



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS COMPARATIVO PARCIAL DEL
CISTRÓN RIBOSOMAL DE TRES
TRICOMONÁDIDOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KARLA CONCEPCIÓN LÓPEZ PACHECO



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a todos aquellos que han creído y confiado en mí y me han apoyado incondicionalmente pero principalmente se la dedico con todo mi amor e infinito agradecimiento a mis padres: Concepción Pacheco Mijangos y Alberto López Mateos por todo el amoroso apoyo que me han brindado en todos los aspectos a lo largo de mi vida.

Me quejé por no tener zapatos, hasta que vi a alguien que no tenía pies.

Harold Abbot

A G R A D E C I M I E N T O S

*Agradezco a esa indescriptible fuente de fortaleza, **a Dios**, por haberme dado la vida, por llenarme de energía para poder culminar este proyecto tan importante en mi vida que no es más que uno de los pasos adelante para ser una mejor persona cada día. Gracias por ser la fuerza que siempre me ha impulsado a seguir en pie...*

A mis padres,

Mami y Papi: Nunca encontraré las palabras que describan cuanto les agradezco todo lo que han hecho por mí, por ser un ejemplo de fortaleza, honestidad y aplomo. Por siempre impulsarme y haberme dado las “herramientas” para salir adelante, pero sobretodo, por la paciencia, comprensión, consejos e incondicional cariño. Muchísimas gracias por todo, ya que sin su apoyo hubiera sido más difícil llevar a feliz término todo este inolvidable proceso. Los quiero mucho...

A mis hermanos,

Betin: Por estar ahí y ayudarme a reflexionar. Me sorprendes con algunos comentarios tan acertados, a veces se me olvida que es fácil ahogarse en un vaso de agua y de repente me recuerdas la simplicidad de las cosas. Chaparrito gracias por ser buen hermano. ¡Te quiero mucho!

Cyn: Por estar a mi lado en todo momento, por ser el “Pepe grillo” que me guía cuando me siento “perdida” y por siempre dar un toque de sensatez a cada una de las locuras que me caracterizan. ¡Te quiero mucho muñeca!

A mis amigas,

Miriam: Por siempre apoyarme incondicionalmente en las buenas y en las malas. Por siempre darme ánimos para salir adelante, ser tan buena amiga, apoyar cada una de mis locuras y tener la paciencia para aguantarme por más de 12 años. ¡Gracias “mija”!

Priscilla: Por ver siempre lo mejor de mí, apoyarme en todo momento y permitirme conocerte. ¡Gracias pequeña!

Gris: Por brindarme tu apoyo incondicional en todo momento, por permitirme conocerte y por tener tanta confianza en mí... ¡Peculias y yo te queremos mucho!

A Raulo,

Por apoyarme incondicionalmente y por crecer junto conmigo. Te quiero mucho...

A América, Diana, Juan Francisco y Yunuen,

Por todos aquellos inolvidables momentos compartidos durante nuestra estancia en nuestra querida Facultad.

A mis compañeros del lab,

Ana Lilia: Por ser una gran amiga, por todos los conocimientos compartidos y por guiarme durante la realización de este trabajo.

Karelia: Por permitirme conocerte y darme ánimos para seguir adelante. Gracias por todo aquello que me enseñaste.

Pablo: Por todos los consejos y ayuda brindada durante mi estancia en el lab.

Vanessa: Por más que una compañera, una gran amiga. Por toda la ayuda brindada durante la realización de este trabajo.

Chicos, muchas gracias por la calidez con la que me recibieron en el laboratorio, me hicieron sentir como en casa, por todo el apoyo, ánimos e inolvidables momentos compartidos. ¡Los quiero mucho!

A la Dra. Imelda López,

Por todas las enseñanzas, paciencia, tiempo invertido y apoyo brindado desde el primer momento en que la conocí. Por darme el regalo de su amistad además de ser excelente tutora. Muchas gracias por creer en mí, guiarme en todo momento y darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo. Siempre la llevaré en mi corazón. Mi vida no la concibo sin usted en ella. Una vez más, muchas gracias por todo...

Al Dr. Roberto Hernández y a la Dra. Ana Cevallos,

Por todos aquellos inolvidables momentos compartidos e invaluable comentarios a mi trabajo realizado durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del H. jurado,

Por tomarse el tiempo de revisar mi manuscrito.

A la Máxima Casa de Estudios por abrirme sus puertas y ser el lugar donde crecí y me formé en todos los aspectos además de haberme albergado en la **Facultad de Química** donde pasé los mejores años de mi vida.

ABREVIATURAS

A - Adenina

Caja TATA - Secuencia de DNA (TATAAT) muy conservada, rica en adenina y timina y que se encuentra 25 a 30 pb de la secuencia río arriba del punto de iniciación de la transcripción de muchos genes eucariontes.

C - Citosina

DNA - Acido desoxiribonucleico

DNAr - DNA ribosomal

G - Guanina

KB - Kilobases

NTS - Espaciadores no-transcritos

Pb - pares de bases

PM - Peso molecular

rInr - Iniciador ribosomal

RNA - Acido ribonucleico

RNAm - RNA mensajero

RNAr - RNA ribosomal

RNA_t - RNA de transferencia

Rx - Reacción

snRNA - RNAs pequeños nucleolares

snRNP - Ribonucleoproteinas pequeñas nucleolares

T - Timina

Tf - *T. foetus*

Tv - *T. vaginalis*

Tx - *T. tenax*

VIH - Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

	Contenido	Página
I.	Introducción	1
1.1	Breve descripción general de los tricomonádidos.	2
1.2	Clasificación taxonómica de los parabasálidos.	3
1.3	Filogenia molecular de los Parabasálidos.	4
1.4	Descripción de los tres tricomonádidos.	6
1.4.1	<i>Trichomonas vaginalis</i>	7
1.4.2	<i>Trichomonas tenax</i>	11
1.4.3	<i>Tritrichomonas foetus</i>	13
II.	Antecedentes	15
2.1	El Ribosoma.	16
2.2	El Nucleolo.	17
2.3	Genes ribosomales.	19
2.4	Organización de los Genes de RNA ribosomal.	20
2.5	RNA polimerasas.	21
2.5.1	RNA polimerasa I.	22
2.5.2	RNA polimerasa II.	22
2.5.3	RNA polimerasa III.	23
2.6	Transcripción por RNA polimerasa I.	23
2.7	Descripción de los elementos regulatorios en la región intergénica.	24
2.7.1	El promotor.	24
2.7.2	Elemento promotor río arriba, UPE.	25
2.7.3	Promotor espaciador.	25
2.7.4	Potenciadores.	25
2.7.5	Terminador proximal.	26
2.7.6	Elementos terminadores.	26
2.8	Regulación de la transcripción del DNAr.	27
2.8.1	Cromatina.	27
2.8.2	RNA polimerasa I.	27
2.9	Descripción del cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos.	28
2.9.1	El cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i>	28
2.9.2	El cistrón ribosomal de <i>T. tenax</i>	29
2.9.3	El cistrón ribosomal de <i>T. foetus</i>	29
III.	Planteamiento del Problema	32
3	Planteamiento del problema	33
IV.	Hipótesis y Objetivos	34
4.1	Hipótesis.	35
4.2	Objetivo general.	35
4.3	Objetivos particulares.	36
V.	Desarrollo Experimental	37

5.1	Estrategia experimental.	38
5.2	Metodología.	38
5.2.1	Cultivo de células	38
5.2.2	Extracción de DNA genómico de los tricomonádidos	39
5.2.3	Southern blot genómico.	41
5.2.4	Amplificación por PCR.	45
5.2.5	Clonación en vectores de clonación	48
5.2.5.1	Zero-Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen).	48
5.2.5.2	pGEM®-T Easy Vector System (Promega).	49
5.2.6	Aislamiento de clonas.	51
5.2.6.1	Hibridación en colonia.	51
5.2.6.2	Extracción de plásmidos (minipreps).	52
5.2.6.3	Digestión con la enzima de digestión <i>EcoRI</i>	53
5.2.7	Purificación de productos de PCR.	54
5.2.8	Secuenciación y análisis de secuencias.	54
5.2.9	Análisis bioinformático.	55
VI.	Resultados y Discusión	56
6.1	Extracción de DNA genómico de <i>T. vaginalis</i> , <i>T. tenax</i> y <i>T. foetus</i> .	57
6.2	Southern blot genómico de DNA obtenido de los 3 tricomonádidos.	57
6.2.1	Deducción del número de sitios de restricción para <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> en el cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos.	58
6.2.2	Determinación del tamaño del cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos	60
6.3	Análisis <i>in silico</i> y amplificación por PCR	61
6.3.1	Amplificación de la región intergénica del cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i> .	62
6.3.2	Amplificación de la región [16S + 5.8S] del cistrón ribosomal.	63
6.3.3	Amplificación de la región [intergénica + 28S] del cistrón ribosomal.	64
6.3.4	Tamaño aproximado del cistrón ribosomal de los tricomonádidos	65
6.4	Hibridación por Southern blot de los productos de PCR obtenidos	66
6.5	Clonación en el vector Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) y en el vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega).	67
6.6	Purificación del producto de PCR de la [región intergénica + 28S] de los fragmentos que muestran hibridación con la sonda heteróloga de cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i> .	71
6.7	Análisis de secuencias.	72
6.7.1	Amplificaciones de región intergénica.	72
6.7.2	Amplificaciones de región [16S + 5.8S].	72
6.7.3	Amplificaciones de región [intergénica + 28S].	73
6.7.4	Obtención de árboles filogenéticos	73
6.8	Análisis bioinformático de la secuencia del cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i> .	75

6.8.1	Análisis de la región intergénica.	75
VII.	Conclusiones	76
7	Conclusiones	77
VIII.	Perspectivas	79
8	Perspectivas	80
IX.	Bibliografía	81
9	Bibliografía	82
X.	Apéndices	87
10.1	Preparación del marcador de peso molecular.	88
10.2	Soluciones utilizadas	90
10.3	Cálculo del tamaño aproximado de las señales de hibridación.	94
10.4	Vectores de clonación.	95
10.5	Oligonucleótidos para secuenciación.	96
106	Secuencias y alineamientos.	97



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN



1.1 Breve descripción general de los tricomonádidos. (Yarlett N, 2001).

Los tricomonádidos son organismos protozoarios variables en cuanto a tamaño: de 5 a 25 μm de ancho por 2.5 a 12.5 μm de largo. El cuerpo es usualmente piriforme con un final anterior redondeado y un final posterior punteado. Tienen un núcleo en la parte anterior del cuerpo y anterior al núcleo está un blefaroplasto que constituye la base de todos los flagelos; está compuesto por varios cinetosomas los cuales dan lugar a los flagelos anteriores que pueden ser de tres a cinco. El flagelo recurrente emerge del canal periflagelar, se encuentra anclado a los organelos locomotores y está incorporado a la membrana ondulante la cual se extiende casi a todo lo largo de la célula. En algunas especies, el flagelo recurrente se extiende más allá de la membrana ondulante como un flagelo libre.

Un axostilo tipo vara surge del blefaroplasto atravesando longitudinalmente a la célula. La parte anterior del axostilo está alargado, formando una estructura sobre la cual se encuentra el núcleo. Esta estructura se encuentra continua con la pelta, formando así el complejo pelta-axostilo, una estructura membranosa en forma creciente, formada por dos láminas microtubulares. Esta estructura refuerza la pared del canal periflagelar que es de donde emerge el flagelo recurrente.

La costa es otro organelo que surge del blefaroplasto y que se supone da soporte a la membrana ondulante. Su presencia diferencia a la familia Trichomanadidae de otros parabasálidos.

En posición dorsal al núcleo se encuentra el aparato parabasal, el cual es una estructura en forma de "V" compuesto por el cuerpo parabasal y dos filamentos parabasales. De igual modo, tienen estructuras tales como retículo endoplásmico rugoso (rodeando al núcleo), aparato de Golgi, lisosomas y gránulos de glicógeno son visibles en micrografías de transmisión electrónica. En la micrografía electrónica de la figura 1 se observan algunos de los organelos de *T. vaginalis*.

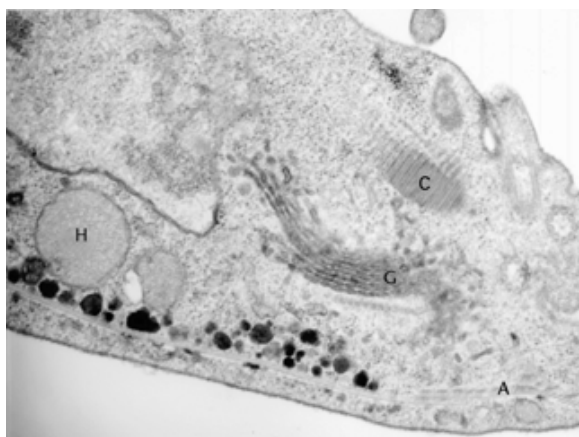


Fig. 1. Micrografía electrónica de transmisión de *T. vaginalis*. Se observa el aparato de Golgi (G), un hidrogenosoma (H), el axostilo (A) y la costa (C). Tomado de Yarlett, 2001.

1.2 Clasificación Taxonómica de los Parabasálidos.

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Trichomonas tenax</i>	<i>Tritrichomonas foetus</i>
Reino:	Protista	Protista	Protista
Subreino:	Dimastigota	Dimastigota	Dimastigota
Superphylum:	Tetramastigota	Tetramastigota	Tetramastigota
Phylum:	Axostylata	Axostylata	Axostylata
Clase:	Parabasalea	Parabasalea	Parabasalea
Orden:	Trichomonadida	Trichomonadida	Trichomonadida
Familia:	Trichomonadidae	Trichomonadidae	Trichomonadidae
Subfamilia:	Trichomonadinae	Trichomonadinae	Tritrichomonadinae
Género:	Trichomonas	Trichomonas	Tritrichomonas
Especie:	vaginalis	tenax	foetus

Los tricomonádidos están clasificados como parabasálidos, en el phylum axostylata que incluye todos los protozoarios que poseen un axostilo compuesto por miles de microtúbulos cuya función principal es darle movilidad a la célula. Los parabasálidos son una clase heterogénea, sin embargo, todos ellos poseen cuerpos parabasales. Estos organismos fagocitan bacterias, eritrocitos y



fragmentos celulares que pueden ser observados en las vacuolas fagocíticas o pinocíticas.

Los hidrogenosomas son considerados como una mitocondria divergente y se encargan de sustituir la función de las mitocondrias, aunque son menos eficientes en la producción de energía y además generan hidrógeno molecular como desecho (Alderete *et al.*, 2004).

1.3 Filogenia molecular de los parabasálidos.

La comparación de las secuencias de RNA ribosomal de la subunidad menor, indican que los tricomonádidos divergieron en la base del tronco eucariótico después de los diplomonádidos y microsporidia pero antes de *Euglenozoa* (Gunderson, *et al.*, 1995), como se observa en la figura 2.

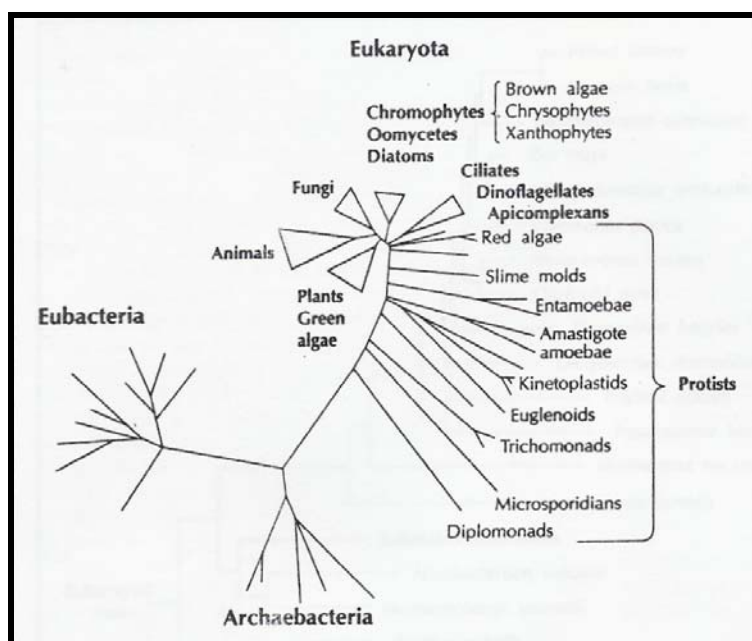


Fig. 2. Árbol filogenético derivado de la similitud entre las secuencias de la subunidad menor del RNAr. Tomada de Sogin ML, 1991.



Diferentes características bioquímicas y moleculares han sido utilizadas para determinar las relaciones filogenéticas entre órdenes con los parabasálidos y también para determinar la relación de los parabasálidos con otros protistas (Yarlett, 2001). Es por esto que se han utilizado diferentes marcadores filogenéticos tales como las secuencias de la subunidad mayor y menor, así como diferentes proteínas.

Se ha considerado que los tricomonádidos por no tener mitocondria son organismos simples. Sin embargo, el hecho de poseer un organelo sucesor a la mitocondria sugiere que no son tan simples como parecen (Dacks JB et al., 2008) y es por esto que se considera que el árbol filogenético derivado de las secuencias de la subunidad menor de RNA ribosomal resulta "elitista" ya que las especies de mamíferos y en particular *Homo sapiens* están localizadas en la corona como si fuesen lo "moderno" ya que permite asumir que a partir de un punto determinado deja de haber evolución.

En el árbol filogenético de la figura 3 se observa que no hay una raíz como tal y describe un evento de "big bang" en el que todos los subgrupos de eucariotas se encuentran a un mismo nivel. Las Trichomonas se encuentra en la rama Excavata junto con *L. major*, *T. brucei*, *E. gracilis* y *G. intestinalis*.

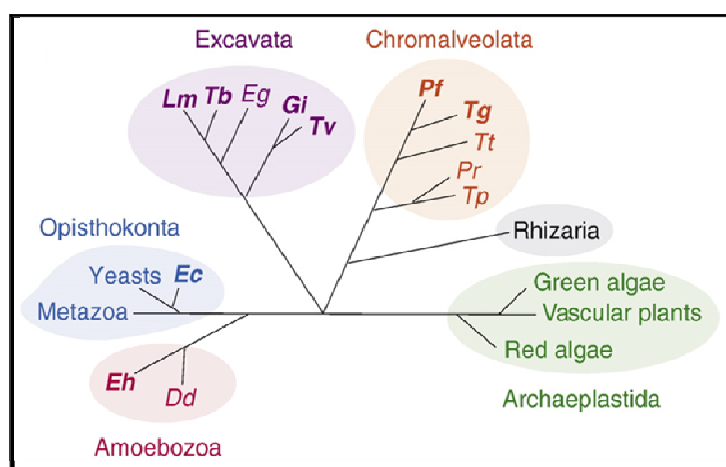


Fig. 3. Árbol filogenético "igualitario" basado en Adl et al. Figura tomada de Dacks JB, Walker G y Field MC, 2008.



1.4 Descripción de los tres Tricomonádidos.

1.4.1 *Trichomonas vaginalis*.

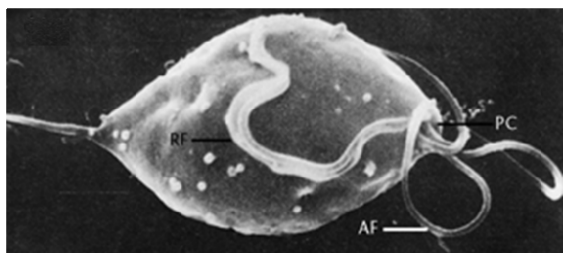


Fig. 4. Micrografía electrónica de *T. vaginalis*. Estructura característica: 4 flagelos anteriores (AF), flagelo recurrente (RF) emergiendo del canal periflagelar (PC) y la membrana ondulante (UM). Tomado de: Yarlett N, 2001.

1.4.1.1 Estructura, Biología y Fisiología.

Trichomonas vaginalis es un protozoo microaerófilico con un requerimiento menor a 0.25 $\mu\text{mol/L}$ de oxígeno. La forma infectante de este tricomonádido, el trofozoito, mide de 7 a 30 μm de longitud y de 5 a 15 μm de ancho; presenta cuatro flagelos anteriores y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante, confiriendo a los parásitos motilidad espasmódica (Alderete *et al.*, 2004) (ver figura 4).

T. vaginalis reside en el tracto genitourinario humano y es transmitido directamente por contacto sexual. Existe como trofozoito flagelado y no tiene estadio de quiste, como resultado de esto, el parásito no puede sobrevivir fuera del hospedero aunque se ha observado que bajo condiciones de estrés, puede haber formación de pseudoquistes (Abonyi, 1995).

Su reproducción es asexual por fisión binaria (Vanacova, *et al.*, 2003). La caracterización de la mitosis en *T. vaginalis* ha demostrado la presencia de cinco fases mitóticas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Gómez-Conde, *et al.*, 2000).



El tamaño de su genoma se estimó mediante ensayos de cinética de reasociación como un genoma de 2.5×10^7 pb y que más del 50% contiene secuencias repetidas (Wang y Wang, 1985). Sin embargo, recientemente fue publicado el genoma del parásito (Carlton JM, et al, 2007) donde determinaron que su tamaño es de aproximadamente 1.76×10^8 pb el cual parece exagerado considerando el nivel evolutivo del parásito.

La observación microscópica de células en metafase ha permitido identificar seis cromosomas en *T. vaginalis* que parecen ser haploides. Los cromosomas más largos son identificados precisamente por su tamaño; el segundo par de cromosomas son más pequeños que el primer par pero más largos que los otros 2 pares y el tercer y cuarto par tienen tamaños similares entre si (Yuh YS, et al., 1997). El contenido de G + C es de ~36% (Drmotá and Král, 1997).

1.4.1.2 Ciclo de Vida de *Trichomonas vaginalis*.

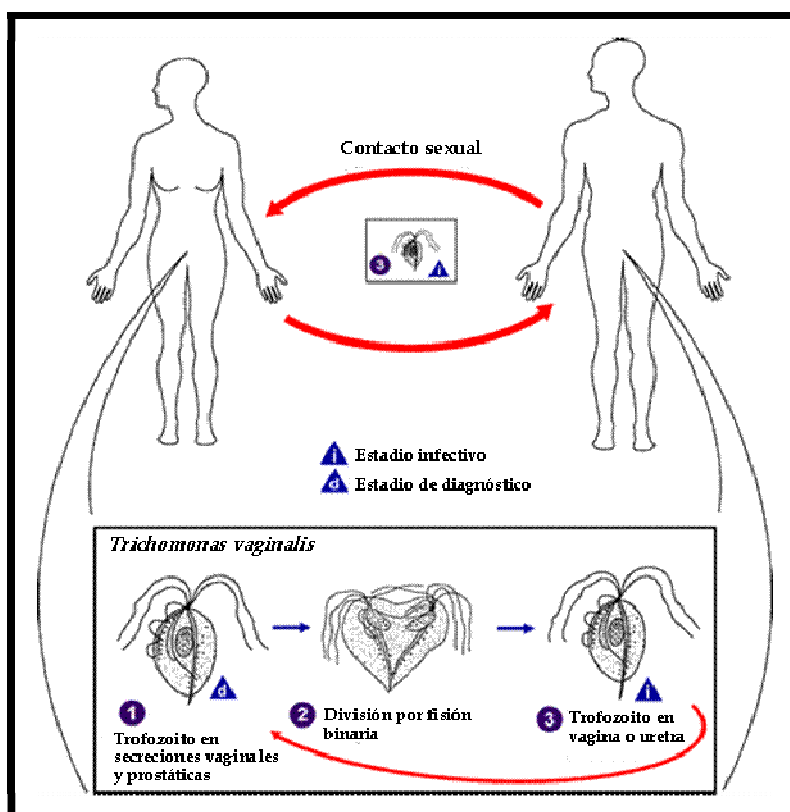




Fig. 5. Ciclo de vida de *T. vaginalis*. Modificada de http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/images/Trichomonas_LifeCycle.gif

Tal como se observa en la figura 5, el ciclo de vida de este parásito consiste en la transmisión por contacto sexual por lo que en mujeres puede encontrarse en vagina y uretra, mientras que en los hombres puede hallarse en uretra, próstata y epidídimo. Una vez que la infección se ha desarrollado y las condiciones del medio son favorables para los trofozoitos de *T. vaginalis*, estos se dividirán incrementando su número.

1.4.1.3 Tricomonosis.

Trichomonas vaginalis causa tricomonosis, la enfermedad de transmisión sexual (ETS), no-viral, más común a nivel mundial (WHO 2001). Está asociada con vaginitis, uretritis y cistitis (Swygard H, et al., 2004). Por otro lado, esta enfermedad ha tenido un alto impacto debido al aumento en el riesgo de la transmisión y de la infección por VIH, ya que la agresiva respuesta inmune provocada por este parásito promueve la infiltración de gran cantidad de leucocitos (aun en pacientes asintomáticos) lo cual incrementa el número de células blanco disponibles y el acceso viral al torrente sanguíneo (Sorvillo F, et al., 2001).

