es una importante enzima desintoxicante de MGO y un blanco potencial para desarrollar vacunas o fármacos en contra de este parásito.

## 9. CONCLUSIONES

- I. Se obtuvo una sonda de ADNc (771 pb) que codifican para una glioxalasa II.
- II. *Taenia solium* cuenta con un gen que codifica para una glioxalasa II.
- III. Se presenta la primera caracterización de un gene para una glioxalasa II en Cestodos.
- IV. El MGO causa daño a nivel de membrana en el cisticerco después una exposición a concentraciones mayores a 5 mM en un tiempo de mínimo 6 horas.
- V. Este estudio abre un campo para estudiar a las enzimas desintoxicantes en el metabolismo de los cestodos.

## 10. ANEXO

### SOLUCIONES

Agar LB: Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,05% (p/v), NaCl 1% (p/v) y agar bacteriológico 1,5% (p/v).

Agar SOMB: Triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,05% (p/v), KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 1,5% (p/v).

Agar top SOBM: Triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,05% (p/v), KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 0,7% (p/v).

Amortiguador de cargado (DNA): EDTA 0,2M, azul de bromofenol 0,1%, xileno cianol FF 0,25%, Ficol en H<sub>2</sub>O 15%.

Amortiguador TAE: Tris-HCl-acético 0,04M, EDTA 0,002M

Amortiguador TE: Tris- HCl 10mM, EDTA 1mM, pH: 8,0.

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

Medio LB: Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,05% (p/v), NaCl 1% (p/v).

Medio SM: NaCl 0,58% (p/v), MgSO<sub>4</sub> •7H<sub>2</sub>O 0,2% (p/v), Tris-HCl 0,05% (p/v) pH: 7,5.

PBS: Fosfato monobásico de sodio 0,001M, fosfato dibásico de sodio 0,01M, NaCl 0,15M, pH: 7,2.

Solución 1 (Lisis alcalina): EDTA 10mM, Glucosa 50mM, Tris 25mM pH: 8,0.

Solución 2 (Lisis alcalina): NaOH 0,2M, SDS 1% (p/v).

Solución 3 (Lisis alcalina): Acetato de amonio 7,5M.

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

Solución de hibridación: SSC 5X, formamida 50% (v/v), SDS 0,2% (p/v).

Solución alcalina desnaturalizante: NaOH 0,5M, NaCl 1,5M.

Solución neutralizante: Tris-HCl 1M, NaCl 1,5M pH: 8,0.

Solución SSC 5X: NaCl 0,75M, citrato de sodio 0,0075M.

Solución de lavado: NaCl 0,2M, Tris-HCl 20mM pH: 7,2, EDTA 2mM, etanol 50% (v/v).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Assana E., Kyngdon C. T., Gauci C. G., et al. Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon, *Int. J. Parasitol*, vol. 40 (5), pp. 515-519, 2010.
- [2] Auburger G., Kurz A., The role of glyoxalases for sugar stress and aging, with relevance for dyskinesia, anxiety, dementia and parkinson's disease, vol. 3 no. 1, *AGING*, pp. 5-7, 2011.
- [3] Baynes J. W., Dominiczak M. H., *Bioquímica Médica*. Segunda edición. Elsevier, España, 2006.
- [4] Biagi F. *Enfermedades Parasitarias*, segunda edición. Ediciones científicas La prensa médica Mexicana, México, 1994.
- [5] Coyle C., Tanowitz H. Diagnosis and treatment of Neurocysticercosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2009, pp. 1-9.
- [6] Durán J.C. Neurocysticercosis: Problemas comunes. *Revista de Neurología*, pp. 52-55.
- [7] Flisser A., Vargas-Parada L., Laclette J. P., *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y ciencia*, pp. 24-33, 2006.
- [8] García H., Gonzales A., Martínez S., Gilman R., Teniasis/Cisticercosis por *Taenia solium*, un problema de salud pública en el Perú. Ministerio de salud, pp. 1-92, Lima, 2001.
- [9] Gutiérrez J., Ceja H., Pérez D., López A., Avilés K. I., Neurocysticercosis. *Investigación en salud*, vol. VI, no. 002, pp. 82-90, 2004.
- [10] Hardman J.G., Lee E., Limbird Ph., Goodman A., Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, décima edición. Vol. I, Mc Graw Hill, México, 2003.
- [11] Hossain A. M., Masayuki F., Purification of Glyoxalase I from Onion Bulbs and Molecular Cloning of Its cDNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (9), pp. 2007-2013, 2009.
- [12] Irsch T., Krauth-Siegel L. R., Glyoxalase II of African Trypanosomes Is Trypanothione-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279 no. 21, pp. 22209-22217, 2004.
- [13] Kadlubik D., Kravzov J., Rubio C., *Guía Farmacoterapéutica en Parasitosis y Micosis*. Secretaría de Salud, FeS-Z. UNAM, México, 2002.