1.4.1.4 Manifestaciones Clínicas.

En las mujeres, los periodos de incubación van desde tres hasta 28 días y la sintomatología (cuando se presenta) consiste en abundante descarga vaginal espumosa y de color amarillo verdoso, prurito e irritación. Otro signo clínico es el llamado "cérvix de fresa", detectado mediante colposcopia (Schwebke JR y Burgess D, 2004). Algunas mujeres presentan únicamente flujo escaso, y muchas cursan como portadoras asintomáticas durante largos periodos de tiempo, aunque los síntomas pueden aparecer en cualquier momento.



Epidemiológicamente, *T. vaginalis* puede co-existir con *Neisseria gonorrhoeae* y/o *Chlamidia trachomatis* (Swygard H, et al, 2003). La tricomonosis está caracterizada por un aumento en el pH vaginal de 4 a 7 generado por el descenso o eliminación de algunas especies de *Lactobacillus* presentes como flora habitual (Meysick K y Garber GE, 1995) y responsables del pH ácido normal por la producción de peróxido de hidrógeno. Adicionalmente, la menstruación crea un ambiente adecuado para la reproducción del parásito ya que le provee grandes cantidades de hierro cuando su requerimiento es hasta 250 μ M, lo cual aumenta la habilidad de *T. vaginalis* para atacar el epitelio vaginal (Lehker MW, et al., 1991).

En general, los hombres no suelen desarrollar síntomas, sin embargo, puede manifestarse con uretritis la cual generalmente desaparece en diez días. En hombres con sintomatología, se presentan descargas mucopurulentas o claras y disuria así como irritación. Las complicaciones pueden resultar en prostatitis, balanopostitis, epididimitis e infertilidad mientras que en mujeres están asociadas con erosión cervical, cáncer cervical e infertilidad (Cudmore SL, et al., 2004).

1.4.1.5 Tratamiento.

El tratamiento de elección es con metronidazol, que consiste en una sola dosis de 2 gramos vía oral y tiene una efectividad del 97% (Lossick JG, 1980) y en paralelo debe tratarse a la o las parejas de cada paciente. A pesar de crear controversia el hecho de llevar a cabo el tratamiento en mujeres embarazadas, no ha sido documentado ningún caso en el cual se atribuya una malformación en el producto debido a esto, aun cuando haya sido usado en el primer trimestre (Schwebke JR y Burgess D, 2004).

Modo de acción. El metronidazol es una molécula pequeña la cual entra al parásito por difusión pasiva. El fármaco por si solo es inactivo, pero es reducido anaeróbicamente en los hidrogenosomas por la enzima piruvato ferredoxina



oxidoreductasa lo cual resulta en la formación de un anión radical nitro que es citotóxico. Se piensa que el radical nitro se une al DNA (específicamente en residuos de timina y adenina), interrumpiendo o rompiendo las cadenas y llevando a la célula a muerte celular (Cudmore SL, et al., 2004). Sin embargo, hay casos en los que se presenta resistencia al tratamiento con metronidazol por lo que se han identificado dos tipos de resistencia: aeróbica y anaeróbica (Cudmore SL, et al., 2004).

En la resistencia aeróbica están involucradas las rutas depuradoras de oxígeno y ferredoxina. Estas rutas no están implicadas en la resistencia anaeróbica, la cual está dirigida por la reducción de la actividad de la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa (Cudmore SL, et al., 2004) y para los cuales el fármaco de elección es el tinidazol en una sola dosis de 2 gramos vía oral (Soper D, 2003).



1.4.2 *Trichomonas tenax*.



Fig. 6. Micrografía electrónica de barrido de *T. tenax*. La estructura característica: 4 flagelos libres (FL), axostilo (Ax) y la membrana ondulante (MO). Tomado de: Ribaux CL, 1979.

1.4.2.1 Estructura, Biología y Fisiología.

Trichomonas tenax mide aproximadamente 7 μm de longitud. Presenta cuatro flagelos anteriores, la membrana ondulante abarca casi dos tercios del cuerpo y no presenta flagelo recurrente. El cuerpo parabasal es elongado y prominente (Noble E, et al., 1989) (ver figura 6). Se encuentra en la cavidad oral humana, generalmente como comensal y solo en caso de compromiso inmunológico se puede asociar con *Streptococcus mutans* y causar gingivitis. (Alderete et. al., 2004). El hallazgo de *T. tenax* en la cavidad bucal, es indicio de una higiene deficiente y por lo tanto, su frecuencia aumenta de manera significativa en aquellos pacientes que presentan problemas periodontales.

T. tenax se caracteriza por la ausencia de axostilo asociado a hidrogenosomas (gránulos paraxostilares) aunque si están presentes los hidrogenosomas asociados a la costa (gránulos paracostales) (Yarlett N, 2001). Este organismo se encuentra solamente como trofozoito y no tiene estadio de quiste, aun en presencia de condiciones adversas. Al igual que en *T. vaginalis*, su reproducción es asexual por fisión binaria.



El gen de la subunidad menor de RNA ribosomal (cepa ATCC30207) fue amplificado por PCR y el producto resultante de 1.55 Kb fue clonado en pUC18. La secuencia mostró un contenido de G + C de 48% (Fukura K, et al., 1996), sin embargo, desde esa fecha hasta ahora es lo único que se conoce acerca de la secuencia del DNA ribosomal de este tricomonádido.



1.4.3 *Tritrichomonas foetus*.

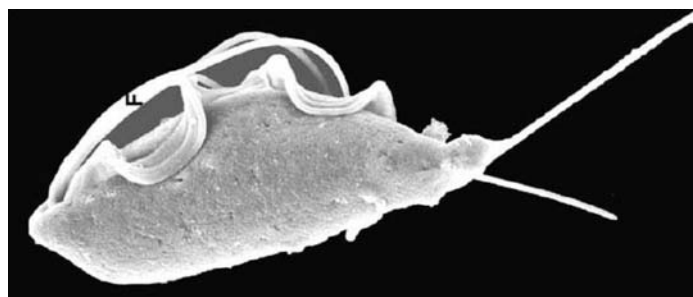


Fig. 7. Microscopia electrónica de barrido de *T. foetus*. Tomada de Benchimol M, 2005.

1.4.3.1 Estructura, biología y fisiología.

Tritrichomonas foetus mide 20 μm de longitud y 10 μm de ancho; presenta tres flagelos anteriores y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante con tres a cinco ondas que le confieren un movimiento vibratorio característico (Rae DO y Crews JE, 2006) y que además se extiende a todo lo largo de la célula (Yarlett N, 2001). Se distingue por una pelta pequeña sino ausente; la costa es prominente y el axostilo es grueso con extensiones ventrolaterales desde su inicio hasta la pelta (Yarlett N, 2001). En la figura 7 se observa una micrografía electrónica de *T. foetus*.

T. foetus se reproduce de manera asexual por fisión binaria (Vanacova, et. al., 2003). El tamaño de su genoma se estimó mediante ensayos de cinética de reasociación como un genoma de 2.5×10^7 pb con un contenido de G + C igual a ~31% (Wang y Wang, 1984) y tiene 5 cromosomas (Xu, Lun y Gajadhar, 1998).

T. foetus infecta el tracto genitourinario en ganado, causando así tricomonosis bovina. Tiene una distribución a nivel mundial y causa significantes pérdidas económicas atribuidas a la infertilidad o abortos (Tachezy J, et al., 2002). El parásito es transmitido a través del prepucio de los toros a la vagina y útero de las vacas durante el coito y su principal manifestación clínica es el aborto durante la primera mitad de la gestación (Penedo-Carvalho K y Rocha-Gadelha AP, 2007).



1.4.3.2 Manifestaciones clínicas.

Los efectos de la infección en los machos son limitados y asintomáticos, mientras que los efectos clínicos negativos radican en las hembras. *T. foetus* se localiza en las secreciones del pene, prepucio y uretra. Microscópicamente, el parásito no invade el epitelio.

Una vez que una hembra ha sido infectada se desarrolla vaginitis leve la cual es imperceptible por lo que el organismo tiene tiempo de invadir el útero a través del cérvix y una a dos semanas después colonizar por completo el tracto reproductivo. (Xu, Lun y Gajadhar, 1998).

1.4.3.3 Tratamiento.

Desafortunadamente no hay un tratamiento efectivo para la tricomoniasis bovina, aunque fármacos como ipronidazol y dimetridazol han sido utilizados (Penedo-Carvalho K y Rocha-Gadelha AP, 2007). Sin embargo, no hay medicaciones aprobadas ya que los medicamentos anteriores están estrictamente prohibidos en animales con fines de consumo humano (Xu, Lun y Gajadhar, 1998).



CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 El Ribosoma.

Las células se caracterizan por la complejidad de su estructura lo cual se manifiesta en diferentes niveles de organización. La relación estructura-función de los ribosomas resulta de gran interés, pues son los organelos destinados a la síntesis de proteínas.

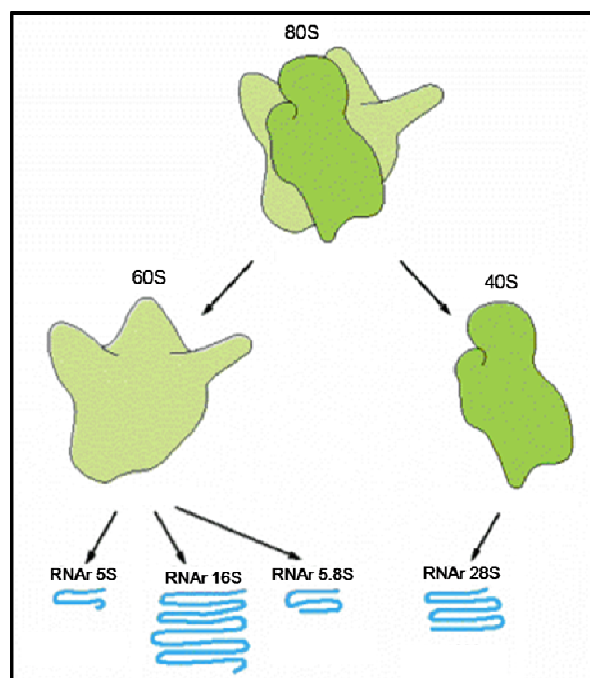


Fig. 8. Ribosoma eucariótico típico.
Modificada de Bruce A *et al.*, 2002.

En la figura 8 se muestra el esquema de un ribosoma eucariótico típico; como se observa, está formado por cuatro moléculas de RNA ribosomal (28S, 18S, 5.8S y 5S) y más de 70 proteínas; dos tercios de la masa total del ribosoma están formados por RNAr. De este modo, la estructura y función de los genes que codifican para RNA ribosomal (DNAr) es de especial interés ya que son transcritos por la RNA polimerasa I, responsable de transcribir únicamente estos genes (Mandal RK, 1984).

El ribosoma está formado por 2 subunidades, 40S y 60S. Estos complejos están definidos por sus coeficientes de sedimentación aparentes [unidades Svedberg



(S)]. La subunidad menor (40S) constituye el soporte sobre el que los RNAt se unen a los codones de RNAm correspondiente, ya que se encarga de unir el RNA mensajero y el anticodón del RNAt correspondiente y es responsable de la fidelidad de la traducción al asegurar el apareamiento entre el codón y el anticodón durante el proceso de codificación (Doudna y Rath, 2002). Por su parte, la subunidad mayor (60S) es la que se une al extremo terminal del RNAt y se encarga de catalizar la formación del enlace peptídico durante la síntesis de proteínas (Garrett R, 1999).

Para la biosíntesis de los componentes de los ribosomas son requeridas las 3 RNA polimerasas (Sollner-Webb B y Mougey EB, 1991); los productos de cada una de ellas constituyen los bloques necesarios para la formación de la unidad estructural y funcional. La RNA pol I sintetiza las moléculas ribosomales 28S, 18S y 5.8S. La RNA pol II produce los RNA mensajeros que codifican para la síntesis de las proteínas ribosomales y la RNA pol III sintetiza el RNA ribosomal 5S (Doudna y Rath, 2002).

Los bloques necesarios para la construcción del ribosoma llegan al nucleolo como partículas pre-ribosomales, cruzan el nucleoplasma, pasan a través de los poros nucleares para finalmente ensamblarse en lo que constituye un ribosoma funcional en el citoplasma, lo cual requiere una gran coordinación entre varios de los compartimentos celulares (Doudna y Rath, 2002).

2.2 El nucleolo.

La mayor función asociada con este organelo es la biogénesis del ribosoma, un proceso que implica la transcripción del DNAr, procesamiento del transcrito de pre-RNAr y el ensamblaje del RNAr con las proteínas ribosomales (Mélèse y Xue, 1995). De hecho, los genes ribosomales son los elementos centrales del nucleolo y están localizados en sitios especiales llamados regiones organizadores nucleolares (NOR). Rodeando las NOR se encuentra una red de filamentos que

forman el soporte estructural u organización para el arreglo del DNAr transcripcionalmente activo y/o el ensamblaje y transporte de las subunidades ribosomales (Hannan KM, 1998).

Se ha observado que el soporte nucleolar está ausente en células en las cuales la síntesis de rRNA se encuentra inactiva, tal como en eritrocitos nucleados y espermatoцитos (Reeder RH, 1990).

El típico nucleolo consiste de 3 subestructuras que han sido nombradas de acuerdo a su apariencia en microscopía electrónica de transmisión: 1) Centros fibrilares (FC), 2) Componente fibrilar denso (DFC) y 3) Componente granular (GC) (Hannan KM, 19998). En la figura 9 se muestra una micrografía donde se pueden observar estas estructuras.

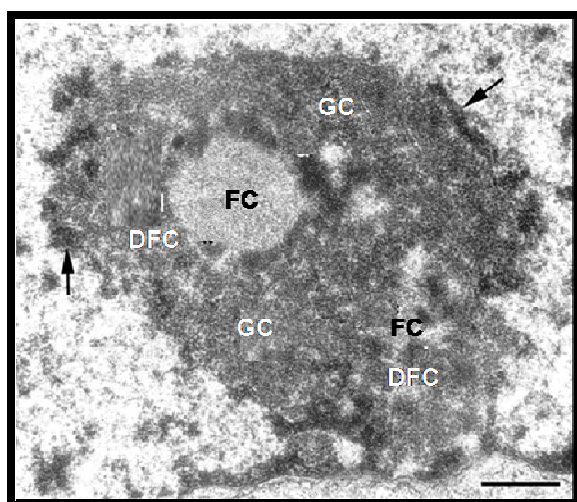


Fig. 9. Nucleolo de una célula de ratón fijado *in situ*. Las flechas indican cromatina perinuclear condensada. El centro fibrilar está señalado con **FC**, el componente granular denso con **DFC** y el componente granular con **GC**. Figura tomada de Raska I. *et al.*, 2004.

Los centros fibrilares son regiones pálidas en el centro del nucleolo. El DNAr, la RNA pol I y factores de transcripción tales como UBF, SL-1 y topoisomerasa I han sido localizados en la periferia de los centros fibrilares por lo que es aquí donde son generados los transcritos de RNAr primarios.



El componente fibrilar denso rodea a los centros fibrilares y se caracteriza por contener fibrillas de 3 a 5 nm densamente empacadas y un alto contenido de fibrilarina la cual es una proteína conocida por su asociación con otras proteínas requeridas en estadios tempranos del procesamiento de RNAr, tales como U3, U8 y U13 RNPs pequeños nucleolares (snRNP). Este es el lugar donde se lleva a cabo la transcripción de los genes (Hernández-Verdun, 1991).

Finalmente, el componente granular se localiza en la periferia del nucleolo y consiste de estructuras granulares con un diámetro de 10 a 15 nm, algunas veces organizadas en cadenas cortas. Los estadios tardíos de maduración de las partículas precursoras de ribosomas, antes de ser exportadas al citoplasma han sido localizados en esta región (Hannan KM, 1998).

2.3 Genes Ribosomales.

Como ya se ha mencionado, las moléculas ribosomales 18S, 5.8S y 28S son transcritas por la RNA polimerasa I. En la mayoría de los eucariontes los genes se encuentran arreglados en unidades repetidas en forma de "tándem". La transcripción del DNAr así como el procesamiento de los RNAr ocurren en el nucleolo (Hannan KM, 1998).

La transcripción de los genes ribosomales se ha observado en algunas células como oocitos maduros de insectos y anfibios (como *Xenopus*). Esta actividad ha podido ser visualizada mediante micrografías electrónicas conocidas como "Miller Spreads" donde gradientes de ribonucleoproteínas nacientes densamente empacadas han sido observadas al emerger del DNAr, formando patrones conocidos como "árboles de navidad" (White RJ, 2001) tal como se observa en la figura 10.

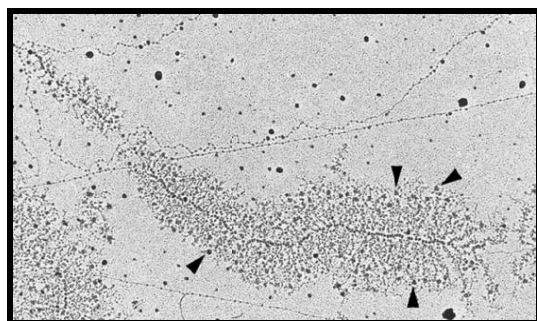


Fig. 10. Micrografía electrónica de una célula de ratón. El árbol de navidad corresponde a un cistrón ribosomal en actividad de transcripción. Las flechas indican el extremo 5' de los transcritos recién sintetizados. Figura tomada de Raska I. *et al.*, 2004.

Se ha observado que los genes pueden estar activos o inactivos, lo que se ha propuesto en el modelo binario de los genes ribosomales (Reeder RH, 1999; Grummt I, 2003) donde cada gen es una unidad binaria que puede estar encendida o apagada (Raska I, *et al.*, 2004). Se ha calculado que hay aproximadamente una RNA polimerasa por cada 100 pb, elongándose así aproximadamente 30 nucleótidos por segundo. En seguida, el transcrito nascente es procesado y ensamblado en ribosomas mientras están siendo sintetizados (White RJ, 2001).

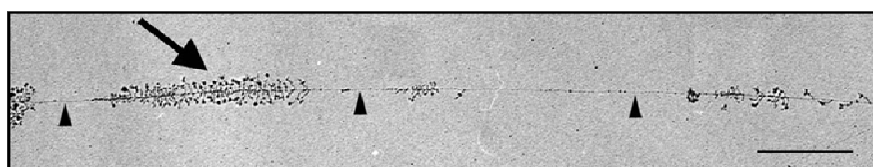


Fig. 11. "Miller Spreads" de genes ribosomales de levadura. La flecha señala aquel gen expresado activamente. Los triángulos señalan cada unidad de DNAr. Figura tomada de Raska I, *et al.*, 2004.

En la figura 11 se observan tres genes de RNAr, donde solo uno de ellos es transcripcionalmente activo.

2.4 Organización de los Genes de RNA Ribosomal.

Los genes de RNA ribosomal (DNAr) se encuentran organizados en unidades de transcripción separadas por unidades espaciadoras no-transcritas (NTS), también llamadas regiones intergénicas. Las unidades de transcripción de pre-RNAr

corresponden a secuencias codificadoras correspondientes a las moléculas maduras 18S, 28S y 5.8S (o sus equivalentes) y las secuencias de los espaciadores transcritos externos e internos (ETS e ITS, respectivamente). Estas últimas son transcritas como parte de la molécula de pre-RNAr, sin embargo, son perdidas durante la maduración de las moléculas de rRNA (Mandal RK, 1984).

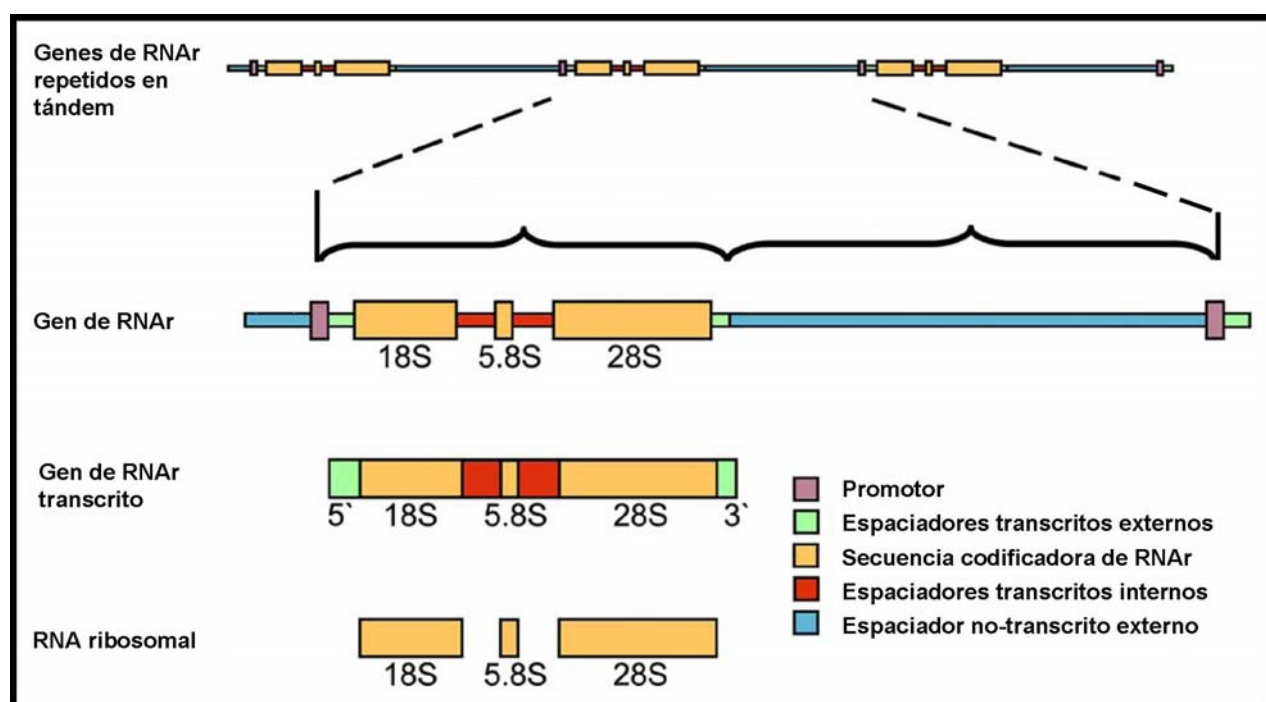


Fig. 12. Esquema general de los genes ribosomales y sus transcritos. Figura tomada de Raska I. *et al.*, 2004.

Como puede observarse en la figura 12, una unidad de transcripción y su correspondiente región intergénica constituye una unidad repetida de DNAr. El arreglo en tándem de estas unidades repetidas es la característica básica en la organización de los genes ribosomales en la mayoría de los organismos eucariontes (Raska I, 2004).

2.5 RNA Polimerasas.

En los organismos procariontes, se encuentra un solo tipo de RNA polimerasa encargada de sintetizar todo el RNA contenido en la célula. Sin embargo, en los



organismos eucariontes hay tres tipos de RNA polimerasa: RNA pol I, RNA pol II y RNA pol III. Las tres RNA polimerasas difieren entre sí en especificidad, localización y susceptibilidad a inhibidores (Brown WM y Brown PW, 2002).

Las RNA polimerasas están formadas por varias subunidades por lo que cada una de ellas requiere distintos factores que le provean selectividad en su actividad correspondiente para permitir que ocurra la transcripción (Brown, et. al. 2002). Por otro lado se ha descrito que las proteínas actina y miosina I nucleares están asociadas con el DNAr y son requeridas para la transcripción (Grummt I, 2006).

2.5.1 RNA polimerasa I.

Se encuentra localizada en el nucléolo donde se encarga de transcribir las unidades repetidas de los genes de RNAr y es sensible a la α -amanitina.

El presente trabajo se encuentra estrechamente relacionado con la actividad de esta RNA polimerasa, por lo que nos enfocaremos en ella más adelante.

2.5.2 RNA polimerasa II.

Los precursores del RNA mensajero así como varias moléculas pequeñas de RNA son sintetizadas por esta RNA polimerasa. Está localizada en el núcleo y está formada por 12 subunidades. Al igual que la RNA polimerasa I es sensible a la α -amanitina.

Los promotores de esta RNA polimerasa, por lo general contienen una “caja TATA” alrededor de 15 a 25 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción.



2.5.3 RNA polimerasa III.

Se localiza en el núcleo y sólo es sensible a la α -amanitina en algunas especies. Es la encargada de transcribir los genes de RNAr 5S, los genes de RNA de transferencia (RNAt) y los genes de RNA pequeños nucleolares (snRNA).

Se han descrito dos tipos de promotores para esta RNA polimerasa: uno abajo de los genes de RNAr 5S y de los genes de RNAt. Está localizado en +55 respecto al sitio de inicio de la transcripción y es conocido como "Caja A". En la posición +80 a +90 se localiza una segunda secuencia conocida como "Caja B". Ninguna de estas dos secuencias corresponde a la de la "Caja TATA". El segundo tipo se localiza río arriba de los genes de snRNA y en estos se encuentra la "Caja TATA".

2.6 Transcripción por RNA Polimerasa I.

Los promotores para RNA pol I se caracterizan por la ausencia de la caja TATA y la presencia de dos sitios clave: una región rica en G+C, localizada aproximadamente de -45 a +20, y una segunda región rica en G+C llamada elemento control río arriba (UCE), ubicada aproximadamente de -180 a -107 respecto al sitio de inicio de la transcripción (Brown, et. al. 2002).

La transcripción se lleva a cabo esencialmente en 4 pasos: 1) iniciación, 2) unión al promotor, 3) elongación y 4) terminación. La iniciación incluye el ensamblaje del complejo de pre-iniciación en el promotor del gen, la isomerización del complejo cerrado para formar un complejo de iniciación abierto y finalmente, la generación del primer enlace fosfodiéster (Hannan KM, *et al.*, 1998).

2.7 Descripción de los elementos regulatorios en la región intergénica.

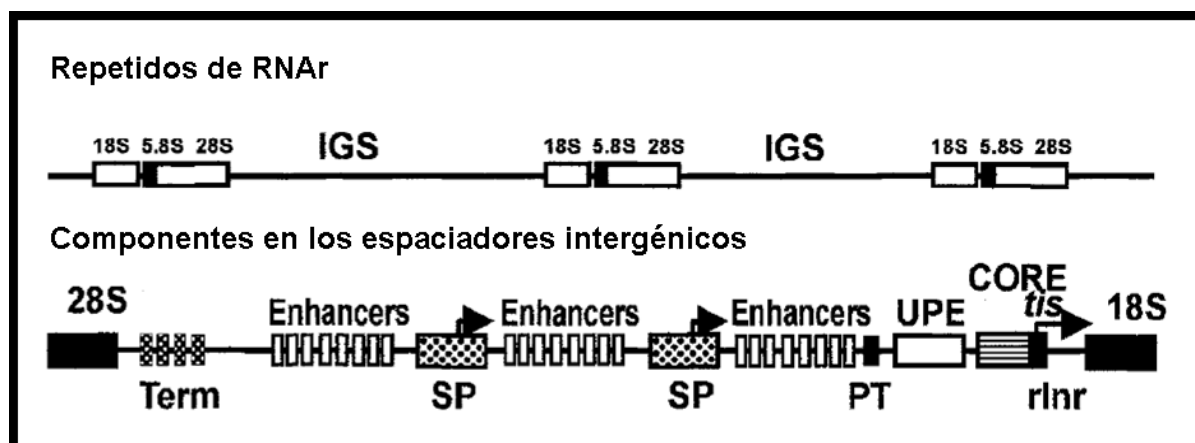


Fig. 13. Organización general de las unidades de transcripción de RNA pol I. El sitio de inicio de la transcripción está indicado por *tis*. Figura tomada de Paule MR y White RJ, 2000.

En comparación a la transcripción por RNA pol II, pol I requiere menos factores de transcripción (Paule MR y White RJ, 2000). La transcripción puede llevarse a cabo con la simple unión de un factor de unión al promotor, sin embargo, el “elemento promotor río-arriba” (UPE), los elementos potenciadores (enhancers) y el terminador proximal (PT) facilitan este paso. De aquí que la presencia de diferentes elementos en la región intergénica están involucrados en este proceso. En la figura 13 se muestra un esquema general de los componentes de las regiones intergénicas al que se hará referencia para la descripción de los elementos.

2.7.1 El promotor.

Es la secuencia necesaria y suficiente para la iniciación de la transcripción en la mayoría de las especies. Contiene el iniciador ribosomal (rInr) la cual es una secuencia rica en A-T alrededor de la posición +1 que es parecida a la secuencia de la caja TATA.



2.7.2 Elemento promotor río arriba, UPE.

Este es un elemento que ayuda al ensamblaje o estabilización del complejo formado en el promotor, consiste de ~150 a 200 pb río arriba de la posición +1. Estimula que se lleve a cabo la transcripción, sin embargo, no es un requerimiento absoluto para el inicio de la transcripción.

2.7.3 Promotor espaciador.

La función de este promotor aún es desconocida, sin embargo, se ha demostrado que los transcritos intergénicos generados son requeridos para establecer y mantener una configuración heterocromatínica en el promotor de los genes ribosomales, lo cual podría revelar que estos transcritos sirven como control epigenético del locus de DNAr (Mayer et. al., 2006).

2.7.4 Potenciadores.

En *Xenopus laevis* y *Xenopus borealis*, se han descrito arreglos de secuencias repetidas de 60 y 81 pb intercaladas entre si y que se ha comprobado sirven como dominios que unen factores de transcripción esenciales para la activación del promotor (Caudy y Pikaard, 2002). Esto confirma la hipótesis de que los potenciadores evolucionaron a partir de espaciadores promotores por duplicación repetitiva (Paule y White, 2000).

De igual forma, en *X. laevis* y *X. borealis* se han descrito dos importantes regiones de secuencias repetidas conocidas como región 0 y región 1 que consisten en secuencias repetidas de 34 y 100 pb respectivamente. Se ha llegado a la conclusión que las regiones 0/1 son importantes enhancers de la transcripción quizá más fuertes que los secuencias repetidas de 60/81 pb (Moss et. al, 1980; Caudy y Pikaard, 2002) pero básicamente sirven para estimular la transcripción del DNAr. En la figura 14 se muestra un esquema de la organización de los espaciadores intergénicos en *Xenopus*.

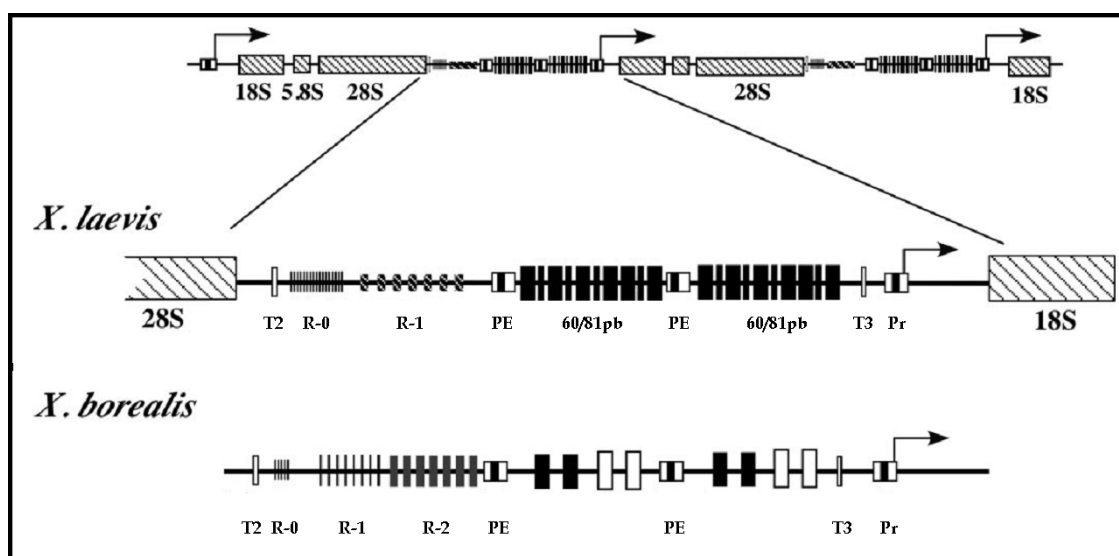


Fig. 14. Organización de los genes ribosomales y espaciadores intergénicos de *Xenopus*. Tanto en *X. laevis* como en *X. borealis*, las secuencias repetidas de la región 0 comparten una secuencia idéntica al promotor. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción. T2: terminador T2; R-0: región 0; R-1: región 1; R-2: región 2; PE: promotor espaciador; 60/81pb: repetidos de 60 y 81 pb; T3: terminador T3; Pr: promotor génico. Figura tomada de Caudy A, *et al.*, 2002.

2.7.5 Terminador proximal.

Este elemento se localiza entre los potenciadores (enhancers) y el UPE y tiene varias funciones entre las cuales destaca la protección al promotor de polimerasas "deambulantes", remodelamiento de la cromatina sobre el promotor y posiblemente, plegamiento de las secuencias repetidos de rRNA en el nucléolo (Paule MR y White RJ, 2000).

2.7.6 Elementos terminadores.

Esta región se caracteriza por contener secuencias repetidas y es reconocida por una proteína de unión a DNA que es esencial para la terminación de la transcripción (Reeder RH, 1989). La transcripción termina río-abajo de la secuencia del 28S y es mediada por TTF-I (en ratón) o Reb1p (en levadura). La terminación requiere la unión de la proteína correspondiente a secuencias de DNA específicas río-abajo de la unidad de transcripción (Paule MR y White RJ, 2000).



2.8 Regulación de la transcripción del DNAr.

La regulación de la transcripción puede ser llevada a cabo básicamente por dos mecanismos: 1) cambios en la estructura de la cromatina y 2) alteraciones en la cantidad, localización o actividad de la RNA polimerasa I (Hannan KM, *et al.*, 1998).

2.8.1 Cromatina

Se ha reportado que la cromatina podría regular la actividad de los genes limitando el acceso de los factores de transcripción a sus sitios de unión a DNA correspondiente en el promotor (Grummt I, 2003).

Los elementos directamente implicados en el proceso de alterar la estructura de la cromatina son UBF y TTF-I. Ensayos *in vitro* sugieren que la asociación de UBF con la cromatina ocasiona el desplazamiento de la histona H1, sin afectar al resto de proteínas histonas, dejando al descubierto al promotor espaciador. Los transcritos generados de la transcripción por la unión de polimerasas a este promotor espaciador, llamados transcritos intergénicos contribuyen a la estructura de la cromatina y subsecuente control epigenético del DNAr (Mayer C, *et al.*, 2006).

2.8.2 RNA polimerasa I

Estudios en los sistemas de transcripción de *Acanthamoeba castellanii* han revelado que la transcripción disminuye cuando incrementa la cantidad de una isoforma de la RNA polimerasa I, llamada PolA y la disminución de la cantidad de otra, la PolB. La diferencia entre estas dos isoformas radica en la modificación de una de las subunidades de la enzima y/o en su asociación con otros factores asociados a la RNA polimerasa I (Hannan KM, *et al.*, 1998).

2.9 Descripción del cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos.

2.9.1 El Cistrón Ribosomal de *T. vaginalis*.

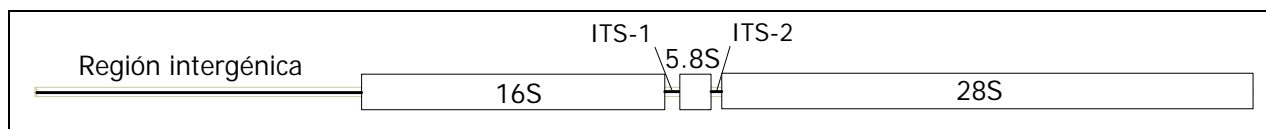


Fig. 15. Cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

De acuerdo al tamaño del genoma de *T. vaginalis*, se ha calculado que hay aproximadamente 10 copias del gen de RNA ribosomal (DNAr) y mide 6.3 Kb (datos no publicados de nuestro laboratorio). Tiene un sitio de restricción para *EcoRI* y tres sitios para *HindIII* donde los tamaños de estos fragmentos son 3619, 1379 y 1333pb.

A la fecha se conoce la secuencia completa del cistrón ribosomal de este tricomonádido; en la figura 15 se muestra el mapa correspondiente. En nuestro laboratorio se construyó una biblioteca genómica a partir de DNA total de *T. vaginalis* (cepa CNCD147) digerida con *EcoRI* y clonada en el sistema λ Zap II (Strategene). Tras realizar un ensayo de hibridación con una sonda de cDNA del RNAr de *T. cruzi*, se obtuvo una clona con un inserto de 6.3Kb la cual correspondía con el tamaño esperado por ensayos previos de Southern. El inserto fue secuenciado y comparado con los datos reportados previamente en "GenBank".

El espaciador transcrito externo (ETS) define en su extremo 5' la posición del inicio de la transcripción (tsp) el cual es un elemento interno de promotores de polimerasa tipo I. Lo que se conoce hasta el momento respecto a *T. vaginalis*, es el sitio de inicio de la transcripción (tsp), trabajo realizado en nuestro laboratorio. Para determinar el tamaño del espaciador transcrito externo se realizó un ensayo de protección a ribonucleasas (RPA) con lo cual se determinó aproximadamente la posición del tsp y posteriormente mediante una reacción de "primer extension" se

localizó el sitio de inicio de la transcripción en la secuencia 5´-GGGAAAGTTG-3´ al inicio de la secuencia del ETS (Lopez-Villaseñor, et al., 2004).

Se ha observado que las regiones codificadoras están altamente conservadas en secuencia y funcionalidad, sin embargo, las regiones intergénicas que son las que contienen todos los elementos que regulan la transcripción de estos genes divergen rápidamente entre especies (Reeder RH, 1989).

En general, a pesar de la divergencia evolutiva, el tipo y arreglo de los elementos reguladores ha estado conservado a pesar de no mantener precisamente la misma secuencia. De aquí que la organización podría ser esencialmente la misma para la mayoría de los eucariontes; sin embargo en *T. vaginalis* aun no se ha descrito cual es el arreglo de la región intergénica y los elementos reguladores de la transcripción.

2.9.2 El cistrón ribosomal de *T. tenax*.

La información disponible sobre este parásito es escasa. De hecho, respecto al cistrón ribosomal de *T. tenax* se conoce muy poco. Sin embargo en la página de NCBI, en el apartado *Nucleotide*, está publicada la secuencia completa de la subunidad menor (16S), trabajo realizado por el grupo de Goto N (1996).

2.9.3 El cistrón ribosomal de *T. foetus*.

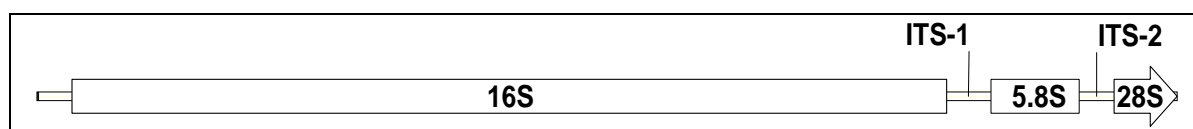


Fig. 16. Mapa de la secuencia incompleta del cistrón ribosomal de *T. foetus*.

Al igual que en *T. vaginalis*, se ha descrito en *T. foetus* que los genes que codifican para las moléculas ribosomales, se encuentran arregladas en forma de tándem. De acuerdo al tamaño del genoma de *T. foetus*, se ha calculado que hay

aproximadamente 12 copias del gen de RNA ribosomal (DNAr) y por ensayos de Southern blotting se ha calculado que mide aproximadamente 6Kb (Chakrabarti, et. al, 1991).

Hasta el momento, en *T. foetus* solo se han caracterizado los genes de la subunidad menor y del 5.8S, trabajo realizado por Chakrabarti, et. al (1991). En la figura 14 se muestra el mapa correspondiente a lo que se conoce de la secuencia del cistron ribosomal de *T. foetus*. La subunidad menor mide 1571 pb con un contenido G + C de 48.5% mientras que el 5.8S mide 159 pb con un contenido G + C de 44%. Aunque su tamaño es menor en comparación a los 18S eucarióticos, encontraron que la secuencia mantiene la estructura primaria y secundaria común entre todos las estructuras de RNA ribosomal de la subunidad menor en eucariontes. Los ITSs son muy cortos (al igual que en *T. vaginalis*) midiendo 80 y 64 pb respectivamente y su contenido en A + T es muy alto en ambos, siendo 86% y 81% respectivamente.

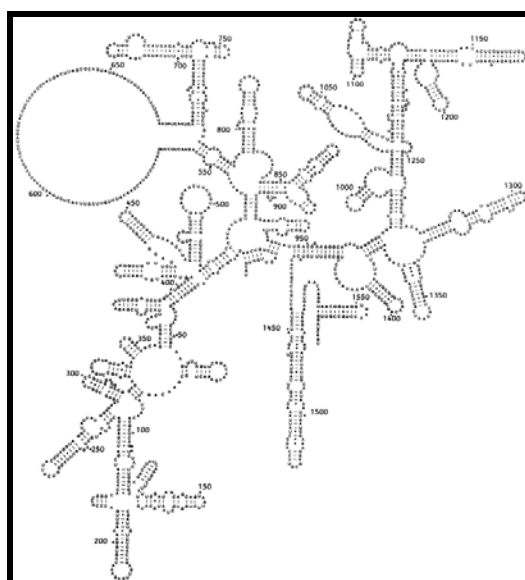


Fig. 17. Estructura primaria y secundaria de la subunidad menor de *T. foetus*. Figura tomada de Chakrabarti D, et al., 1992.



Por otro lado, mediante un análisis tipo “Northern blot”, se ha sugerido que el tamaño de la región intergénica es de aproximadamente 200 pb por el tamaño de lo que correspondería al tamaño del transcrito primario (5.8 Kb). De igual forma, también se estimó que el tamaño de la subunidad mayor es de alrededor 2.5 Kb, sin embargo aun falta por conocer la secuencia del RNAr 28S así como la secuencia de la región intergénica.



CAPITULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



Dado que los tricomonádidos son organismos de divergencia evolutiva muy temprana, pueden ser utilizados como modelo para el estudio de estrategias reguladoras de la transcripción que pudieron haber aparecido desde el inicio de la historia evolutiva de los eucariontes. En particular en este trabajo se estudiarán los genes del cistrón ribosomal, transcritos por la RNA polimerasa I.

A la fecha, solamente se conoce la secuencia completa del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*, y aun falta por conocer la secuencia del DNAr de *T. tenax* y *T. foetus*.

El propósito de este trabajo es comparar la estructura del cistrón ribosomal en estos tres tricomonádidos para establecer similitudes y/o diferencias con la estructura de las unidades transcritas por RNA pol I de organismos eucariontes superiores.

La importancia de analizar estos genes en estos parásitos radica en que debido a que son organismos de divergencia evolutiva temprana puede establecerse la diferencia que existe con los eucariontes superiores.



CAPITULO IV

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



4.1 HIPÓTESIS

Trichomonas vaginalis y *Trichomonas tenax* pertenecen al mismo género, por lo que sus genes ribosomales podrían ser muy parecidos entre sí y al compararlos con los de *Tritrichomonas foetus* se observarán diferencias que establecerán su correspondiente distancia evolutiva.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar y comparar las secuencias de los genes ribosomales (rDNA) de *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*.



4.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Amplificar la secuencia del cistron ribosomal (región intergénica y codificadora) de los tricomonádidos *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.
- Clonar tanto la región codificadora como la región intergénica de los genes ribosomales de los tres protozoarios.
- Secuenciar diferentes clonas aisladas de estas regiones.
- Comparar las secuencias obtenidas para establecer las principales similitudes y diferencias entre ellas.
- Analizar la región intergénica de *T. vaginalis* para conocer si tienen los componentes característicos de los transcritos de la RNA pol I en organismos eucariontes superiores.



CAPITULO V

DESARROLLO EXPERIMENTAL



5.1 Estrategia Experimental.

- A. Cultivo de *T. vaginalis* y *T. foetus*.
- B. Extracción de DNA genómico de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.
- C. "Southern blot" genómico.
- D. Amplificación por PCR.
 - i. Amplificación de región intergénica.
 - ii. Amplificación de región codificadora.
 - iii. Amplificación de [región intergénica + 28S].
 - iv. Hibridación por Southern blot.
- E. Clonación en vectores de clonación.
 - i. "Zero-blunt Topo".
 - ii. "pGEM T-Easy".
 - iii. Aislamiento de clonas.
 - iv. Hibridación en colonia.
 - v. Extracción de plásmidos (minipreps).
 - vi. Digestión con la enzima de restricción *EcoR1*.
- F. Purificación del producto de PCR de la región intergénica de *T. foetus*.
- G. Secuenciación y análisis de secuencias.
- H. Análisis bioinformático.

5.2 Metodología.

5.2.1 Cultivo de células

5.2.1.1 Cultivo de *T. vaginalis*.

Las tricomonas se cultivan en medio TYM con Suero de caballo al 10%. Para esto, se utilizan tubos de ensayo con tapón de rosca con 6 mL de medio TYM + 0.6 mL de suero de caballo. Se siembran diluciones de un cultivo anterior de 0.1 – 0.3 mL para que al día siguiente estén en fase logarítmica.



Los tubos se incuban a 37°C durante 22-24 horas inclinados en una gradilla para que las células se adhieran a la pared del tubo.

5.2.1.2 Cultivo de *T. foetus*.

Las tritricomonas se cultivan igual que las tricomonas pero usando un tubo con tapón de rosca con 5 mL de medio TYM + 0.5 mL de suero de caballo.

5.2.2 Extracción de DNA genómico de los tricomonádidos.

5.2.2.1 DNA de *T. vaginalis*. y *T. foetus*.

La extracción se llevó a cabo a partir de un cultivo de *Trichomonas vaginalis* y *Tritrichomonas foetus* (por separado) en fase logarítmica ($\sim 2.5 \times 10^6$ células/mL) crecido en una caja de cultivo Nunc de 260 mL, con 50 mL de medio TYM y suero de caballo inactivado al 10%. El volumen total del cultivo se separó en dos tubos Corning de 50 mL en condiciones estériles.

Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se coloca en un recipiente de desechos que será esterilizado posteriormente. El botón de células se resuspendió en 20 mL de PBS pH 7.4, y se centrifugó una vez mas a 3000 rpm durante 10 min.

La solución de lavado se decanta y el botón de células se resuspende en 4mL de PBS para separarlos en cuatro microtubos de 1.5 mL (8 tubos en total). Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante un minuto; tras decantar el sobrenadante, el botón se resuspendió con el PBS remanente en el tubo.

Se agregaron 300 µL de amortiguador de extracción y 300 µL de fenol a cada tubo. Se agitó a velocidad moderada durante 30 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min.



La fase superior (sin interfase) se recuperó en otro tubo y se le añadieron 300 μ L de fenol y 300 μ L de cloroformo. Se agitó y centrifugó igual que en el paso anterior. La fase superior nuevamente se recuperó y se le agregaron 500 μ L de cloroformo, se agitó y centrifugó de la misma forma.

La fase superior se precipita con 1mL de etanol absoluto y 40 μ L de acetato de sodio 3M a -20 °C toda la noche. Al otro día los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío.

Se dejó evaporar el etanol 5 minutos y el DNA obtenido se resuspendió cuidadosamente en 50 μ L de TE y se añadieron 0.5 μ L de RNasa (2mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37°C.

El DNA obtenido se revisó en un gel de agarosa, para lo cual se preparó en amortiguador de corrida TAE 1x a una concentración de 0.8%. La agarosa preparada se calienta hasta licuarla, luego se coloca en el recipiente de la cámara diseñado para solidificar los geles, y se deja enfriar ~ 20 minutos.

Siempre se carga como marcador de peso molecular, 10 μ L de λ Hind III. Las muestras de DNA se prepararon con 2 μ L de amortiguador muestra en TAE 5x, 9 μ L de agua y 1 μ L de muestra de DNA para tener un volumen de 10 μ L para cargar el gel. La electroforesis se corrió a 80V por 1 hora en amortiguador TAE 1x.

Una vez terminada la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio en TAE 1x durante 5 minutos. Se destiñeron 5 minutos en agua destilada y se observaron en el transiluminador para tomar la foto.



5.2.2.2 Extracción de DNA genómico *T. tenax*.

El DNA genómico que se utilizó fue extraído por la Dra. Imelda López en el laboratorio del Dr. John Alderete. Para usarlo, solamente se centrifugó a 14,000rpm durante 15 minutos y se descartó el etanol. Finalmente se resuspendió en 50 µL de TE, se le agregó 0.5 µL de RNAsa y se incubó a 37°C durante 30 minutos para después conservarlo a -20°C.

5.2.3 "Southern blot" genómico.

a) Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Se digirieron aproximadamente 10µg de DNA genómico de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus* con las enzimas de restricción *EcoR1* y *HindIII*. Las reacciones se prepararon en microtubos de 1.5 mL (1 tubo por cada organismo y un tubo por cada reacción de digestión: seis tubos en total) como sigue:

Enzima	Ingrediente	<i>T. vaginalis</i>	<i>T. foetus</i>	<i>T. tenax</i>
EcoRI	Agua bidestilada estéril	90µL	95µL	95µL
	Amortiguador REact3® 10x	15µL	15µL	15µL
	DNA genómico	30µL	25µL	25µL
	Enzima	10µL	10µL	10µL
	Total	145µL	145µL	145µL
HindIII	Agua bidestilada estéril	90µL	95µL	95µL
	Amortiguador REact2® 10x	15µL	15µL	15µL
	DNA genómico	30µL	25µL	25µL
	Enzima	10µL	10µL	10µL
	Total	145µL	145µL	145µL

Al día siguiente se agregaron otros 5 µL de la enzima correspondiente y se incubó tres horas más a 37°C.