- [14] Kalapos M. P., Methylglyoxal in living organisms Chemistry, biochemistry toxicology and biological implications. *Toxicology Letters* 110, pp. 145-175, 1999.
- [15] Kowald A. The glyoxalase system as an example of a celular maintenance pathway with relevance to aging, vol. 3, no. 1. *AGING*, pp. 17-18, 2011.
- [16] Lamothe R., García L., Helminthiasis del hombre en México. Tratamiento y profilaxis. AGT Editor, S.A, México, 1988.
- [17] Larralde C., de Aluja A., Cisticercosis. Guía para profesionales de la Salud, pp. 252, México, 2006.
- [18] Limphong P., Crowder M., Bennett B., Makaroff C., *Arabidopsis thaliana* GLX2-1 contains a dinuclear metal binding site, but is not a glyoxalase 2. *Biochem. J.* 417, pp. 323-330, 2009.
- [19] Limphong P., McKinney R., Adams N., Bennett B., Makaroff C., Gunasekera T., Crowder M. Human Glyoxalase II contains an Fe(II)Zn(II) Center but is Active as a Mononuclear Zn (II) Enzyme. *Biochemistry*, vol. 48, pp. 5426-5434, 2009.
- [20] Liu M., Yuan M., Luo M., Bu X., et al. Binding of curcumin with glyoxalase I: Molecular docking, molecular dynamics simulations, and kinetics analysis, 2009.
- [21] Mandell, Gerald M. D., Bennett, et al. Enfermedades infecciosas. Principios y Prácticas, 5ta. edición, vol. 2, Ed. Médica Panamericana, pp. 3941, Argentina, 2002.
- [22] Marasinghe G., Sander I., Bennet B., Periyannan G., Yang K.-W., Makaroff C.A., Crowder M., Structural studies on a mitochondrial glyoxalase II\*. *J Biol Chem.* 280(49): 40668–40675, 2005.
- [23] Martínez J. J., de Auja A., Ávila G., Aguilar L., Plancarte A., Jaramillo C.J., Teniosis t detección de anticuerpos anticisticerco en personas de una comunidad rural del estado de Guerrero. *Salud Pública de México*, vol. 45 (2), pp. 84-89, 2003.
- [24] Mondragón A., Plancarte A., Flisser A., El Diagnóstico de la cisticercosis humana por ELISA. *Salud Pública de México*, vol. 36 no. 4, pp. 393-398, 1994.
- [25] Morales J., Martínez J. J., Rosetti M., et al. Spatial Distribution of *Taenia solium* Porcine Cysticercosis within a Rural Area of Mexico, *PLOS ONE*, vol. 2 (9), pp. 1-7, 2008.
- [26] Murray P., Rosenthal K., Kobayashi G., Pfaller M., Microbiología Médica, 4ta. edición, Mosby, España, 2002.

- [27] Oya T., Hattori N., Mizuno Y., Miyata S., Maeda., Osawa T., Uchida K., Methylglyoxal Modification of Protein. Chemical and Immunochemical characterization of Methylglyoxal-Anarginine adducts. *The journal of Biological Chemistry*, vol. 274 no. 26, pp. 18492-18502, 1999.
- [28] Román G., Sotelo J., del Brutto O., Flisser A., Dumas M., Wadia N., Botero D., et al. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bulletin of World Health Organization*, vol. 78 (3), 399-406, 2000.
- [29] Ruiz J. L. Evaluación del conocimiento sobre teniasis/cisticercosis y uso de la educación popular como medida preventiva en la zona urbana de Leon, agosto a noviembre del 2003. Tesis, 2004.
- [30] Santel T., Pflug G., Hemdan M., et al. Curcumin inhibits Glyoxalase 1-A posible link to Its Anti-Inflammatory and Anti-Tumor Activity. *PLOS ONE*, vol. 3 (10), pp. 1-13, 2008.
- [31] Sarti E., La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*, vol. 39 no. 3, pp. 225-231, 1997.
- [32] Tay J., Microbiología y Parasitología Médicas, segunda edición. Méndez Editores, México, 1994.
- [33] Tay J., Velasco O., Lara R., Gutiérrez, Parasitología Médica, séptima edición, Méndez Editores, México, 2002.
- [34] Téllez E., Ramos M., Dufour L., Montante M., Aplicación del método de ELISA para el Diagnóstico de la cisticercosis. *Bol of Sanit Panam*, vol. 97 (1), 1984.
- [35] Thornalley P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.*, vol. 269, 1-11, pp. 1-11, 1990.
- [36] Vázquez G. Clonación y caracterización de la región estructural del gen para la glutatión S-transferasa de 25,5kDa de *Taenia solium*. Tesis, 2005.
- [37] Vázquez S., Ballesteros G., Flisser A., Schantz P., Hygiene and restraint of pigs is associated with absence of *Taenia solium* cysticercosis in a rural community of Mexico. *Salud Pública de México*, vol. 42 no. 4, pp. 574-576, 2001.
- [38] Winn (h.), Allen S., Janda W., Koneman E., et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. Sexta edición. Editorial Medica Panamericana, Argentina, 2008.

[39] Xu Y., Chen X. Glyoxalase II, a Detoxifying Enzyme of Glycolysis Byproduct Methylglyoxal and a Target of p63 and p73, Is a Pro-survival Factor of the p53 Family. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281 no. 36, pp. 26702-26713, 2006.