Los DNA digeridos se extraen y precipitan como sigue: a cada tubo se le añadió 50 µL de TE, 100 µL de fenol y 100 µL de cloroformo. La mezcla se agita y centrifuga por tres minutos a 14,000 rpm. La fase superior se mezcla con 200 µL



de cloroformo, se agita y centrifuga del mismo modo. La fase superior se precipita con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio por 1hr a -20 °C. La precipitación se centrifugó 15 minutos a 14,000 rpm.

El botón se resuspendió en 10µL de TE pH 7.4 y se le añadieron 4 µL de amortiguador muestra. Se calentaron a 65°C durante 10 minutos y se colocaron en hielo 5 minutos.

a) Preparación y corrida del gel.

1. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x.
2. Se cargó el DNA previamente digerido y resuspendido (14 µL).
3. El gel se corrió a 80V por 3.5 hr. Se tiñó con bromuro de etidio (10mg/mL) en TAE 1x 10 minutos y destiñó 10 minutos en agua bidestilada.
4. El gel se transfirió a un recipiente apropiado para los pasos de depurinización, desnaturalización y neutralización.

b) Preparación del DNA para la transferencia.

Para despurinizar se incubó el gel en 250mL de HCl 0.25 N durante siete minutos. Se descartó la solución y se repitió la incubación. Posteriormente, se incubó en 250 mL de solución de desnaturalización durante 15 minutos. Se descartó la solución y se repitió la incubación y finalmente se incubó en 250 mL de solución de neutralización durante 30 minutos. Se descartó la solución y se repitió la incubación.

c) Transferencia del DNA a una membrana de nylon.

En la cámara de transferencia (Blot Transfer System 11.14 Gibco BRL) se colocó la solución de transferencia. Posteriormente se montó transferencia de la siguiente manera:



- a. El papel Wattman y la membrana se humedecen previamente en la solución de transferencia.
- b. En la base se colocó un papel Wattman de 23 x 11cm, encima se colocó otro de 11 x 14cm y en seguida se colocó el gel volteado, luego la membrana de nylon (Zeta Probe GT Genomic Tested Blotting BoRad), otro papel Wattman de 11 x 14 cm y una torre de toallas de papel. Sobre ellas va una cubierta plástica y una botella de agua.
- c. Entre las orillas del gel y el segundo Wattman se colocó parafilm para asegurar que la transferencia se lleve a cabo a través del gel.

La transferencia se dejó durante toda la noche y una vez finalizada, marqué con lápiz los pozos del gel en la membrana.

La membrana se lavó en solución SSC 2x en agitación suave durante 10 minutos y se dejó secar al aire una hora. Finalmente el DNA se fijó en la membrana con luz UV a 1200 μ J en un equipo "UV crosslinker" (Stratagene).

d) Pre-hibridación de la membrana.

La membrana se pre-hibridizó por tres horas en 10mL de solución de hibridación a 37°C.

*e) Preparación de la sonda radiactiva [α^{32} P] dCTP de cistrón ribosomal de *T. vaginalis* por "Random Primer".*

La sonda se preparó con el kit comercial: "Rediprime II Random Primer Labelling System" (GE Healthcare).

El DNA a ser marcado (50 ng) se diluyó en un volumen final de 45 μ L de TE.

- Región [intergénica+28S] de Tv: 4,600pb
- Región codificadora (16S + 5.8S) de Tv: 1,900pb



Proporción --- $4,600/1,900=2.42\text{ng}$. Por cada ng de RC, hay 2.42ng de RI.

* Producto de amplificación por PCR de la región intergénica + 28S de *T. vaginalis*. [60ng/ μL] Preparar dilución $1/10 = 6\text{ ng}/\mu\text{L}$. Se usaron 6 μL .

* Producto de amplificación por PCR de la región codificadora de *T. vaginalis*. [100ng/ μL] Preparar dilución $1/20 = 5\text{ng}/\mu\text{L}$. Se usaron 3 μL .

El DNA se desnaturalizó por calentamiento a 93 °C por cinco minutos en baño de agua. Transcurrido el tiempo, la muestra se transfirió a hielo/agua durante 5 minutos.

La muestra se transfirió al tubo de reacción del kit comercial sin mezclar. Se añadieron 10 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP y se mezcló cuidadosamente mientras que la solución cambio de azul a morado cuando el liofilizado se ha mezclado y disuelto por completo con la marca radiactiva. Se incubó 1 horar a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, el DNA marcado se precipitó añadiendo 10 μg de tRNA (2 μL de tRNA 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2.5 partes de ETOH absoluto (125 μL), 1/10 partes de acetato de sodio 3 M (5 μL) y dejando a -20 °C toda la noche. Se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 μL de amortiguador TE.

Para desnaturalizar el DNA marcado se adicionaron 10 μL de NaOH 3 N. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente se agregaron 10 μL de HCl 3 N y 10 μL de Tris 1 M pH 7.4. Mantener en hielo.

f) Hibridación.

La membrana se hibridó con la sonda, agregándola a la solución de hibridación durante dos días ($2\text{ Cot } \frac{1}{2}$) a 37°C.



$$\text{Cot } \frac{1}{2} = 2 \left(\frac{1}{x} \right) \left(\frac{y}{5} \right) \left(\frac{z}{10} \right)$$

x: peso de la sonda (μg)

y: tamaño de la sonda (Kb)

z: volumen de hibridación (mL)

El $\text{Cot } \frac{1}{2}$ es el tiempo en el que la mitad de las moléculas de la sonda se unen a las moléculas del DNA blanco.

g) *Lavado de la membrana.*

Finalizada la hibridación, la membrana se lavó con solución 2x SSC/0.2% SDS durante 10 minutos a 37°C. Tras monitorearse el fondo radiactivo, se repitió el lavado. La membrana se expuso en película "Hiperfilm" (Amersham Biosciences) con pantalla intensificadora durante 24 horas a -70 °C.

5.2.4 Amplificación por PCR.

Todas las amplificaciones llevadas a cabo fueron basadas en el mapa del cistron ribosomal de *T. vaginalis*. Estas regiones específicas amplificadas fueron:

- a) Región intergénica de *T. vaginalis*.
- b) Región 16S + 5.8S de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.
- c) Región intergénica + 28S de *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.

En la figura 18 se muestra la localización donde se anclan los oligonucleótidos para las amplificaciones correspondientes.

a. Oligonucleótidos utilizados.

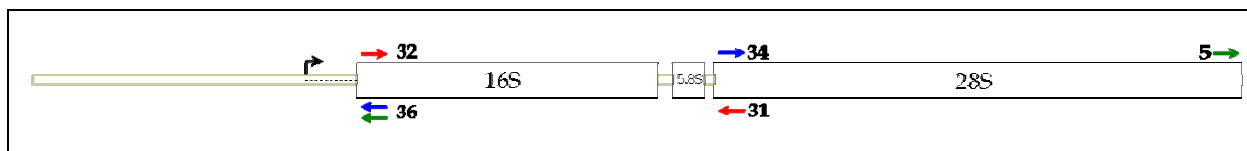


Fig. 18. Mapa de localización donde se anclan los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR. Para la región intergénica (A) se utiliza el par marcado de color verde; para la región del 16S + 5.8S (B) se utiliza el par marcado de color



rojo y para la región intergénica + 28S (C) se utiliza el par marcado de color azul.

En la tabla 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos, así como su T_m que determina la temperatura de alineamiento al templado al momento de la amplificación que en todos los casos fue DNA genómico del parásito correspondiente.

5: RTT1 ($T_m = 47.1^\circ\text{C}$)	5' - ATT ACG TCC ACG ACC TGT -3'
31: 28sfn-RCTF ($T_m = 49.9$)	5' - CTT CAG TTC AGC GGG TCT T -3'
32: 16SR-RCTF ($T_m = 52.5^\circ\text{C}$)	5' - ATC CTG CCA AGG AAG CAC AC -3'
34: 28STf-Fnew ($T_m = 49.9^\circ\text{C}$)	5' - AAG ACC CGC TGA ACT GAA G -3'
36: 16STf-R ($T_m = 52.5^\circ\text{C}$)	5' - GTG TGC TTC CTT GGC AGG AT -3'

Tabla 1. Oligonucleotidos utilizados para la amplificación.

Cada reacción se preparó independientemente en un tubo de 600 μL (previamente esterilizado con luz UV durante 5 minutos), tal como se describe en la siguiente tabla (2).

Orden Adición	Solución	Medium	High	Control s/DNA
1	H ₂ O PCR	31.5 μL	30 μL	16 μL
2	Amortiguador PCR 10x	5 μL	5 μL	2.5 μL
3	dNTPs 10mM	3 μL	3 μL	1.5 μL
4	MgCl ₂ 50mM	3 μL	4.5 μL	1.5 μL
5	Oligo A (200ng/ μL)	3 μL	3 μL	1.5 μL
6	Oligo B (200ng/ μL)	3 μL	3 μL	1.5 μL
7	DNA genómico	1 μL	1 μL	---
8	<i>Taq</i> DNA pol.	0.5 μL	0.5 μL	0.25 μL
---	Vol. final	50 μL	50 μL	25 μL

Tabla 2. Programa insertado en el termociclador para la amplificación de la región intergénica de *T. vaginalis*.

Una vez que se agregó el DNA genómico a cada tubo (paso 7) se adicionaron 100 μL de aceite mineral para PCR. Posteriormente se inició el programa de amplificación y al transcurrir 8 minutos se adicionó el volumen correspondiente de la *Taq* DNA polimerasa (Promega) (paso 8).



b. Programas insertados en el termociclador:

5.2.4.1 Amplificación de región intergénica: *T. vaginalis*

Oligos utilizados: 5 y 36. Tamaño esperado del fragmento amplificado: ~1,700pb.

Paso	Ciclo	Condición	Tiempo
1°	Desnaturalización	90 °C	10 min
2°	Desnaturalización	90 °C	1 min
3°	Alineamiento	46.1 °C	1 min
4°	Amplificación	72 °C	4 min
5°	Repetición ciclo	Ir a paso 2	30 veces
6°	Amplificación	72 °C	10 min
7°	Final	4 °C	20 hrs

Tabla 3. Programa insertado en el termociclador para la amplificación de la región intergénica de *T. vaginalis*.

5.2.4.2 Amplificación de [región 16S + 5.8S]: *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.

Oligonucleótidos utilizados: 31 y 32. Tamaño esperado del fragmento amplificado: ~1,900pb.

Paso	Ciclo	Condición	Tiempo
1°	Desnaturalización	90 °C	10 min
2°	Desnaturalización	90 °C	1 min
3°	Alineamiento	48.9 °C	1 min
4°	Amplificación	72 °C	4 min
5°	Repetición ciclo	Ir a paso 2	30 veces
6°	Amplificación	72 °C	10 min
7°	Final	4 °C	20 hrs

Tabla 4. Programa insertado en el termociclador para la amplificación de la región codificadora de *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.

5.2.4.3 Amplificación de región intergénica + 28S: *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.

Oligonucleótidos utilizados: 34 y 36. Tamaño esperado del fragmento amplificado: ~4,600pb.



Paso	Ciclo	Condición	Tiempo
1°	Desnaturalización	90 °C	10 min
2°	Desnaturalización	90 °C	1 min
3°	Alineamiento	48.9 °C	1 min
4°	Amplificación	72 °C	7 min
5°	Repetición ciclo	Ir a paso 2	30 veces
6°	Amplificación	72 °C	10 min
7°	Final	4 °C	20 hrs

Tabla 5. Programa insertado en el termociclador para la amplificación de la región intergénica + 28S de *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.

Al finalizar la reacción, los productos de la amplificación se extrajeron adicionando 100µL de cloroformo y se revisaron en un gel de agarosa 1% en TAE 1x cargando en cada pozo 1 µL del producto de PCR correspondiente, 2 µL de amortiguador muestra y 7 µL de agua bidestilada.

5.2.4.4 Hibridación por "Southern blot".

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x y se cargó aproximadamente 1 µg de cada uno de los productos de PCR obtenidos anteriormente.

A partir de este paso se procedió indica el protocolo de "Southern blot" genómico (apartado 5.2.2).

5.2.5 Clonación en vectores de clonación.

5.2.5.1 "Zero-Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit" (Invitrogen).

La clonación en este vector se basa en la reacción que se lleva a cabo entre la enzima topoisomerasa I del virus de la *Vaccinia* y el DNA del vector plasmidico. La enzima reconoce la secuencia 5'-CCCTT de cada una de las cadenas del DNA, corta y se forma un enlace covalente entre el grupo 3'-fosfato del sitio de corte y el sitio activo de la enzima que es un residuo de tirosina (Tyr 274). Posteriormente, este enlace es atacado por el grupo 5'-hidroxilo del inserto liberando así a la enzima, haciendo eficiente la clonación del producto de PCR con



el vector. Adicionalmente, el vector tiene el gen *ccdB* que es un gen letal de *E. coli*; este gen esta unido al carbono terminal del fragmento LacZ α y si hay ligación del producto de PCR se inhibe la expresión de dicho gen, permitiendo crecer únicamente a las colonias recombinantes.

Para llevar a cabo la ligación del inserto se realizó la siguiente reacción: en un microtubo de 600 μ L, bajo campana se añadieron 2 μ L del producto de PCR correspondiente, 0.5 μ L de la solución diluida de la sal (1:4) y 0.5 μ L del vector (10ng/ μ L). Para que se lleve a cabo la ligación se incubo 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, 2 μ L de la reacción de ligación se transfieren al vial de las células electrocompetentes *E. coli* del kit y se mezclaron con ligeros golpecitos.

Las células se transfirieron a una celda para electroporación fría, colocándolas entre los electrodos. Se llevó a cabo la electroporación de las células cargando el aparato a 2.46 Kvolts y se dió el pulso. Inmediatamente después se agregaron 250 μ L de medio SOC a temperatura ambiente para recuperar las células.

Las células y el medio se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se incubaron con agitación vigorosa 1h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a platear. Se usaron 2 cajas de LB sólido + kanamicina (50 μ L/mL) por cada reacción de ligación. Se sembraron 30 μ L de cada transformación a cada una de las cajas correspondientes y el volumen restante (270 μ L) en la otra caja. Las cajas se incubaron a 37 °C toda la noche.

5.2.5.2 “pGEM[®]-T Easy Vector System” (Promega).

La clonación en este vector se basa en que inicialmente está digerido con *EcoRV* y posteriormente le ha sido añadido un residuo de timidina en posición 3' a ambos extremos. Algunas enzimas polimerasas como la *Taq* añaden un residuo de desoxiadenosina al extremo 3' del producto amplificado lo que hace eficiente la clonación del inserto en el vector con ayuda de una T4 DNA ligasa.



Adicionalmente, el vector contiene los promotores T7 y SP6 para la RNA polimerasa y el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. Puesto que en las placas de agar se añade IPTG el cual es un inductor, se une al represor LacI y se lleva a cabo la transcripción del gen *lacZ*. Además, a las cajas también se les añade X-gal el cual es un sustrato para la β -galactosidasa, el cual al ser hidrolizado por la enzima presenta un color azul. De esta forma, las clonas recombinantes son fácilmente identificadas por selección de color.

(Puesto que en las placas de agar se añade IPTG y X-gal las clonas recombinantes son fácilmente identificadas por selección de color ya que el primero es un inductor que se une al represor LacI lo que permite que se lleve a cabo la transcripción del gen *lacZ* y el segundo es un sustrato para la β -galactosidasa, el cual al ser hidrolizado por la enzima presenta un color azul.)

La reacción de ligación se realizó en un microtubo de 600 μ L agregando: 5 μ L de amortiguador de ligación 2x, 1 μ L del vector pGEM-T Easy (50ng/ μ L), 3 μ L del producto de PCR correspondiente y 1 μ L de T4 DNA ligasa (3U/ μ L). Tras mezclar la reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Al transcurrir el tiempo, se adicionó 2 μ L de cada ligación a tubos de 1.5 mL en hielo.

Posteriormente se agregaron 50 μ L de células competentes JM109 del kit. Se mezcló con ligeros golpecitos al tubo y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se dio un choque térmico a las células por 45-50 segundos en baño de agua exactamente a 42°C sin agitar. Inmediatamente, los tubos se regresaron a hielo durante dos minutos. Se adicionaron 950 μ L de medio SOC a temperatura ambiente y la mezcla de células se transfirió a un tubo cónico de 25 mL para incubar 1.5 hora con agitación a 37°C.

Se usaron 2 cajas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal por cada reacción de ligación. Se sembraron 100 μ L de cada transformación a cada una de las cajas



correspondientes y el volumen restante (900 μ L) en la otra caja. Se incubaron a 37°C toda la noche. De las colonias resultantes, solo se seleccionaron las blancas.

5.2.6 Aislamiento de clonas.

5.2.6.1 Hibridación en colonia.

Se utilizaron 2 cajas de LB con el antibiótico adecuado (ver apéndice I) por cada 100 clonas. Una caja sirvió para la hibridación y la otra como replica para conservar las clonas. Cada una de las clonas obtenidas se sembró con un palillo en ambas cajas siguiendo el mismo patrón de líneas teniendo las cajas en la misma orientación. Posteriormente las cajas se incubaron a 37°C toda noche.

Se cortaron 5 cuadros de papel Whatman (del tamaño de una caja Petri), así como los círculos necesarios de membrana de nylon (1 por cada par de cajas). Cada uno de los cuadros se colocaron en cinco cajas Petri cuadradas y se les añadieron las siguientes soluciones (en estricto orden) de forma que el papel quedara muy bien impregnado.

- A. SDS 10 %
- B. Solución NaOH 0.5M/NaCl 1.5M
- C. Solución Tris 0.5M pH 7.4/NaCl 1.5M
- D. Solución Tris 0.5M pH 7.4/NaCl 1.5M
- E. SSC 2x

Cada una de las cajas de un par se abrió (las réplicas se guardaron en refrigeración) y se le colocó una membrana de nylon (sin moverse una vez que se hubo adherido) previamente identificada y orientada y se esperó 2 minutos a que se adhirieran las colonias. Con ayuda de una pinza se despegó la membrana y se colocó con las clonas adheridas hacia arriba en la caja A y se esperó 5 minutos. Transcurrido el tiempo, la membrana se transfirió a la caja B por 5 minutos y así sucesivamente hasta la caja E. En cada una de las cajas restantes (C, D y E) se esperó 5 minutos. Una vez que se terminó el proceso, las membranas se dejaron secar sobre un papel Whatman aproximadamente 20 minutos. Posteriormente el



DNA se fijó en la membrana con luz UV a 1,200 J en un equipo "UV crosslinker" (Stratagene).

Posteriormente, en una charola se colocaron 100 mL de solución de lavado donde se sumergieron cada una de las membranas y con ayuda de un kleenex® se retiraron los restos celulares presentes en la superficie. Una vez que se terminó el proceso, se transfirieron con cuidado a otra charola y se enjuagó con la misma solución. Finalmente, las membranas se dejaron secar sobre un papel Whatman.

Se llevó a cabo la pre-hibridación de las membranas durante dos horas en 10 mL de solución de hibridación a 37°C. Transcurrido el tiempo se llevó a cabo la hibridación de la membrana con la sonda radiactiva.

Finalmente, las membranas se lavaron con solución SSC 2x/SDS 0.2% durante 15 minutos a temperatura ambiente para luego exponer en película "Hiperfilm" (Amersham Biosciences) con pantalla intensificadora durante 24 horas a -70 °C. Se reveló en cuarto oscuro para elegir las clonas que hayan dado señal de hibridación.

5.2.6.2 Extracción de plásmidos (minipreps).

Una vez que se conocieron las clonas positivas que dan señal de hibridación, se procedió a seleccionarlas. Cada una de las clonas deseadas se cultivaron en 5 mL de medio LB con el antibiótico adecuado (ver apéndice I) en agitación a 37 °C toda la noche.

Con 3 mL del cultivo correspondiente se obtuvo un miniprep. Para esto 1.5mL del cultivo se agregó en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó 30 seg. a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se volvieron a centrifugar 1.5 mL del cultivo correspondiente.

El botón se resuspendió en el sobrenadante remanente en el tubo y se agregaron 100 µL de solución I fría y se mezcló en el vórtex a velocidad moderada. Se



agregaron 200 μ L de la solución II recién preparada y a temperatura ambiente. Se mezcló invirtiendo el tubo seis veces. Con los tubos en hielo, se añadieron 150 μ L de la solución III fría y se mezcló invirtiendo el tubo 6 veces para luego dejar en hielo durante cinco minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm durante cinco minutos, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 250 μ L de fenol frío y 250 μ L de cloroformo frío, se mezcló en el vórtex a velocidad moderada durante 30 segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante tres minutos. Se recuperó la fase superior y se agregaron 500 μ L de cloroformo frío, se mezcló y centrifugó igual que en el paso anterior. La fase superior se transfirió a otro tubo y se le agregó 1 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se dejó precipitando 2 horas a temperatura ambiente.

Se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima, se desechó el sobrenadante y el botón se lavó con 700 μ L de etanol al 70% frío. Se dejó secar el pellet 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 μ L de RNAsa (20 μ g/mL) y los tubos se incuban a 37°C durante 30 minutos. Los minipreps obtenidos se revisan en un gel de agarosa 0.8%.

5.2.6.3 Digestión con la enzima de restricción *EcoR*1.

Para liberar el inserto del plásmido y confirmar que se encuentra en el vector así como su tamaño, se procede a realizar una reacción de digestión con *EcoR*1.

Para esto, a un tubo se le añadieron: 3 μ L del plásmido a digerir, 1 μ L de amortiguador REact3[®] 10x, 1 μ L de la enzima y 5 μ L de H₂O bidestilada estéril. Se incubó a 37°C durante toda la noche.

Las digestiones se revisaron en un gel de agarosa 1% cargando el producto de la digestión con 4 μ L de amortiguador muestra y se corrieron en amortiguador TAE 1x a 80v durante 1.15 hora.



5.2.7 Purificación de productos de PCR.

Para purificar el producto de PCR de la región [intergénica + 28S] de *T. foetus* se utilizó el kit "Sistema de extracción de geles" de Marligen (Bioscience).

En un gel de agarosa 0.8% en TAE 1x se cargaron 10µg del producto de PCR de la región [intergénica + 28S] de *T. foetus* y se corrió a 60 v durante 2.15 hora.

Cada uno de los fragmentos de interés se cortó con una navaja y cada uno se colocó en un tubo de 1.5 mL. Se determinó el peso del gel cortado y en base a esto se adicionaron 30 µL de amortiguador solubilizador de geles (L1) por cada 10 mg de gel. Posteriormente cada uno de los tubos se incubó a 50°C durante 20 minutos.

En cada uno de los tubos de 2 mL se colocó una columna a la que se transfirió el contenido de los tubos del paso anterior. Se centrifugó a 12,000 rpm durante un minuto y se descartó el filtrado. Se añadieron 500 µL de amortiguador L1 a cada cartucho y tras una incubación de un minuto a temperatura ambiente se centrifugó a 12,000 rpm durante un min y una vez más se descartó el filtrado.

Se adicionaron 700 µL de amortiguador de lavado (L2) al cartucho y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000rpm durante un minuto, se descartó el filtrado y se centrifugó una vez más durante 1 min para remover amortiguador de lavado remanente en la columna. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de 1.5 mL y se adicionaron 20 µL de amortiguador TE (previamente calentado a 65°C). Se incubó 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante dos minutos.

5.2.8 Secuenciación y análisis de secuencias.

Los electroferogramas fueron revisados en el programa "Chromas" para corroborar que cada nucleótido perteneciera al pico correspondiente. Posteriormente se usó el programa "DNAMAN" para la identificación de oligos de



amplificación así como análisis de secuencia y finalmente con el programa "ClustalX" y "BioEdit" se llevaron a cabo las alineaciones correspondientes para obtener los árboles filogenéticos y el porcentaje de identidad de cada clona respecto a la secuencia del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

Con el programa "VectorNTI" (Invitrogen Corporation) se llevó a cabo la construcción de mapas.

5.2.9 Análisis bioinformático.

Puesto que no se obtuvo la región intergénica del cistrón de *T. foetus* y de *T. tenax* no se pudo llevar a cabo la comparación de estas secuencias para establecer las diferencias o similitudes correspondientes, sin embargo, otro de los objetivos consistió en determinar si esta región contiene los componentes característicos de los transcritos de RNA pol I.

Para esto, se utilizó la herramienta "Blast" de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el programa "DNAMAN".



CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de DNA genómico de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.

Para analizar la integridad y la concentración del DNA genómico de los 3 parásitos, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1X (figura 19).

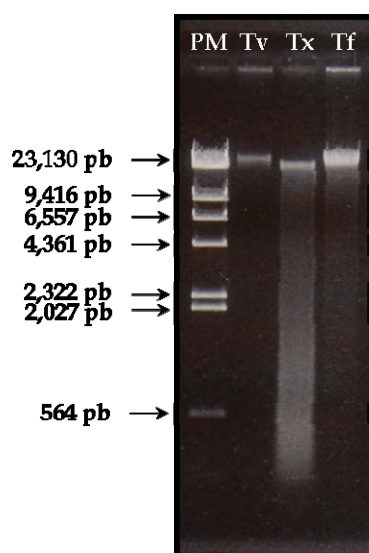


Fig. 19. Análisis del DNA genómico en gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x. PM: Marcador de peso molecular [DNA genómico de lambda digerido con *Hind*III (λ /*Hind*III)]; Tv: DNA genómico de *T. vaginalis*; Tx: DNA genómico de *T. tenax*; Tf: DNA genómico de *T. foetus*. En cada pozo se cargó una mezcla que contenía 1 μ L del DNA correspondiente, 2 μ L de amortiguador muestra y 7 μ L de agua.

Como puede observarse el DNA genómico de *T. vaginalis* se obtuvo sin degradación aparente. Por el contrario el DNA de *T. tenax* se encuentra parcialmente degradado, lo cual puede deberse probablemente a contaminación por DNAsas. Por su parte el DNA de *T. foetus* se observa en gran cantidad al compararlo con los otros y con una degradación mínima.

6.2 Southern blot genómico de DNA obtenido de los 3 tricomonádidos.

Mediante un análisis por "Southern blot" se puede determinar el tamaño aproximado de una unidad del cistrón ribosomal considerando que los genes ribosomales se encuentran organizados en tándem. Para esto, se llevó a cabo la digestión del DNA genómico de cada tricomonádido con *Eco*RI y *Hind*III en reacciones independientes para así poder hacer un análisis hibridando con la sonda heteróloga del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* que se mencionará más adelante (ver apartado 6.4). Para realizar la sonda se utilizaron los productos de

PCR de región [intergénica+28S] y de región [16S+5.8S] de *T. vaginalis* (ver apartado 5.2.3, inciso e). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20.

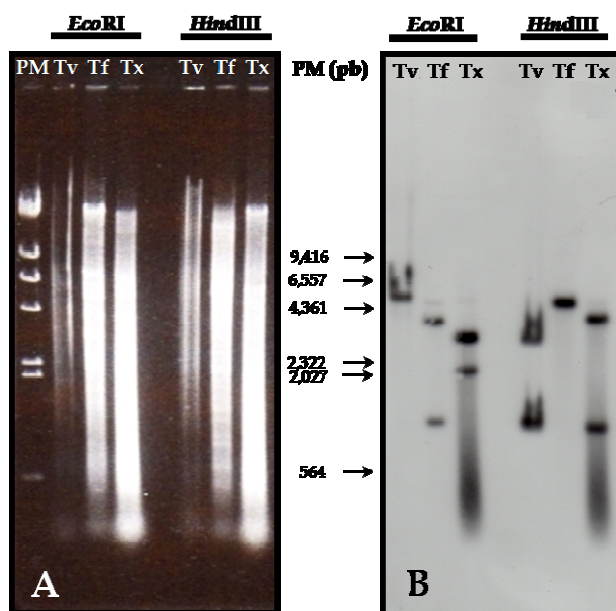


Fig. 20. A) Análisis de DNA genómico de *T. vaginalis* (Tv), *T. foetus* (Tf) y *T. tenax* (Tx) digerido con *EcoRI* y *HindIII*. El DNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x. PM: marcador de peso molecular (λ /*HindIII*). En cada pozo se cargó 5 μ g (10 μ L) del DNA genómico correspondiente previamente digerido con las enzimas de restricción indicadas y 4 μ L de amortiguador muestra. **B)** Southern blot del gel mostrado en el panel A. Sonda: Cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

6.2.1 Deducción del número de sitios de restricción para *EcoRI* y *HindIII* en el cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos.

Se sabe que en la secuencia del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* hay 1 sitio de restricción para *EcoRI* y 3 sitios para *HindIII*. A continuación, en la figura 21 se muestra un mapa en el que se puede observar el tamaño de los fragmentos que se obtienen al llevar a cabo la digestión con la enzima de restricción *HindIII*.

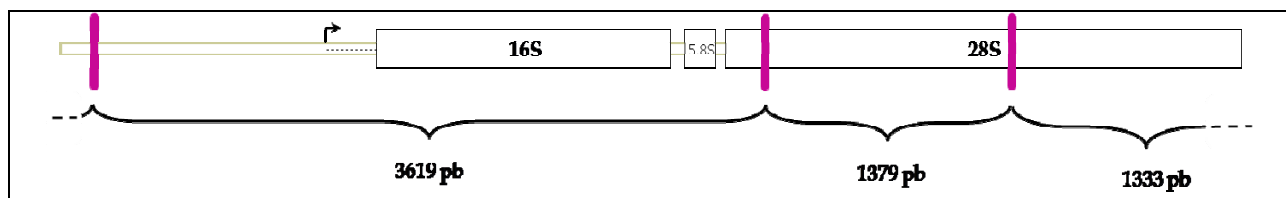


Fig. 21. Mapa de la ubicación de los sitios de restricción para *HindIII* en la secuencia del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.



Nótese que los dos fragmentos pequeños son prácticamente del mismo tamaño por lo que en la hibridación por “Southern blot” a la altura de 1,400 pb es probable que se encuentren estos dos fragmentos.

A continuación se muestra el patrón de bandas obtenido (figura 22) a partir del experimento anterior (fig. 20).

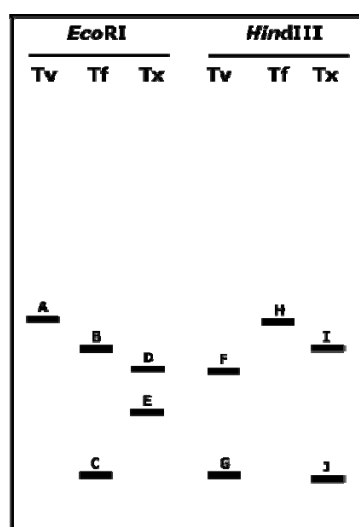


Fig. 22. Patrón de bandas obtenido en la hibridación por Southern blot de la figura 25.

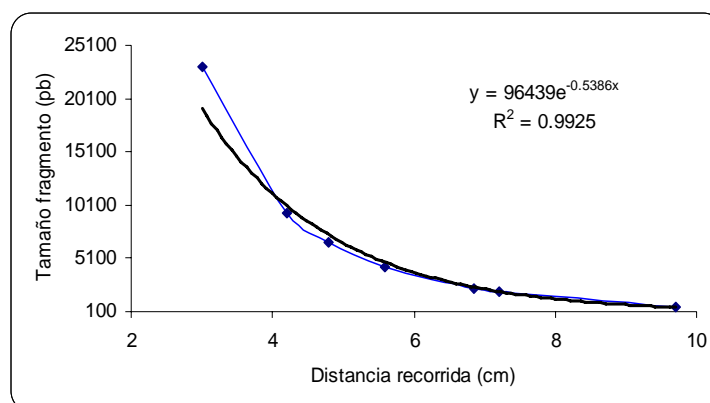
En la tabla 6 se presenta el número de sitios de restricción que se deduce a partir del patrón de bandas obtenido y presentado anteriormente.

Tricomonádido	Digestión con <i>EcoRI</i>	Digestión con <i>HindIII</i>
<i>T. vaginalis</i>	1 sitio de restricción	3 sitios de restricción
<i>T. foetus</i>	2 sitios de restricción	1 sitio de restricción
<i>T. tenax</i>	2 sitios de restricción	2 sitios de restricción

Tabla 6. Sitios de restricción en la secuencias del cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos.

6.2.2 Determinación del tamaño del cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos. Para calcular el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos tras realizar las digestiones correspondientes, se graficó la distancia recorrida por cada uno de los fragmentos del marcador de peso molecular y por medio de una línea de tendencia central de tipo exponencial se obtuvo la ecuación de la recta en la cual se extrapolaron los datos obtenidos de las señales A-J (apéndice 3).

Gráfico 1



En la tabla 7 se muestran los tamaños aproximados obtenidos a partir la ecuación obtenida en el gráfico 1. Por otro lado, como puede observarse en los tres tricomonádidos se observan distintos patrones de restricción. Sin embargo, en general el tamaño de su cistrón ribosomal es semejante, aunque puede verse que el cistrón de *T. foetus* es ligeramente menor al de *T. vaginalis* y *T. tenax*.

Enzima	<i>T. vaginalis</i>	<i>T. foetus</i>	<i>T. tenax</i>
EcoRI	A: 6,200pb	B: 4,700pb C: 1,300pb	D: 3,800pb E: 2,500pb
	6,200pb	6,000pb	6,300pb
HindIII	F: 3,800pb G: 1,300pb	H: 6,200pb	I: 5,000pb J: 1,300pb
	6,400pb	6,200pb	6,300pb

Tabla 7. Tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos en el Southern blot (fig 25).



6.3 Análisis *in silico* y amplificación por PCR.

El primer objetivo consistió en amplificar el cistrón ribosomal de *T. foetus* y de *T. tenax* mediante PCR a partir de DNA genómico. Para esto, con base en la secuencia del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* y de los oligonucleótidos existentes en el laboratorio, usando el programa "DNAMAN" se buscaron aquellos que también se anclaban en la secuencia accesada de *T. foetus* (GenBank M81842) para amplificar las regiones de interés que se mencionan en seguida. Posteriormente, asumiendo que *T. tenax* y *T. vaginalis* son muy parecidos entre sí, se realizaron las amplificaciones bajo las mismas condiciones.

Las regiones específicas amplificadas usando DNA genómico como templado, fueron:

- a) Región intergénica de *T. vaginalis*.
- b) Región [16S+5.8S] de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.
- c) Región [intergénica+28S] de *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.

En la siguiente figura (23) se muestra la localización de anclaje de los oligonucleótidos para las amplificaciones correspondientes y en seguida, en la misma figura, el fragmento amplificado.

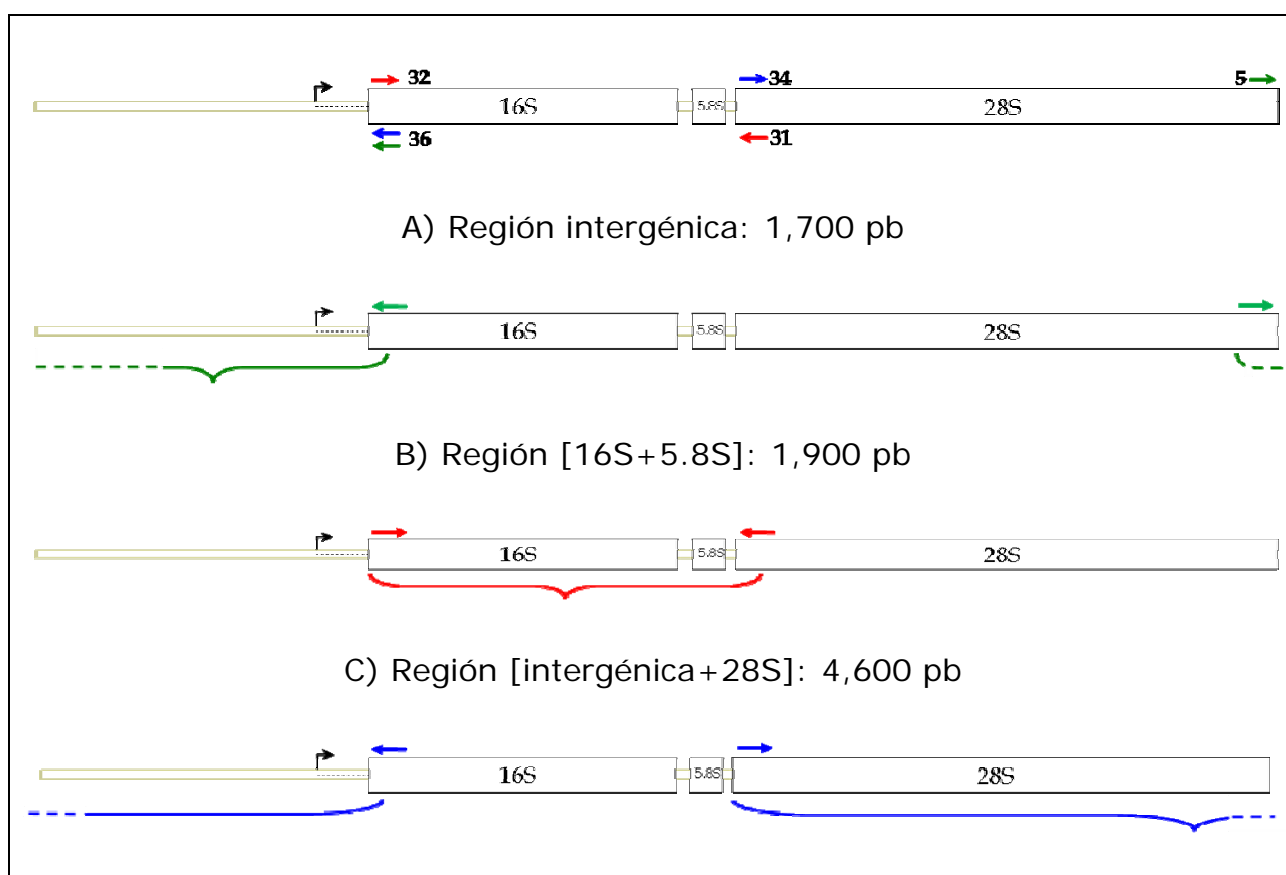


Fig. 23. Mapa del cistron ribosomal de *T. vaginalis*. Se ha marcado con color el lugar donde se anclan los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR. (A) Para la región intergénica se utiliza el par marcado de color verde; (B) para la región del [16S+5.8S] se utiliza el par marcado de color rojo y (C) para la región [intergénica+28S] se utiliza el par marcado de color azul.

6.3.1 Amplificación de la región intergénica del cistron ribosomal de *T. vaginalis*.

Para llevar a cabo la amplificación de la región intergénica del cistron ribosomal que en *T. vaginalis* mide aproximadamente 1,700 pb se usaron los oligonucleótidos marcados de color verde (par 5 y 36 en la figura 23). Esta amplificación sólo se realizó para *T. vaginalis* para confirmar el tamaño de la región intergénica.

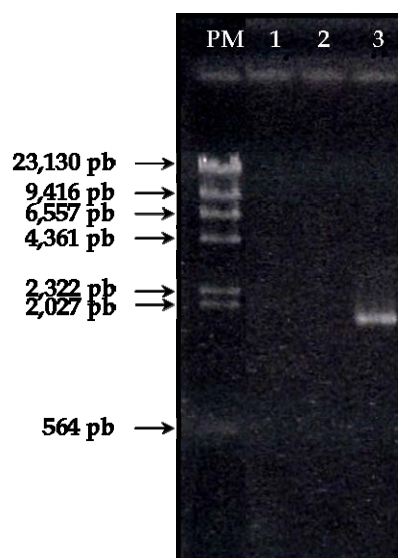


Fig. 24. Análisis de los productos de PCR de la región intergénica de *T. vaginalis* en gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TAE 1x. PM: 10 μ L λ /HindIII; 1) Control sin DNA; 2) Rx PCR MgCl₂ 3mM 3) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM. En cada pozo se cargó una mezcla con 1 μ L del producto de PCR correspondiente, 2 μ L de amortiguador muestra y 7 μ L de agua. Rx: reacción.

Como puede observarse en la figura 24, el producto de PCR obtenido mide aproximadamente 1,700 pb por lo que se deduce que se amplificó la región deseada.

6.3.2 Amplificación de la región [16S+5.8S] del cistrón ribosomal.

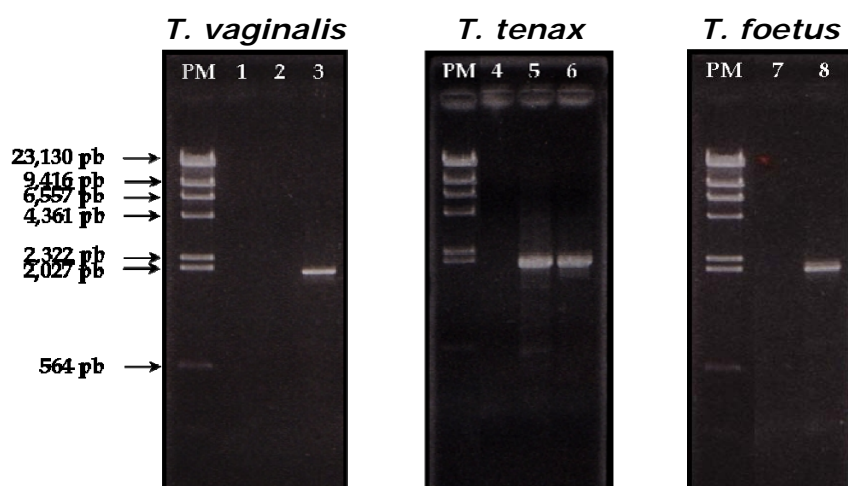


Fig. 25. Análisis de los productos de PCR de región [16S+5.8S] en los 3 parásitos en gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TAE 1x. PM: 10 μ L λ /HindIII; 1) Control sin DNA Tv; 2) Rx PCR MgCl₂ 3mM 3) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM 4) Control sin DNA Tf; 5) Rx PCR MgCl₂ 3mM 6) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM 7) Control sin DNA Tx; 8) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM. En cada pozo se cargó una mezcla con 1 μ L del producto de PCR correspondiente, 2 μ L de amortiguador muestra y 7 μ L de agua. Rx: reacción.

Para la amplificación de la región del [16S+5.8S] que mide aproximadamente 1,900 pb se utilizaron los oligonucleótidos marcados de color rojo (par 31 y 32 en la figura 23). Esta amplificación se realizó con el DNA de los 3 parásitos y los resultados se muestran en la figura 25. Todos los productos de amplificación tienen un tamaño aproximado de 1,900pb de acuerdo al marcador de peso molecular. Estos resultados muestran que la región codificadora [16S+5.8S] de los tres tricomonádidos tiene un tamaño muy semejante.

6.3.3 Amplificación de la región [intergénica+28S] del cistron ribosomal.

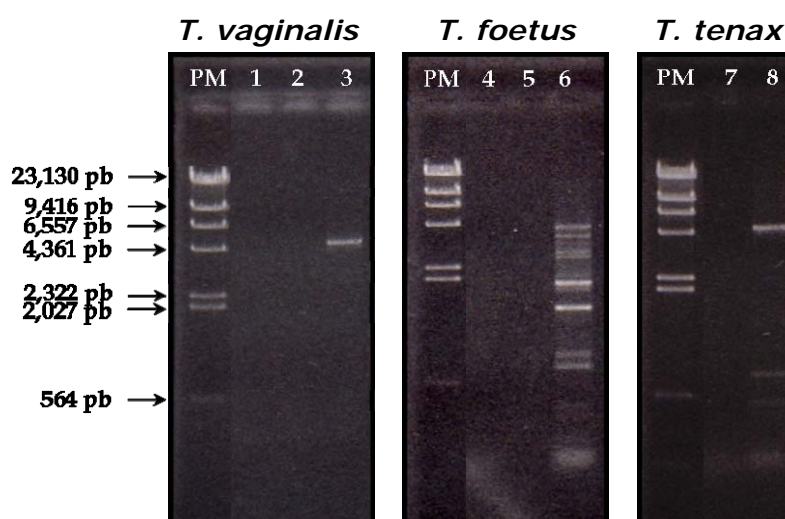


Fig. 26. Análisis de los productos de PCR de [región intergénica+28S] en los 3 parásitos en gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TAE 1x. PM: 10 μ L λ /HindIII; 1) Control sin DNA Tv; 2) Rx PCR MgCl₂ 3mM 3) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM. Producto ~4,600pb. 4) Control sin DNA Tf; 5) Rx PCR MgCl₂ 3mM Varias bandas. 6) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM 7) Control sin DNA Tx; 8) Rx PCR MgCl₂ 4.5mM. Producto ~4,600pb. En cada pozo se cargó 1 μ L del producto de PCR correspondiente, 2 μ L de amortiguador muestra y 7 μ L de agua. Rx. reacción

Para la amplificación de la región codificadora 28S y la región intergénica (que mide aproximadamente 4,600 pb) se utilizaron los oligonucleótidos marcados de color azul (par 34 y 36 en la figura 23). Esta amplificación también se realizó con



el DNA de los 3 parásitos. Como puede observarse en la figura 26 el producto amplificado de *T. vaginalis* mide aproximadamente 4,600pb por lo que se esperaría un tamaño similar con el DNA de los otros 2 parásitos.

Por su parte, la banda de amplificación de la región [intergénica+28S] en *T. tenax* es similar a la de *T. vaginalis* en tamaño (~4,600 pb), sin embargo, también se alcanzan a ver dos bandas de menor intensidad a la altura de ~0.6Kb lo cual podría ser producto de amplificación inespecífica, ya que se utilizaron oligonucleótidos heterólogos.

Sin embargo, en la amplificación con DNA de *T. foetus* se observan aproximadamente 7 fragmentos que van desde ~0.5Kb hasta ~4.5 Kb. Esto podría ser indicativo de que la amplificación de esta región con los oligonucleótidos utilizados es inespecífica tomando en cuenta que se trata de oligonucleótidos heterólogos. Es importante mencionar que esta reacción se repitió al menos 5 veces bajo diferentes condiciones de amplificación y siempre se obtuvieron los mismos resultados. En la sección 2.9.3 se menciona que en el trabajo de Chakrabarti, *et al.* deducen por medio de ensayos tipo northern blot que el tamaño aproximado del RNAr 28S es 2.5 Kb. Por medio de la amplificación por PCR pudo haberse comprobado el resultado obtenido mediante el ensayo tipo northern, sin embargo no fué posible.

6.3.4 Tamaño aproximado del cistrón ribosomal de los tricomonádidos.

Por medio de los resultados obtenidos anteriormente se puede deducir el tamaño aproximado del cistrón ribosomal de los tres tricomonádidos. A continuación en la tabla 8 se muestra el tamaño de los fragmentos que componen el cistrón ribosomal de *T. vaginalis* con el cual pueden compararse los resultados obtenidos.

Fragmento	Tamaño real conocido
Región intergénica	1,690 pb
Región [16S+5.8S]	1,877 pb
Región 28S	2,764 pb
Total	6,331 pb

Tabla 8. Tamaño del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*

6.4 Hibridación por “Southern blot” de los productos de PCR.

Una vez que se llevaron a cabo las amplificaciones de las regiones [16S+5.8S] e [intergénica+28S] (apartado 6.3) se decidió realizar una hibridación por “Southern blot” con una sonda del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* para corroborar que los fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de *T. foetus* y *T. tenax* correspondan al cistrón ribosomal, el cual se ha asumido que es de un tamaño similar al de *T. vaginalis*. En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos.

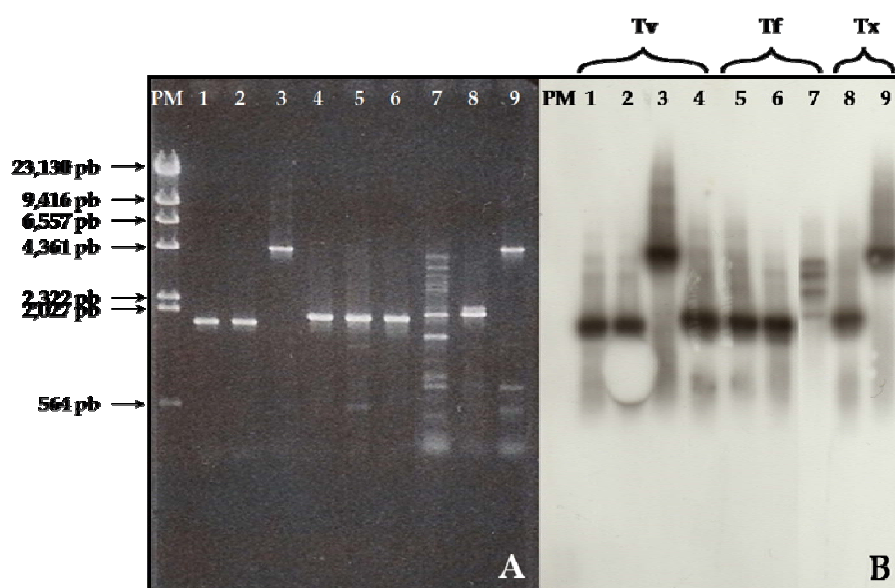


Fig. 27. A) Análisis de diferentes productos de PCR en los 3 parásitos en agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x. PM: 10 μ L λ /HindIII; 1) Región Intergénica de Tv (MgCl₂ 4.5mM); 2) Región Intergénica de Tv (MgCl₂ 4.5mM) 3) Región Intergénica + 28S de Tv 4) Región 16S + 5.8S de Tv; 5) Región 16S + 5.8S de Tf (MgCl₂ 3mM); 6) Región 16S + 5.8S de Tf (MgCl₂ 4.5mM); 7) Región Intergénica + 28S de Tf; 8) Región 16S + 5.8S de Tx; 9) Región Intergénica + 28S de Tx. En cada pozo se cargó 1 μ L del producto de PCR correspondiente, 2 μ L de amortiguador muestra y 7 μ L de agua. **B)** Southern blot del gel. Sonda: Cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.



Como puede observarse en el panel B, en todos los productos de PCR la hibridación es positiva por lo que se deduce que los fragmentos amplificados corresponden al cistron ribosomal. Sin embargo, en el carril 7 se encuentra el producto de amplificación de la región [intergénica+28S] de *T. foetus*; es interesante observar que de todos los fragmentos amplificados solamente 4 son los que dan señal de hibridación con la sonda heteróloga por lo que se deduce que solo éstos corresponden al cistron ribosomal de *T. foetus*. Estos fragmentos van de ~2.0 a ~4.3 Kb y recuérdese que el tamaño aproximado esperado es de 4.6Kb. Estos datos sugieren que la amplificación de la región [intergénica+28S] de *T. foetus* fue poco específica debido al uso de oligonucleótidos heterólogos.

Al observar la tabla 8 puede deducirse que se han llevado a cabo las amplificaciones correspondientes ya que en las amplificaciones mostradas en este apartado se obtienen tamaños parecidos a los mostrados en esa tabla para *T. vaginalis* y *T. foetus*. Sin embargo, en el caso de *T. foetus* la amplificación de la región [intergénica+28S] produjo varias bandas, por lo que probablemente se trató de una reacción poco específica.

6.5 Clonación de los fragmentos amplificados por PCR en el vector Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) y en el vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega).

Para poder secuenciar los fragmentos amplificados por PCR es necesario clonarlos y posteriormente transformar el plásmido resultante en células competentes de *E. coli* para así poder multiplicar los plásmidos. El siguiente paso a seguir consistió en clonar los productos de PCR en vectores de clonación. Para esto, se usaron 2 tipos de vectores: "Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit" (Invitrogen) y "pGEM®-T Easy Vector System" (Promega) los cuales ya se describieron en el capítulo 5 (en el apéndice 4 se muestran los mapas correspondientes).

En la tabla 4 se muestran los productos de PCR que se clonaron en el vector TOPO®. De las clonas obtenidas, se eligieron 12 al azar para la preparación de

plásmidos (minipreps). Una vez que se obtuvieron los plásmidos correspondientes se realizó una digestión con *EcoRI* para liberar el inserto y así determinar su tamaño. En la figura 28 se muestra un ejemplo.

Vector	Productos de PCR clonados	Clonas selecc.	Tamaño inserto (pb)	Tamaño esperado (pb)
Zero Blunt® TOPO® (3519pb)	Región Intergénica de <i>Tv</i> (Rx. 1)	TvRI-10	~ 1,700	1,700
	Región Intergénica de <i>Tv</i> (Rx. 2)	TvRI-18	~ 1,700	1,700
	Región 16S + 5.8S de <i>Tf</i> . (Rx. MgCl ₂ 3.5mM)	TfRC-11*	~ 1,900	1,900
	Región 16S + 5.8S de <i>Tf</i> . (Rx. MgCl ₂ 4mM)	TfRC-24*	~ 1,900	1,900

Tabla 9. Clonación en el vector Topo®. Clonas con las que se realizó el análisis de secuencia.

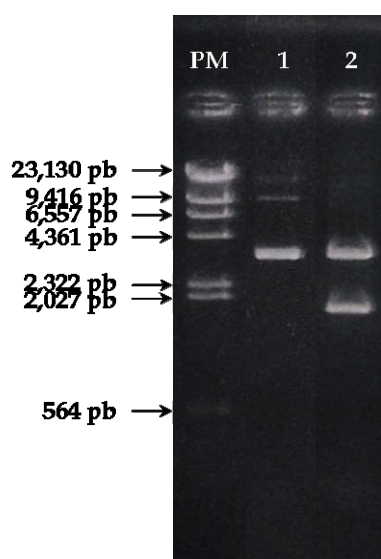


Fig. 28. Análisis de minipreps y su respectiva digestión con *EcoRI*, en agarosa al 1.0% en amortiguador TAE 1x. PM: 10µL λ /HindIII; 1) 1µL del miniprep clona TvRI-10 + 2µL de amortiguador muestra y 7µL de agua; 2) 10µL de la reacción de digestión miniprep clona TvRI-10 + 4µL de amortiguador muestra. La banda alta corresponde al vector TOPO® (3519pb) y la segunda al inserto.

Una vez que se clonaron los productos de PCR de menor tamaño se procedió a clonar los de mayor tamaño como lo son las regiones intergénicas + 28S de *T. foetus* y *T. tenax*. Para esto, se utilizaron los dos vectores de clonación (TOPO y pGEM-T) y conociendo la dificultad para obtener clonas con insertos de mayor tamaño, aquellas que se obtuvieron se parcharon para realizar un ensayo de

hibridación en colonia utilizando como sonda el cistrón ribosomal de *T. vaginalis*. Después se seleccionaron algunas de aquellas que dieron señal positiva. En la figura 29 se muestra un ejemplo de un experimento de hibridación en colonia en el que se parcharon 110 colonias.

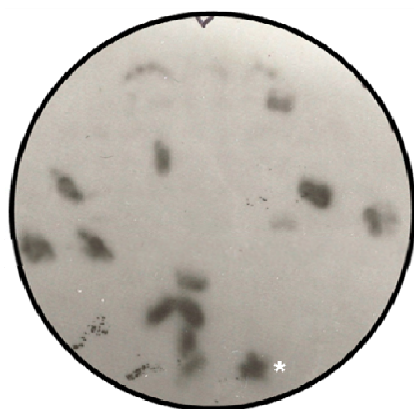


Fig. 29. Análisis de hibridación en colonia. En esta autorradiografía son visibles 12 señales por lo que se deduce que las clonas correspondientes contienen el inserto de interés. La señal que se encuentra al lado izquierdo del asterisco corresponde al control positivo. Sonda: Cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

En la tabla 5 se muestra el número de clonas que dieron señal positiva en experimentos similares al mostrado en la figura 29 y aquellas que fueron seleccionadas de acuerdo a la intensidad de la señal de hibridación para preparación de plásmidos. Cabe señalar que la selección se llevó a cabo tras confirmar la hibridación con la sonda heteróloga mediante una hibridación por Southern blot de las digestiones con *EcoRI* de los plásmidos previamente preparados.

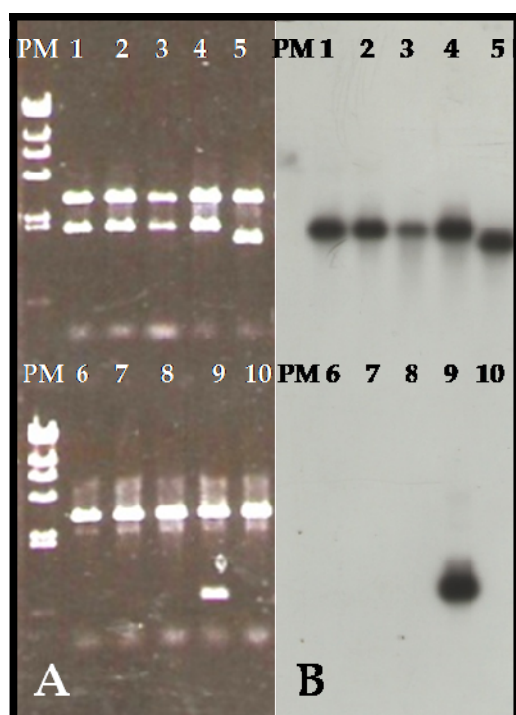


Fig. 30. A) Análisis de minipreps de clonas que contienen un inserto de región [16S+5.8S] digeridos con *EcoRI*, en agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x. PM: 10 μ L λ /HindIII; 1) Clona 1; 2) clona 2; 3) clona 3; 4) clona 4; 5) clona 5; 6) clona 6; 7) clona 7; 8) clona 8; 9) clona 9; 10) clona 10. En cada pozo se cargó 10 μ L de la reacción de digestión del miniprep de la clona correspondiente + 4 μ L de amortiguador muestra. La banda alta que se observa al nivel entre 2,355 y 4,361 pb del marcador de PM corresponde al vector pGEM (3015pb) y la de menor tamaño corresponde al inserto. **B)** Southern blot del gel mostrado en el panel A. Sonda: Cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

En la figura 30 se muestra un ejemplo de algunos minipreps que se digirieron con *EcoRI* y posteriormente se realizó una hibridación por Southern blot. Aquellos que dieron señal fueron elegidos para análisis de secuencia.

Vector	Productos de PCR clonados	Clonas que dieron señal positiva	Clonas seleccionadas	Tamaño inserto (pb)
pGEM®-T Easy (3015pb)	-RI + 28S de <i>Tf</i> (Rx. 4)	4	pTfBRI-4*	~ 1500
	-Región 16S + 5.8S de <i>Tx</i>	16	pTtxRC-5* pTtxRC-11*	~ 1,900 ~ 600
	-RI + 28S de <i>Tx</i>	1	pTtxRI-1	~ 600
Zero Blunt® TOPO®	-RI + 28S de <i>Tf</i> (Rx. 4)	20	TfBRI-11	~ 1500
	-RI + 28S de <i>Tf</i> (Rx. 5)	20	TfCRI-1 TfCRI-16	~ 600 ~ 1500
	-RI + 28S de <i>Tx</i>	16	TtxRI-1*	~ 600

Tabla 10. Clonas con las que se realizó el análisis de secuencias.

En las tablas 3 y 4 solamente se muestran aquellas clonas con las que se realizaron los análisis de secuencia. En el apéndice V se muestran todas aquellas

clonas secuenciadas. Todas las clonas seleccionadas fueron mandadas a secuenciar a partir de sus extremos tanto con el oligo *M13-Reverse* como con el oligo *M13-Forward*. Aquellas clonas marcadas con un asterisco se secuenciaron también con un oligo interno a partir de la secuencia obtenida con *M13-Reverse*.

6.6 Purificación de los productos de PCR de la región [intergénica + 28S].

Los 4 fragmentos de *T. foetus* que mostraron hibridación con la sonda heteróloga del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* se purificaron de un gel de agarosa al observar que no se obtuvieron clonas con inserto de esta región. Los 4 fragmentos que muestran hibridación con la sonda heteróloga de *T. vaginalis* (ver figura 24, carril 7) fueron aquellos que se purificaron. En la figura 31 se muestran los fragmentos purificados, sin embargo, al intentar clonarlos en el vector TOPO® no se obtuvieron clonas que tuvieran insertado alguno de los fragmentos purificados.

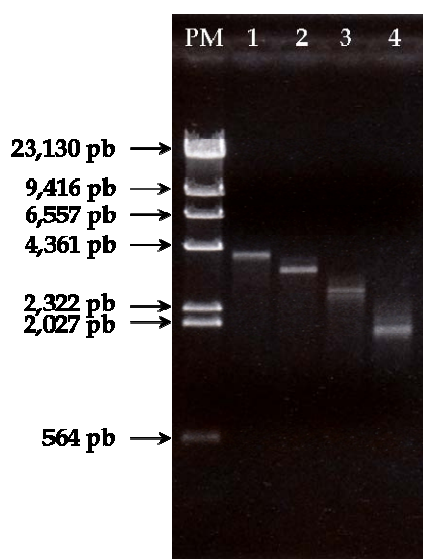


Fig. 31. Fragmentos purificados de amplificación por PCR de la región intergénica + 28S de *T. foetus* que dan señal de hibridación con la sonda heteróloga de cistrón ribosomal de *T. vaginalis*. Agarosa 0.8% en TAE 1x. PM: λ /HindIII; 1) 5 μ L fragmento A; 2) fragmento B 5 μ L; 3) 5 μ L fragmento C; 4) 5 μ L fragmento D.

A pesar de que el proceso de clonación resulta relativamente sencillo es muy importante que la reacción sea la adecuada para que se lleve a cabo exitosamente. Es por esta razón que quizá sea debido a la concentración que se



encontraba cada fragmento purificado lo que no permitió la adecuada clonación en el vector TOPO.

6.7 Análisis de secuencias.

A continuación en las figuras 32, 33 y 34 presento los mapas de los fragmentos que fueron clonados alineados con la secuencia del cistron ribosomal de *T. vaginalis* así como la identidad de cada clona respecto a la secuencia *T. vaginalis*. Las barras de color (verde, rojo o azul) corresponden a la secuencia de la clona indicada, mientras que el porcentaje señala la homología con la secuencia contra la que fue comparada. (Rev) indica el oligonucleótido por el que se inició la reacción de secuenciación fue M13-reverse, mientras que (Fw) indica el oligonucleótido M13-forward.

6.7.1 Amplificaciones de región intergénica.

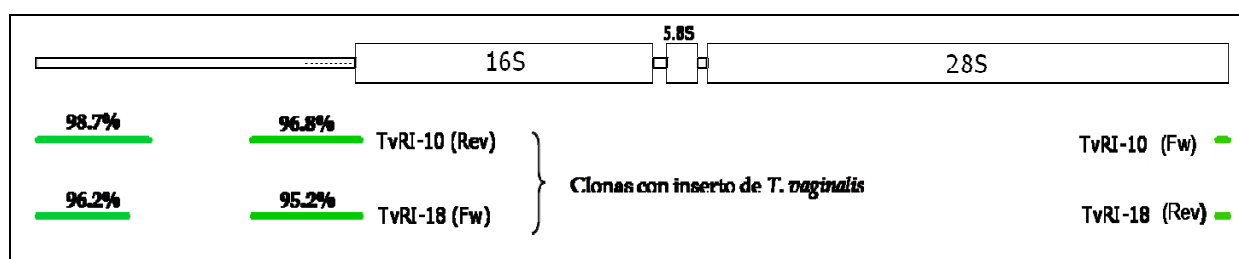


Figura 32. Mapa de las clonas de región intergénica.

6.7.2 Amplificaciones de región [16S + 5.8S].

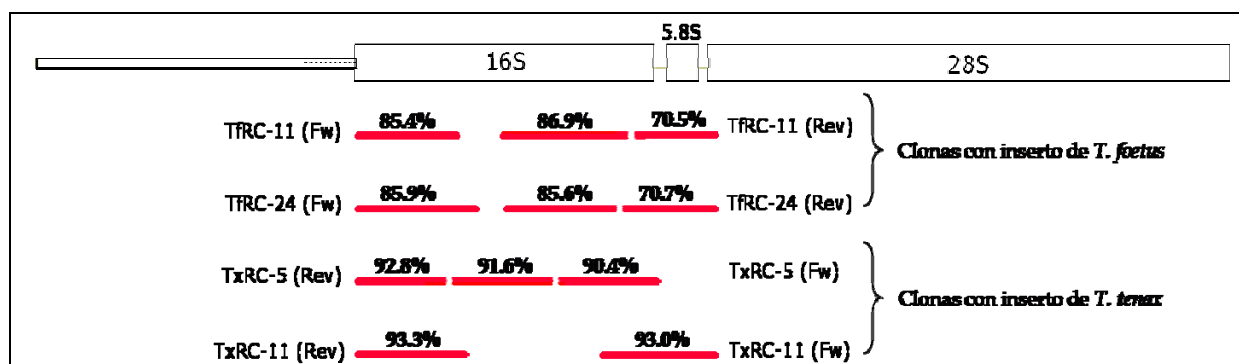


Figura 33. Mapas de las clonas de la región del 16S, 5.8S e ITSs.



6.7.3 Amplificaciones de región [intergénica+28S].

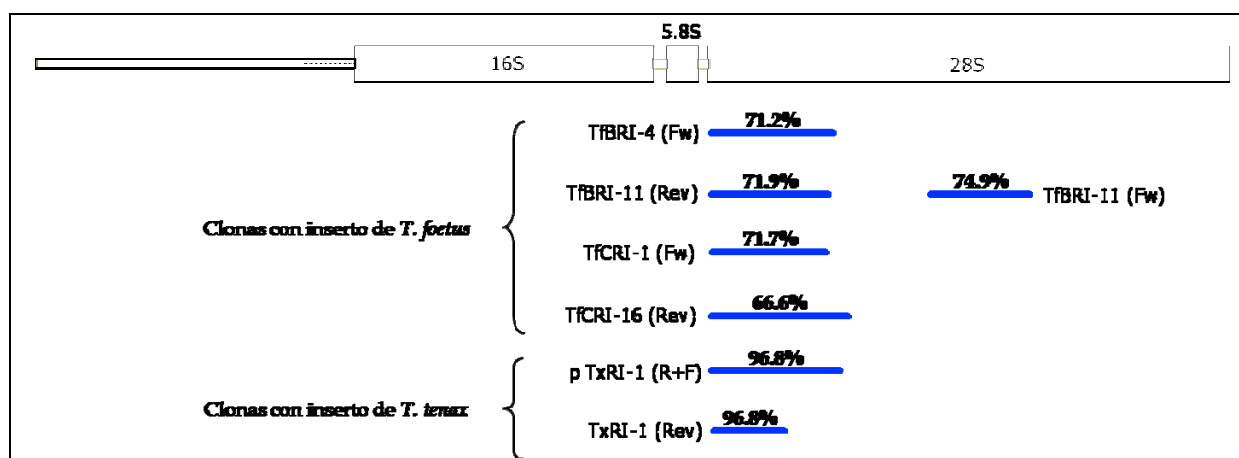


Figura 34. Mapas de las clonas de la región [intergénica+28S].

Como puede observarse en la figura 34 no se logró conocer la región intergénica del cistrón ribosomal de *T. tenax* y *T. foetus*, son las secuencias de mayor interés conocer. De acuerdo a esto, en *T. foetus* el mayor problema radicó desde un principio en la amplificación por PCR y en *T. tenax* en la clonación en los vectores quizá probablemente por el tamaño del fragmento el cual es de aproximadamente 4,600pb.

En el apéndice 6 se encuentran las secuencias así como las alineaciones correspondientes de todas las clonas mostradas en las figuras 32, 33 y 34 de este apartado.

6.7.4 Obtención de árboles filogenéticos.

Finalmente, con las secuencias obtenidas se obtuvieron árboles filogenéticos con base en las secuencias incompletas de la región 16S y de la región 28S y con base en la secuencia completa del 5.8S sin los ITSs. Los números de acceso a las secuencias del resto de los organismos se consultaron en la base de datos “*The European ribosomal RNA database*” (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/>) y se obtuvieron de *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en el apartado “*Nucleotide*”.

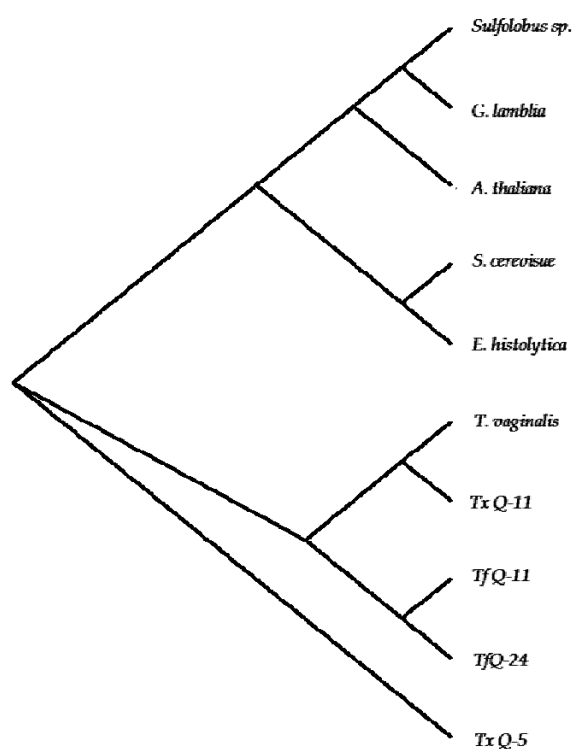


Figura 35. Árbol filogenético obtenido al alinear las secuencias del extremo 3' del rRNA 16S.

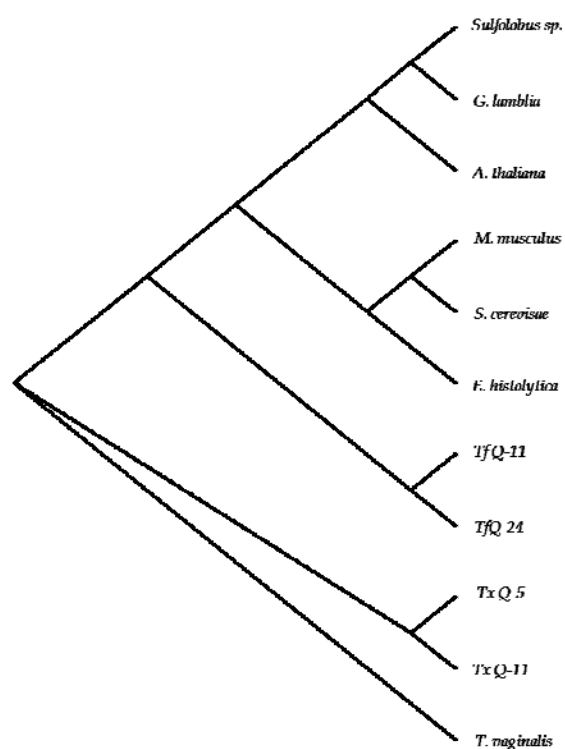


Figura 36. Árbol filogenético obtenido al alinear las secuencias del extremo 5' del rRNA 16S.

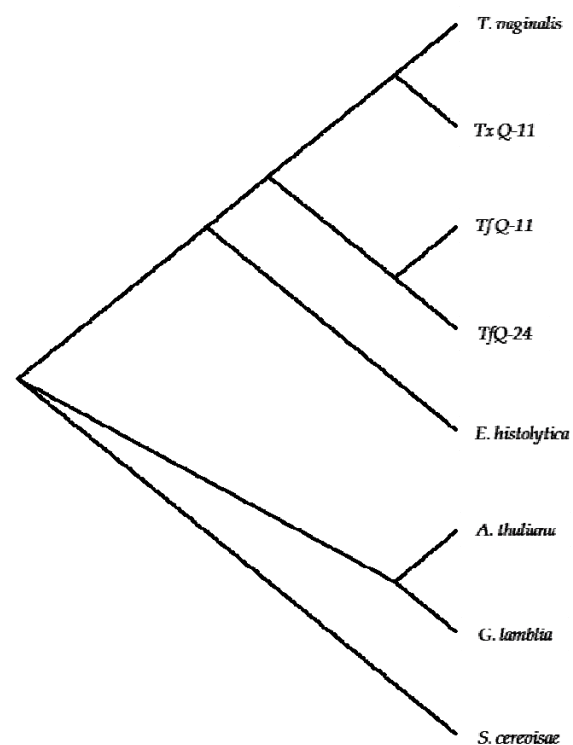


Figura 37. Árbol filogenético obtenido al alinear las secuencias del rRNA 5.8S.

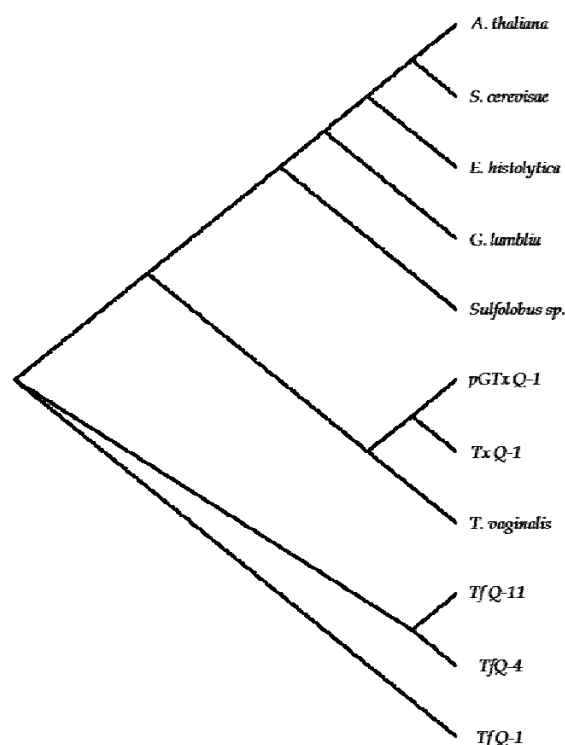


Figura 38. Árbol filogenético obtenido al alinear las secuencias del rRNA 28S.



En general, puede observarse que las secuencias de *T. vaginalis* y *T. tenax* son más cercanas entre sí que las de *T. foetus*.

Cabe mencionar que el hecho de comparar y alinear con secuencias de otros organismos para obtener relaciones filogenéticas lo realicé para establecer claramente la diferencia que hay entre los organismos. Sin embargo no olvide considerarse que las secuencias aun no están completas.

6.8 Análisis bioinformático de la secuencia del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

6.8.1 Análisis de la región intergénica.

La región intergénica de *T. vaginalis* que incluye el espaciador transcrito externo (ETS) mide aproximadamente 1,700 pb. La secuencia se insertó en la página de NCBI en el apartado "*Blast*" para tener un parámetro de comparación con otros organismos, sin embargo, este análisis no encontró identidad alguna con secuencias de otros organismos.



CAPITULO VII

CONCLUSIONES



- (1) Se logró amplificar, clonar y secuenciar parte de la región codificadora del cistrón ribosomal de *T. foetus* y *T. tenax* y con base en las secuencias obtenidas se realizó el análisis comparativo correspondiente.
- (2) De acuerdo a los resultados obtenidos queda clara la cercanía filogenética entre *T. vaginalis* y *T. tenax*. Esto demuestra que *T. foetus* no es el parásito más cercano evolutivamente a *T. vaginalis* lo cual está relacionado con la similitud entre ambas secuencias. Schwebke JR y Burgess D (2004) afirman que la respuesta causada por *T. foetus* en el tracto reproductivo es muy similar a la causada por *T. vaginalis*. Sin embargo, es claro que a pesar de que ambos parásitos sean causantes de una enfermedad de transmisión sexual la relación filogenética entre ellos no es tan cercana como la relación entre *T. vaginalis* y *T. tenax*.
- (3) De acuerdo a los resultados obtenidos es claro que la amplificación por PCR de la región intergénica de *T. foetus* resultó ser muy inespecífica y la clonación no se pudo llevar a cabo. Quizá pudo haberse logrado la clonación de los insertos purificados mayores a 2Kb utilizando otro vector como el "*TOPO[®] XL PCR Cloning Kit*" (Invitrogen) ya que éste sirve para clonar insertos mayores a 1Kb.



- (4) Por otra parte, no puede dejar de considerarse que pudo haber amplificación inespecífica en el caso de *T. foetus*, pues varias de las clonas obtenidas contienen un inserto que aunque haya dado señal de hibridación con la sonda heteróloga, no correspondía al tamaño esperado para el cistrón ribosomal.



CAPITULO VIII

PERSPECTIVAS



- Terminar de secuenciar las clonas de la región Intergénica de *T. vaginalis*, así como las de la región 16S + 5.8S de *T. foetus*.
- Hacer una biblioteca genómica de *T. foetus* y *T. tenax* para así tener los fragmentos que dan señal de hibridación generados al digerir el DNA genómico con *EcoRI*.
- Realizar ensayos de retardos para identificar la funcionalidad de la región promotora del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*, *T. foetus* y *T. tenax*.
- Completar el análisis comparativo de las secuencias y tratar de identificar el promotor y los elementos regulatorios de la transcripción para la RNA polimerasa I en los tres tricomonádidos.



CAPITULO IX

BIBLIOGRAFÍA



- 1) Alderete JF, Crouch ML y Arroyo R. 2004. Mecanismos de patogénesis de la trichomonosis: la enfermedad de transmisión sexual no viral numero uno causada por *Trichomonas vaginalis* en La frontera: Genética molecular de la enfermedad. Pp. 167-200.
- 2) Benchimol M. 2005. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. Parasitology Research. Pp. 97: 408-416.
- 3) Brown WM y Brown PW. 2002. Eukaryotic Transcription in Transcription, Cell and Biomolecular Sciences. Pp. 71-83.
- 4) Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, et al. 2007. Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science. 315: 207-212.
- 5) Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L y Campos I. 2000. To be or not to be in the nuclaolus. Nature Cell Biology. 2: E107-E112.
- 6) Caudy AA y Pikaard CS. 2002. *Xenopus* Ribosomal RNA Gene Intergenic Spacer Elements Conferring Transcriptional Enhancement and Nucleolar Dominance-like Competition in Oocytes. The Journal of Biological Chemistry. 277: 31577-31584.
- 7) Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR y Yowell CA. 1992. Characterization of the rDNA unit sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. Molecular and Biochemical Parasitology. 52: 75-84.
- 8) Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland, Petrin DP y Garber GE. 2004. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. Clinical Microbiology Reviews. 17: 783-793.
- 9) Dacks JB, Walker G y Field MC. 2007. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. Parasitology International. 57: 97-104.
- 10) Doudna JA y Rath VL. 2002. Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome: The Next Frontier. Cell. 109: 153-153.
- 11) Embley TM y Martin W. 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. Nature. 440: 623-630.
- 12) Felleisen RS. 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology. 115: 111-119.



- 13) Fukura K, Yamamoto A, Hashimoto T, Goto N. 1996. Nucleotide sequence of the SrRNA gene and phylogenetic analysis of *Trichomonas tenax*. Microbiol Immuno. 40:183-188.
- 14) Garrett R. 1999. Mechanic of the Ribosome. Nature. 400: 811-812.
- 15) Grummt I. 2006. Actin and myosin as transcription factors. Current opinion in genetics & development. 16: 191-196.
- 16) Hannan KM, Hannan RD y Rothblum LI. 1998. Transcription by RNA Polymerase I. Frontiers in Bioscience. 3: 376-398.
- 17) Hernandez-Verdun D. 1991. The nucleolus today. Journal of Cell Science. 99: 465-471.
- 18) Kleina P, Bettim-Bandinelli, Bonatto SL, Benchimol M y Reis Bogo. 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. International Journal for Parasitology. 34: 963-970.
- 19) Lehker MW, Arroyo R y Alderete JF. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 171: 2165-2170.
- 20) López-Villaseñor I, Contreras AP, López-Griego L, Alvarez-Sánchez E y Hernández R. 2004. *Trichomonas vaginalis* Ribosomal DNA: Analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. Molecular & Biochemical Parasitology. 137: 175-179.
- 21) Lossick JG. 1989. Single-dose metronidazole treatment for vaginal trichomoniasis. Obstret. Gynecol. 56: 508-510.
- 22) Lun ZR, Chen XG, Z XQ, Li XR y Xie MQ. 2005. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms. TRENDS in Parasitology. 21: 122-125.
- 23) Lun ZR y Gajadhar AA. 1999. A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. J Vet Diagn 11: 471-474.
- 24) Mandal RK. 1984. The organization and Transcription of Eukaryotic Ribosomal RNA Genes. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 31: 115-160.



- 25) Mattos A, Sole-Cava AM, DeCarli G y Benchimol M. 1997. Fine structure and isozymic characterization of trichomonadid protozoa. *Parasitology Research*. 83: 290-295.
- 26) Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I y Santoro R. 2006. Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Molecular Cell*. 22: 351-361.
- 27) Mèlèse T y Xue Z. 1995. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*. 7: 319-324.
- 28) Meysick K y Garber GE. 1995. *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infection Diseases*. 8: 22-25.
- 29) Muller M. 1993. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*. 139: 2879-2889.
- 30) Olsen GJ y Woese CR. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*. 7: 113-123.
- 31) Owen-Rae D y Crews JE. 2006. *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin Food Anim*. 22: 595-611.
- 32) Paule MR y White RJ. 2000. Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research*. 28: 1283-1298.
- 33) Penedo-Carvalho K y Rocha-Gadelha AP. 2007. Effects of three benzimidazoles on growht, general morphology and ultrastructure of *Tritrichomonas foetus*.
- 34) Pereira-Neves A, Consort Ribeiro K y Benchimol M. Pseudocysts in Trichomonads – New insights. *Protist*. 154: 313-329.
- 35) Rae DO y Crews JE. 2006. *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin Food Anim*. 22: 595-611.
- 36) Raska I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová y Masata M. 2004. The nucleolus and transcription of Ribosomal genes. *Biology of the cell*. 96: 579-594.
- 37) Reeder RH. 1989. Regulatory Elements of the Generic Ribosomal Gene. *Current Opinion in Cell Biology*. 1: 466-474.
- 38) Reeder RH. 1990. rRNA synthesis in the nucleolus. *TIG*. 6: 390-394.



- 39) Russell J y Zomerdijs J. 2005. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 30: 87-96.
- 40) Schwebke JR y Burgess D. 2004. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 17:794-803.
- 41) Shaw P y Doonan J. 2005. The Nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle*. 4: 102-105.
- 42) Sirri V, Urcuqui-Inchima, Roussel P y Hernández-Verdun D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol*. 129: 13-31.
- 43) Sogin ML. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current opinion in genetics and Development*. 1: 457-463.
- 44) Sollner-Webb B y Mougey EB. 1991. News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends in Biochemical Science*. 16: 58-62.
- 45) Soper D. 2004. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 190: 281-290.
- 46) Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, et al. 2001. *Trichomonas vaginalis*, HIV and African-Americans. *Emerg Infect Dis*. 7: 927-932.
- 47) Swygard H, Seña AC, Hobbs MM y Cohen MS. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. 2004. *Sex Transm Infect*. 80: 91-95.
- 48) Tachezy J, Tachezy R, Hampl V, et al. 2002. Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J. Eukaryot. Microbiol*. 49: 154-163.
- 49) Vanacova S, Liston DR, Tachezy J y Johnson PJ. 2002. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*. 33: 235-255.
- 50) Warner JR. 1990. The nucleolus and ribosome formation. *Current opinion in Cell Biology*. 2: 521-527.
- 51) Wang AL y Wang CC. 1984. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 14: 323-335.



- 52) White RJ. 2001. Transcription by RNA Polymerase I in Gene Transcription Mechanism and Control, Blackwell Science. Pp. 102-112.
- 53) WHO. 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and Estimates.
- 54) Xu WD, Lun ZR y Gajadhar A. 1998. Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. Veterinary Parasitology 78: 247-251.
- 55) Yarlett N. 2001. Trichomonads. Encyclopedia of life sciences. Pp. 1-8.
- 56) Yuh YS. Liu JY y Shaio MF. 1997. Chromosome Number of *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol. 83: 551-553.



CAPITULO X

APÉNDICES



APÉNDICE I

10.1 Preparación de marcador de peso molecular.

Como marcador de peso molecular para la electroforesis en geles de agarosa se utilizó DNA genómico de lambda (48,502 pb) digerido con *Hind*III. Para esto se procedió como sigue:

La concentración requerida para usarse como marcador de peso molecular es de 100ng/μL. Si el DNA de lambda tiene una concentración de 500ng/μL, para preparar un mililitro de marcador, se digirió una alícuota de 200μL del stock de DNA genómico para la reacción de digestión. Esto es,

$$V_{stock} = \frac{C_f V_f}{C_{stock}} = \frac{(100ng / \mu L)(1000\mu L)}{500ng / \mu L} = 200\mu L$$

Una vez conociendo este volumen se procede a realizar una reacción de digestión con *Hind*III. Para esto, a un tubo se le añadieron: 415μL de agua bidestilada, 70μL de amortiguador REact2® 10x (Invitrogen), 200μL del DNA genómico de lambda (GibcoBRL) y 15μL de la enzima (Invitrogen) que corresponden a 150U. Se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente el tubo se incubó en hielo durante 5 minutos y se le agregaron 300μL de amortiguador muestra. El tubo se calentó a 65°C durante 10 minutos y luego se puso en hielo 5 minutos. Finalmente se centrifugó 10 segundos a velocidad máxima. Se conserva a -20°C.

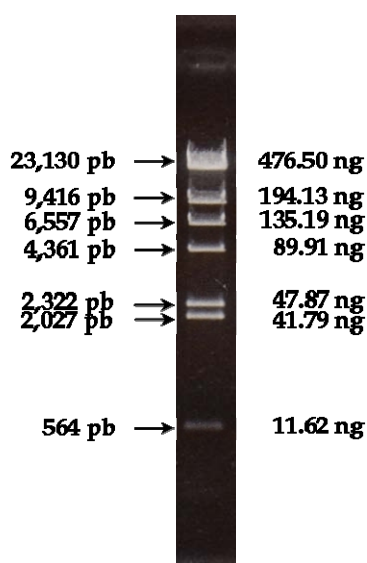


Fig. 38. Análisis del DNA genómico de lambda digerido con *Hind*III en gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1x. Se cargaron 10μL del marcador de PM. En el lado izquierdo de la figura se presenta el peso aproximado de los fragmentos mientras que en el lado derecho el peso aproximado de cada fragmento.



El DNA genómico de lambda digerido con *HindIII* se utilizó como marcador de peso molecular en todos los geles de agarosa que se presentarán más adelante. Por esto y para fines prácticos se le llama $\lambda/HindIII$.

Puesto que se conoce el tamaño y peso aproximado de cada fragmento, no solo es útil como marcador de peso molecular, también lo es para determinar la cantidad de DNA cargado si se considera que en 10 μ L de marcador hay 1 μ g de DNA de lambda.



APÉNDICE II

10.2 Soluciones utilizadas.

Medio TYM. Para preparar 500mL de medio:

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Maltosa	2.5 g
L-Cisteina	0.5 g
Ácido ascórbico	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.4 g
Agua bidestilada	450mL

1. Ajustar el pH a 6.2 con HCl, aforar a 500mL y esterilizar en autoclave por 20 minutos.
2. Conservar en refrigeración.

Medio LB líquido. Para preparar 500mL de medio:

Peptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Cloruro de sodio	2.5 g
NaOH 10M	150μL
Tris 1M pH 8	5mL

1. Aforar a 500mL y esterilizar en autoclave por 20 minutos.
2. Conservar a temperatura ambiente.

PBS (Solución de sales de fosfato). Para preparar 1L de solución:

Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Agua bidestilada	800mL

1. Ajustar el pH a 7.4 con HCl, aforar y esterilizar en autoclave por 20 minutos.
-



2. Conservar a temperatura ambiente.

TAE 50X. Para preparar 50mL:

Tris	121 g
Ácido acético glacial	2.85mL
EDTA	5mL

1. Aforar a 50mL y esterilizar en autoclave por 20 minutos.

2. Conservar a temperatura ambiente.

TE (Amortiguador Tris-EDTA). Para preparar 100mL:

Tris 10mM	1mL de Tris 1M
EDTA 0.2mM	40uL de EDTA 0.5M

1. Aforar a 100mL con agua bidestilada y esterilizar en autoclave por 20 minutos.

2. Conservar a temperatura ambiente.

HCl 0.25 ----- 500mL

A 250mL de H₂O bidestilada adicionar 10.4mL de HCl y llevar al aforo.

Solución de desnaturalización ----- 500 mL

NaCl	43.83g	Disolver el NaCl en 250mL de H ₂ O bidestilada, adicionar el volumen correspondiente de NaOH 10N y llevar al aforo.
NaOH 10N	25mL	

Solución de neutralización ----- 500mL

Tris/HCl 2M pH 7.5	125mL	Disolver el NaCl en 250mL de H ₂ O bidestilada, adicionar el volumen correspondiente de Tris/HCl 2M y llevar al aforo.
NaCl	87.66g	

Solución de transferencia (NH₄Ac 1M, NaOH 0.02N) ----- 1000mL

Ácido acético 17.4M	57.5mL	A 500 mL de H ₂ O bidestilada, adicionar el volumen correspondiente de las soluciones indicadas y llevar al aforo.
Hidróxido de amonio 7.1M	140.8mL	
NaOH 10N	2mL	

Solución de hibridación ----- 30mL

[Stock]	[Final]	10mL
Tris 1M pH 7.4	50mM	0.5mL
Denhardt's 100x	5x	1mL
Formamida	50%	5mL
SDS 10%	1%	1mL
SSC 20x	5x	2.5mL

El volumen a preparar debe ser suficiente para su utilización, por lo cual es conveniente prepararla en un tubo Falcon y aquel volumen que sobre puede conservarse a -20°C. Es importante adicionar cada solución en el orden indicado en la tabla para evitar la precipitación del SDS.

NaOH 3N ----- 1mL

A 700 µL de H₂O bidestilada estéril adicionar 300 µL de NaOH 10N.

HCl 3N ----- 1mL

A 744.4 µL de H₂O bidestilada estéril adicionar 255.6 µL de HCl fumante.

➤ Clonación en pGEM.

❖ *Solución stock Ampicilina (100mg/mL)*

Disolver 100mg de Ampicilina sódica en 1mL de agua estéril. Conservar a -20°C. La concentración final en cada caja debe ser 100 µg/mL.

❖ *Solución stock IPTG (100mM)*

Disolver 1.2g de IPTG en 50mL de agua estéril. Esterilizar por filtración en campana y recubrir con papel aluminio. Conservar a 4°C. La concentración final en cada caja debe ser 0.5mM.

❖ *Solución stock X-Gal (50mg/mL)*

Disolver 100mg de 5-Br-4-Cl-3-indol-β-D-galactosidasa en 2 mL de N,N-dimetil-formamida. Recubrir con papel aluminio y conservar a -20°C. La concentración final en cada caja debe ser 8µg/mL.



❖ Medio SOC

Triptona	2%	Disolver y esterilizar en autoclave. Añadir Mg^{2+} 20mM (stock Mg^{2+} 2M) y Glucosa 20mM (stock Glu 1M). El Mg^{2+} 2M ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1M/ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1M) y la Glucosa 1M se esterilizan por filtración. Guardar en tubo Falcon de 50mL y conservar a $-20^{\circ}C$. <u>Antibiótico adecuado:</u>
Extracto de levadura	.5%	
Cloruro de sodio	10mM	
Cloruro de potasio	2.5mM	

- Clonación en topo: Kanamicina $50\mu g/\mu L$.
- Clonación en pGEM T-Easy: Ampicilina $100\mu g/\mu L$.

➤ Soluciones para miniprepsSolución I. Para preparar 100mL

Glucosa 50mM -----	5mL de Glucosa 1M
Tris-HCl pH 8, 25 mM ----	2.5mL de Tris-HCl 1M
EDTA pH 8 10 mM -----	2mL de EDTA 0.5M
H ₂ O bidestilada estéril ---	90.5mL

Solución II. Para preparar 5mL

NaOH 0.2N -----	0.2 mL de NaOH 5M
SDS 1% -----	0.5mL de SDS 10%
H ₂ O bidestilada estéril ---	4.3mL

Solución III. Para preparar 100mL

Acetato de potasio 5M ---	60mL
Ácido acético glacial -----	11.5mL
H ₂ O bidestilada estéril ---	28.5mL



APÉNDICE III

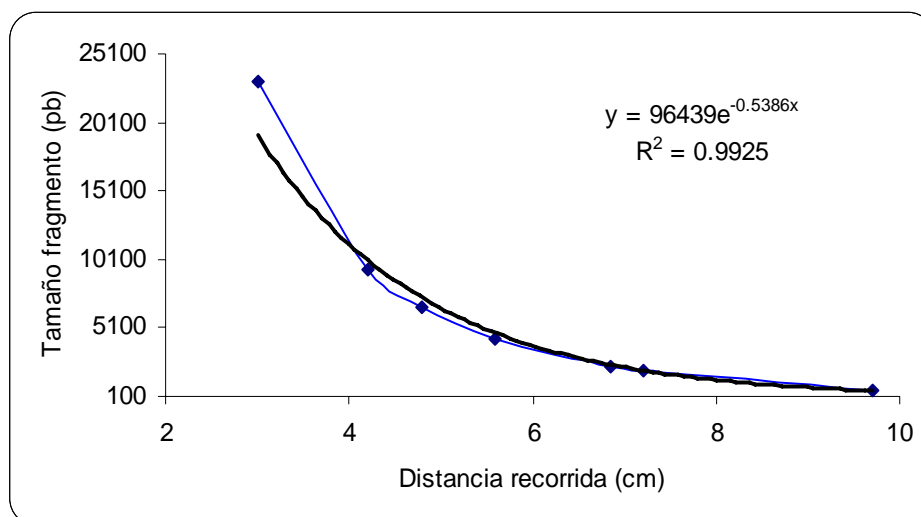
10.3 Cálculo del tamaño aproximado de las señales de hibridación.

1. Medir la distancia de las bandas del marcador de peso molecular $\lambda/HindIII$ tomando como cero la altura del pozo de carga.

Distancia (cm)	Tamaño (pb)	Cantidad (ng)
3.0	23,130	476.50
4.2	9,416	194.13
4.8	6,557	135.19
5.6	4,361	89.91
6.85	2,322	47.87
7.2	2,027	41.79
9.7	564	11.62

2. Con estos datos, se graficó en Excel y posteriormente se agregó una línea de tendencia central de tipo exponencial para así obtener la ecuación con la que se calculó el tamaño aproximado de las señales de hibridación donde "x" corresponde a la distancia (cm) a la que aparece cada señal.

Grafico 1



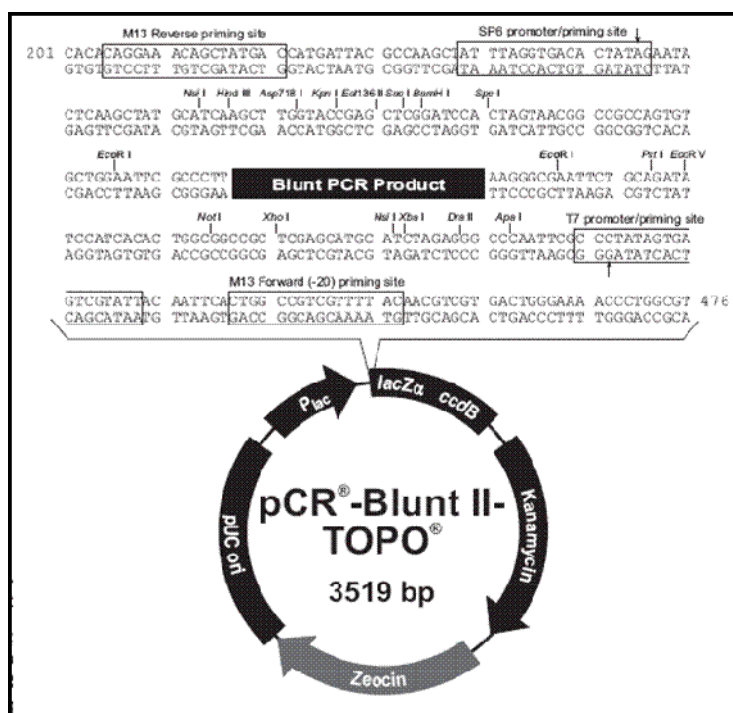
3. En la ecuación obtenida se sustituyen los resultados obtenidos para obtener los tamaños aproximados.



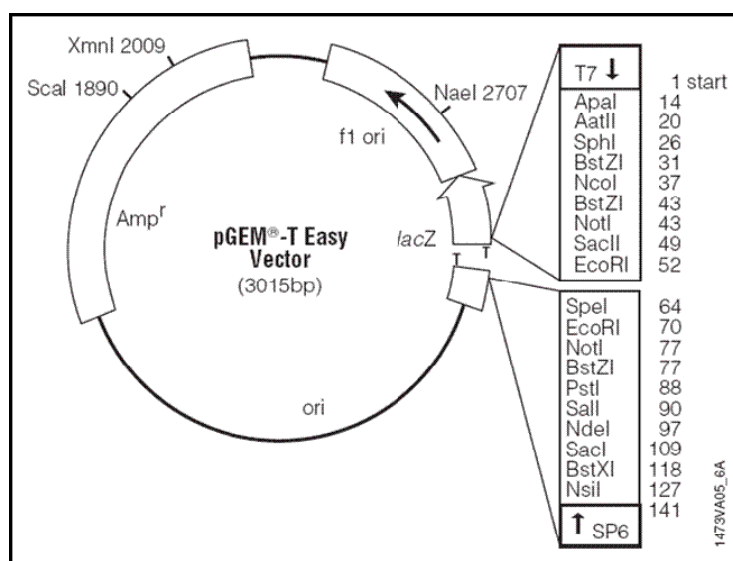
APÉNDICE IV

10.4 Vectores de clonación.

a) Zero-Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen). 3519 pb.



b) pGEM®-T Easy Vector System (Promega). 3015 pb.





APÉNDICE V

10.5 Oligonucleótidos de secuenciación.

Nombre	Secuencia	Clonas secuenciadas	
M13-Reverse*	5´ - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3´	TvRI-10 TfRC-11 TfRC-24 TfBRI-5 TfBRI-9 TfBRI-11 TfBRI-12 TfCRI-1	TfCRI-7 TfCRI-16 TtxRI-1 TfCRI-14 TtxRC-5 TtxRC-8 TtxRC-11 TtxRI-1 TfBRI-4
M13-Forward*	5´ - GTA AAA CGA CGG CCA G -3´	TvRI-10 TfRC-11 TfRC-24 TBRI-11	TfCRI-1 TtxRC-5 TtxRC-11 TtxRI-1 TfBRI-4
16STf-Q4*	5´ - CCC GAG GGA TTA GGT CGA CGA -3´	TfBRI-4	
28STf-Q11*	5´ - CCT ACC GTT ACC TTG TTA CGA C -3´	TfRC-11 TfRC-24	
28STx-Q1*	5´ - AGT TCC TGA ACT TGC TTA GGG -3´	TtxRI-1	
16STx-Q5*	5´ - GAC CAG TTC CAT CGA TGC CAT -3´	TtxRC-5 TtxRC-11	

* Estos oligonucleótidos son universales y por lo tanto sirvieron para secuenciar ambos vectores utilizados.

* Estos oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia obtenida en la reacción con el oligonucleótido

M13-Rev.



APÉNDICE VI

10.6 Secuencias y alineamientos.

Las secuencias de las clonas presentadas en las figuras 32, 33 y 34 del apartado 6.7 se muestran a continuación. Todas las secuencias se encuentran en dirección 5' → 3' y están alineadas con la secuencia del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* de la clona de nuestro laboratorio.

❖ Extremo 5' de la región intergénica.

Cistrón-T.vag	ATTACGTCCA	CGACCTGTTG	AGGTTTCAGCT	TCGCTTCTAG	GTTTCCAAAT	ATTTTGGATT
CTTGTAAC GAGT	ATTACGTCCA	CGACCTGTTG	AGGTTTCAGCT	TCGCTTCTAG	GTTTCCAAAT	ATTTTGGATT
TvRI-18	ATTACGTCCA	CGACCTGTTG	AGGTTTCAGCT	TCGCTTCTAG	GTTTCCAAAT	ATTTTGGATT
Cistrón-T.vag	TTTTTCAAGT	GTAAGTGTCA	CTTTTATATC	CACGGGCCGC	TATATGAGCA	TCAAATATAC
TvRI-10	TTTTTCAAGT	GTAAGTGTCA	CTTTTATATC	CACGGGCCGC	TATATGAGCA	TCAAATATAC
TvRI-18	TTTTTCAAGT	GTAAGTGTCA	CTTTTATATC	CACGGGCCGC	TATATGAGCA	TCAAATATAC
Cistrón-T.vag	TAACTAAAAA	TACAATAATC	ATATAGGAAT	GAAAAAAGAT	ATTAAAGCGA	AAACTCAAAA
TvRI-10	TAACTAAAAA	TACAATAATC	ATATAGGAAT	GAAAAAAGAT	ATTAAAGCGA	AAACTCAAAA
TvRI-18	TAACTAAAAA	TACAATAATC	ATATAGGAAT	GAAAAAAGAT	ATTAAAGCGA	AAACTCAAAA
Cistrón-T.vag	AACAAATACT	TAAGTATATA	GGCTAACTAA	TACACATACT	AAGCTTATAA	GTTTAGACTG
TvRI-10	AACAAATACT	TAAGTATATA	GGCTAACTAA	TACACATACT	AAGCTTATAA	GTTTAGACTG
TvRI-18	AACAAATACT	TAAGTATATA	GGCTAACTAA	TACACATACT	AAGCTTATAA	GTTTAGACTG
Cistrón-T.vag	AAGGTATATC	TAAAAAACAT	ATATCAAGTT	ACATAGTATT	AAGCGTATAT	ATATGGAGTG
TvRI-10	AAGGTATATC	TAAAAAACAT	ATATCAAGTT	ACATAGTATT	AAGCGTATAT	ATATGGAGTG
TvRI-18	AAGGTATATC	TAAAAAACAT	ATATCAAGTT	ACATAGTATT	AAGCGTATAT	ATATGGAGTG
Cistrón-T.vag	TCACGTTTAT	ATCCACGGGC	CGCTTTGGTA	GTCTTCCTAG	CAAAATCCAT	ACGAGTCGAA
TvRI-10	TCACGTTTAT	ATCCACGGGC	CGCTTTGGTA	GTCTTCCTAG	CAAAATCCAT	A-AAGTCGAA
TvRI-18	TCACGTTTAT	ATCCACGGGC	CGCTTTGGTA	GTCTTCCTAG	CAAAATCCAT	A-AAGTCGAA
Cistrón-T.vag	GGG-AGACTA	ATCTAAGTC-	TCCTATCAAA	GTC-TATCAA	AAA--TTTTT	AAGAT--GAT
TvRI-10	GGG-AGACTA	ATCTAAGTC-	TCCTATCAAA	GTC-TATCAA	AAA--TTTTT	AAGAT--GAT
TvRI-18	GGGAGACTA	ATCTAAGTCC	TCCTATCAAA	GTCCTATCAA	AAAATTTTT	AAGAATGGAT
Cistrón-T.vag	AGG-ACGAAA	AACATATGTGA	TTTAGTTTCG	TCGG-TAAAA	CC-AAAAAAT	TCGCCCTAAA
TvRI-10	AGG-ACGAAA	AACATATGTGA	TTTAGTTTCG	TCGG-TAAAA	CC-AAAAAAT	TCGCCCTAAA
TvRI-18	AGGGACGAAA	AACATATGTGA	TTTAGTTTCG	TCGGGTAAAA	CCCAAAAAAT	TCGCCCTAAA
Cistrón-T.vag	GATATAC-GT	AAGATATA-T	ACTATTCCCT	ATAACTAAGA	-TATATATAC	-ATATAAC-A
TvRI-10	GATATACCGT	AAGATATA-T	ACTATTCCCT	ATAACTAAGA	-TATATATAC	CATATAAC-A
TvRI-18	GATATACGTA	AAGATATAAT	ACTATTCCCT	ATAACTAAGA	ATATATATTA	CCTATAACCA
Cistrón-T.vag	TAT-ATGA--	TTAGTGCTTC	-GTATAACAT	TACAAATGAT	TCTCGAAAAA	AAT-CGATTT
TvRI-10	TAT-ATGA--	TTAGTGCTTC	CGTATA-CAT	TACAAATGAT	TCTCGAAAAA	AAAACGATTT
TvRI-18	TATTATGAAT	TTGGGGCTTT	CG-----	-----	-----	-----
Cistrón-T.vag	T--GAAAAAT	TTGACACAAA	ATG-CATTAT	ATCTCAGTGA	ATACTTAAGC	TATCGAAATG
TvRI-10	TTGAAAAAAT	TTGACACAAA	ATGGCATTAT	ATCTCAGTGA	ATCCTTAAGC	TATCGAA-TG
TvRI-18	-----	-----	-----	-----	-----	-----



❖ Extremo 3' de la región intergénica.

Cistrón-T.vag	CATATTCGAT	GGTTTTAAGA	GATACGAAAT	TATTTTGGAA	ATATAATATC	TACACATAAG
TvRI-10	-----	-----	-----	-----	-----	-----TAAG
TvRI-18	-----	-----	-----	-----	-----TTCTC	CCCCTTAAGG
Cistrón-T.vag	TAGTATAAT-	GTTACTACGT	TTG-TAGTTT	TTCGTTTT--	AGCACAC-TT	TACC-ATATA
TvRI-10	TAGTATAATT	GTTATTACGT	TTGGTAGGTT	TTTGGTTTTA	AGCACACCTT	TACC-ATATA
TvRI-18	TAGTATAAT-	GTTACTACGG	TTGGGAGTTT	TTCGTTTTT-	AGCACACTTT	TACCCATATA
Cistrón-T.vag	CTTTT-GAAA	ATC-AGAT-A	ATTATTTTTT	A--TTCAAAT	AG-TTGTCGT	AGGTGGGC-A
TvRI-10	CTTTTGGAAA	ATCCAGATTA	ATTATTTTTT	TATTTCAAAT	AGGTGTGTCGT	AGGTGGGCCA
TvRI-18	CTTTT-GGAA	ATTCAGAT-A	ATTATTTTTT	A-TTCAAAT	AG-TTGTCGT	AAGGTGGGCA
Cistrón-T.vag	CATGT-ACGG	A--GTTATAA	TCATAACTCC	CC-ATGCT-C	CACAACATTG	-CCCATACAA
TvRI-10	CATGT-ACGG	GAGGTTATAA	TCATAACTCC	CCCATGCTTC	CACAACATTG	GCCCATACAA
TvRI-18	CATGTTACGG	A--GTTATAA	TCATAACTCC	CC-ATGCTCC	CACAACATTG	CCCCATACAA
Cistrón-T.vag	AGTTTGCTC-	-GGGGACGCT	TGTGTAT-GA	GCAAGACGAA	AAAA-TACCT	GAAACTCGAC
TvRI-10	AGTTTGCTTC	GGGGGACGCT	TGTGTATTGA	GCAAGACGAA	AAAAATACCT	GAAACTCGAC
TvRI-18	AGTTTGCTC-	-GGGGACGCT	TGTGTAT-GA	GCAAGACGAA	AAAA-TACCT	GAAACTCGAC
Cistrón-T.vag	TCC-ATCGAT	TGAATTTTTG	TAGACCGAAA	AACATGACCT	TTTGCTCC-T	ATGGGAAAGT
TvRI-10	TCC-ATCGAT	TGAATTTTTG	TAGACCGAAA	AACATGACCT	TTTGCTCCCT	ATGGGAAAGT
TvRI-18	TCCCATCGAT	TGAATTTTTG	TAGACCGAAA	AACATGACCT	TTTGCTCCCT	ATGGGAAAGT
Cistrón-T.vag	TGCAAAACGA	TTCCAGTTAT	GAGTAAGCAT	TTCTTACTAA	ATCTAGCCGA	GTCTGGTATA
TvRI-10	TGCAAAACGA	TTCCAGTTAT	GAGTAAGCAT	TTCTTACTAA	ATCTAGCCGA	GTCTGGTATA
TvRI-18	TGCAAAACGA	TTCCAGTTAT	GAGTAAGCAT	TTCTTACTAA	ATCTAGCCGA	GTCTGGTATA
Cistrón-T.vag	TA-CAACAGG	GAGAATCACC	TCCAGACGGC	TGACGAGTTA	ATATGTTACA	TATTGATTCT
TvRI-10	TAA-CAACAGG	GAGAATCACC	TCCAGACGGC	TGACGAGTTA	ATATGTTACA	TATTGATTCT
TvRI-18	TAA-CAACAGG	GAGAATCACC	TCCAGACGGC	TGACGAGTTA	ATATGTTACA	TATTGATTCT
Cistrón-T.vag	GTCTTAGATG	TGCGAAATTA	CAGCACGCGC	TTATTTATAA	TTTGGCATT	AACTTT-CGA
TvRI-10	GTCTTAGATG	TGCGAAATTA	CAGCACGCGC	TTATTTATAA	TTTGGCATT	AACTTTTCGA
TvRI-18	GTCTTAGATG	TGCGAAATTA	CAGCACGCGC	TTATTTATAA	TTTGGCATT	AACTTT-CGA
Cistrón-T.vag	TGACTTCGCG	TCATCATGTA	TTATGGATAT	TT-CAGTGGC	ATCATAACAA	GATACATTGA
TvRI-10	TGACTTCGCG	TCATCATGTA	TTATGGATAT	TT-CAGTGGC	ATCATAACAA	GATACATTGA
TvRI-18	TGACTTCGCG	TCATCATGTA	TTATGGATAT	TT-CAGTGGC	ATCATAACAA	GATACATTGA
Cistrón-T.vag	AAAAAGATCT	TAATACATCT	TTTTTAATCG	CGATACTTGG	TTGATCCTGC	CAAGGAAGCA
TvRI-10	AAAAAGATCT	TAATACATCT	TTTTTAATCG	CGATACTTGG	TTGATCCTGC	CAAGGAAGCA
TvRI-18	AAAAAGATCT	TAATACATCT	TTTTTAATCG	CGATACTTGG	TTGATCCTGC	CAAGGAAGCA
Cistrón-T.vag	CAC					
TvRI-10	CAC					
TvRI-18	CAC					



❖ Extremo 5' de la región [16S+5.8S].

Cistrón-T.vag	ATCCTGCCAA	GGAAGCACAC	TTAGGTCATA	GATTAAGCCA	TGCAAGTGTT	AGTTCAGG--
TxRC-5	ATCCTGCCAA	GGAAGCACAC	TAAGGTCATA	GATTAAGCCA	TGCAAGTGTT	AGTTCAGTGT
TxRC-11	ATCCTGCCAA	GGAAGCACAC	TAAGGTCATA	GATTAAGCCA	TGCAAGTGTT	AGTTCAGTGT
TfRC-11	ATCCTGCCAA	GGAAGCACAC	TTCGGTCATA	GATTAAGCCA	TGCAAGTGTT	AGTTCAGG--
TfRC-24	ATCCTGCCAA	GGAAGCACAC	TTCGGTCATA	GATTAAGCCA	TGCAAGTGTT	AGTTCAGG--

Cistrón-T.vag	TAACGAAACT	GCGAATAGCT	CATTAATACG	CTCAGAATCT	ATTTGGCGGC	GACCAA-CAG
TxRC-5	TAACGAAACT	GCGAATAGCT	CATTAATACG	CTCAGAATCT	ATTTGGCGGC	GACCAA-CAG
TxRC-11	TAACGAAACT	GCGAATAGCT	CATTAATACG	CTCAGAATCT	ATTTGGCGGC	GACCAA-CAG
TfRC-11	CAACGAAACT	GCGAACAGCT	CATTAACACG	CTCAGAATCT	ACTTGGTGGC	GACCTTTCAG
TfRC-24	CAACGAAACT	GCGAACAGCT	CATTAACACG	CTCAGAATCT	ACTTGGTGGC	GACCTTTCAG

Cistrón-T.vag	GTCTTAAATG	GATAGCAGCA	GCAACTCTGG	TGCTAATACA	TGCGATTGTT	TCTCCAGATG
TxRC-5	GTCTTAAATG	GATAGCAGCA	GCAACTCTGG	TGCTAATACA	TGCGATTGTT	TCTCCAGATG
TxRC-11	GTCTTAAATG	GATAGCAGCA	GCAACTCTGG	TGCTAATACA	TGCGATTGTT	TCTCCAGATG
TfRC-11	GTCTTATTTG	GATAGCAGCA	GTAATTCTGG	TGCTAATACA	TGCGATTGTT	TCAGTGAGT-
TfRC-24	GTCTTATTTG	GATAGCAGCA	GTAATTCTGG	TGCTAATACA	TGCGATTGTT	TCAGTGAGT-

Cistrón-T.vag	TGAATTATGG	AGGAAAAGTT	GACCTCATCA	GAGGCACGCC	ATTCGACTGA	GTGACCTATC
TxRC-5	TGAATTATGG	AGGAAAAGTT	GACCTC-TCA	GAGGCACGCC	ATTCGACTGA	GTGACCTATC
TxRC-11	TGAATTATGG	AGGAAAAGTT	GACCTC-TCA	GAGGCACGCC	ATTCGACTGA	GTGACCTATC
TfRC-11	TGAGAAACAG	TGGAAAAGTT	GACCCT---C	CGGGCACACC	AATCGATTGA	GCGACCTATC
TfRC-24	TGAGAAACAG	TGGAAAAGTT	GACCCT---C	CGGGCACACC	AATCGATTGA	GCGACCTATC

Cistrón-T.vag	A-GCTTGTAC	TTAGGGTCTT	TACCTAGGTA	GGCTATCACG	GGTAACGGGC	GGTTACCGTC
TxRC-5	A-GCTAGTAC	TTAGGGTCTT	TACCTAGGTA	GGCTATCACG	GGTAACGGGC	GGTTACCGTC
TxRC-11	A-GCTAGTAC	TTAGGGTCTT	TACCTAGGTA	GGCTATCACG	GGTAACGGGC	GGTTACCGTC
TfRC-11	ATGCTAGTAC	TTAGGGTCTT	TACCTAGGTA	GGCTATCACG	GGTAACGGGC	GGTTACCGTC
TfRC-24	ATGCTAGTAC	TTAGGGTCTT	TACCTAGGTA	GGCTATCACG	GGTAACGGGC	GGTTACCGTC

Cistrón-T.vag	GGA-CTGCCG	GAGAAGGCGC	CTGAGAGATA	GCGACTATAT	CCACGGGTAG	CAGCAGGCGC
TxRC-5	GGA-CTGCCG	GAGAAG-CGC	CTGAGAGATA	GCGACTATAT	CCACGGGTAG	CAGCAGGCGC
TxRC-11	GGA-CTGCCG	GAGAAGGCGC	CTGAGAGATA	GCGACTATAT	CCACGGGTAG	CAGCAGGCGC
TfRC-11	GGA-CTGCCG	GAGAAGGCGC	CTGAGAGATA	GCGACTATAT	CCACGGGTAG	CAGCAGGCGC
TfRC-24	GGA-CTGCCG	GAGAAGGCGC	CTGAGAGATA	GCGACTATAT	CCACGGGTAG	CAGCAGGCGC

Cistrón-T.vag	GAAACTTTCC	CACTCGAGAC	TTTCGGAGGA	GGTAATG-AC	CAGTTCCATT	-GGTGCCTTT
TxRC-5	GAAACTTTCC	CACTCGAGAC	TTTCGGAGGA	GGTAATG-AC	CAGTTCCATC	-GATGCCATT
TxRC-11	GAAACTTTCC	CACTCGAGAC	TTTCGGAGGA	GGTAGTGGAC	CAGTTCCATC	CGATGCCATT
TfRC-11	GAAACTTACC	CACTCGAGAC	TTTCGGAGGT	GGTAATG-AC	CAGTTACATG	TCAACCTTTT
TfRC-24	GAAACTTACC	CACTCGAGAC	TTTCGGAGGT	GGTAATG-AC	CAGTTACATG	TCAACCTTTT

Cistrón-T.vag	TGGTACTGTG	GA--TAGGGG	TACGG--TTT	TCCACCGTAC	C-GAAACCTA	GCAGA--GGG
TxRC-5	CGGTATTGTG	GAATAGGGGG	TACCAGTTTT	TCCACTGTAC	C-GAAACCTA	GCAGAAGGGC
TxRC-11	CGGTATTGTG	GA-TAGGGGG	TACAG--TTT	TCCACTGTAC	CCGAAACCTA	GCAGAAGGGG
TfRC-11	TGGTTGTTTG	TA--TAGGAT	TGCAC-TTTT	-CCAGTGCAG	TGGAACCTA	GCAGA--AGG
TfRC-24	TGGTTGTTTG	TA--TAGGAT	TGCAC-TTTT	TCCAGTGCAG	TG-AAACCTA	GCAGA--GGG

Cistrón-T.vag	CCAGTCTGG-	TGCCAGC-AG	CT-GCGGTAA	TTCC-AGCT-	CTGC-GAGTT	TG--CTCCAT
TxRC-5	CCAGTCTGGG	GCCCAGCCAG	CTTGCGGTAA	TTCCAGCTT	CTGCCGAGTT	TGCTCCCAT
TxRC-11	CCAGTCTGGG	TGCCAGCAAG	CT-GCGGTAA	TTCC-AGCT-	CTGCCGAGTT	TGCTCCCAT
TfRC-11	CCAGTCTGG-	TGCCAGCCAG	CT-GCGGTTA	ATTCCAGCT-	CTGC-GAGTT	TGCTCCCAT
TfRC-24	CCAGTCTGG-	TGCCAGC-AG	CT-GCGGT-A	ATTCCAGCT-	CTGC-GAGTT	TGCTCCCAT



Cistrón-T.vag	A--TTGTTGC	-AGTTAAAA-	-CGCC--GTA	GTCTGAA--T	TGGCCAGC--	AATGGTC-GT
TxRC-5	AATTGGTTGC	-AGTTAAAA	-CGCCC-GTA	ATCTGAAATT	TGGCCAGC--	AATGGTC-GT
TxRC-11	A-TTGGTTGC	CAGTTAAAA	ACGCCCCGTA	GTCTGAAATT	GGGCCAGCCA	AAGGGTCCGT
TfRC-11	A-TTGGT-GC	-AGTT-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-24	A-TTGGTTGC	-AGTTAAAA-	-CGCTC-GTA	GTCCAGAACT	--GCCTGCAA	AGGCGTACGA

Cistrón-T.vag	ACG-TATTTT	TACGTTCACT	GTGAACAAAT	CAGGACGCTT	AGAGTATGGC	CACATGAATG
TxRC-5	ATG-TATTTA	TACGTTCACT	GTGAACAAAT	CAGGACGCTT	AGAGTATGGC	TACATGAATG
TxRC-11	ATGGTATTTA	AACCGTTCC-	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-24	ACA-TCTGTT	CGTTCACTGG	GGAAACAAAT	CAGGACCTTT	AGTGTATGGT	TTTAGGAATG

Cistrón-T.vag	ACTCAGCGCA
TxRC-5	ACTCAG----
TxRC-11	-----
TfRC-11	-----
TfRC-24	ACTTAA----



❖ Extremo 3' de la región región [16S+5.8S].

Cistrón-T.vag	-----	-----	-----ATCC	TGCCAAGGAA	GCACACTTAG	G--TCATAGA
TxRC-5	-----	-----	-----ATCC	TGCCAAGGAA	GCACACTAAG	G--TCATAGA
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	TTCGATTCAA	GGGCGAGAGT	AGGAGTTTCC	CACCGGATCA	GAGACCCGGG	TAGTTCCTAC
TfRC-24	-----	-----C	AAGAGAACCC	C---GGGGTA	GTTTCCTTAC	C--TTTAAAA

Cistrón-T.vag	TTAAGCCATG	CAAGTGTTAG	TTCAGG--TA	ACGAAACTGC	GAATAGCTCA	TTAATACGCT
TxRC-5	TTAAGCCATG	CAAGTGTTAG	TTCAGTGTTA	ACGAAACTGC	GAATAGCTCA	TTAATACGCT
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	TTAAACGATG	CCGACAGGGG	CTTGTC-TTT	TTATGAGGGC	AGGACCTT-A	GGAG--AAAT
TfRC-24	CAGAATGACC	GGACAAGGGG	CTTGTCCTTT	TTATGAGGGC	AGGACCTTTA	GGAGGAAAAAT

Cistrón-T.vag	CAGAACTCTAT	TTGGCGGCGA	CCAACAGGTC	TTAAATGGAT	AGCAGCAGCA	ACTCTGGTGC
TxRC-5	CAGAACTCTAT	TTGGCGGCGA	CCAACAGGTC	TTAAATGGAT	AGCAGCAGCA	ACTCTGGTGC
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	CATAGTTCTT	GGGGCTCTGG	GGAA---CT	ACGGACC-GC	AA-GGCTGAA	ACTT-GAAGG
TfRC-24	CATATTTCTT	GGGGCTCTGG	GGGGAAC-TT	ACGGACCCGC	AAAGGCTGAA	ACTTTGAAGG

Cistrón-T.vag	TAAT--ACAT	GCGATTGTTT	CTCCAGATGT	GAATTATGGA	GGAAAAGTTG	ACCTCATCAG
TxRC-5	TAAT--ACAT	GCGATTGTTT	CTCCAGATGT	GAATTATGGA	GGAAAAGTTG	ACCTC-TCAG
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	AATT-GACGG	--AAGGGCAC	-ACCCAGGGG	TG---GAGCT	TG-TGGCTTT	AA--TTTGAA
TfRC-24	AATTTGACGG	GAAAGGGCAC	CACCCAAGGG	GGTGGGAGCT	TGGTGGGCTT	AAATTTTGAA

Cistrón-T.vag	AGGCACGC-C	ATTCGACTGA	GTGACCTATC	AGCTTGTA CT	TAGGGTCTTT	ACCTAGGTAG
TxRC-5	AGGCACGC-C	ATTCGACTGA	GTGACCTATC	AGCTAGTACT	TAGGGTCTTT	ACCTAGGTAG
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	TCAA-CAC-G	GGGAAACTTA	CC---AGGAC	CAGATGTTTT	T-AATGACTG	ACAGGCTTCG
TfRC-24	TCAAACACCG	GGGAAACTTA	CCCAAGGAAC	CAGATGTTTT	TTAATGACTG	ACAGGCTTCG

Cistrón-T.vag	GCTATCACGG	G---TAACG	GGCGGTTACC	GTCGGACTGC	CGGAGAAAGT	GCCTGAGAGA
TxRC-5	GCTATCACGG	G---TAACG	GGCGGTTACC	GTCGGACTGC	CGGAGAAAG-C	GCCTGAGAGA
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	GGTCTTTTCA	G-ATATGACT	TTTGGTGGTG	CATGG-CCGT	T-GGTGG--T	GCGTGGGTTG
TfRC-24	GGTCTTTTCA	GGATATGACT	TTTGGTGGTG	CATGGGCCGT	TTGGTGGGTT	GCGTGGGTTG

Cistrón-T.vag	TAGCGACTAT	ATCCACGGGT	AG-CAGCAGG	CGCGAAACTT	TCCCACTCGA	GACTT-TCGG
TxRC-5	TAGCGACTAT	ATCCACGGGT	AG-CAGCAGG	CGCGAAACTT	TCCCACTCGA	GACTT-TCGG
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	A-CCTGTCAA	GCGTTGATTC	AGATAACGAG	CGAGATTATC	GCCAATTAAA	TACTCGTTTC
TfRC-24	AACCTGTCAA	GCGTTGATTC	AGATAACGAG	CGAGATTATC	GCCAATTAAA	TACTCGTTTC

Cistrón-T.vag	AGGAGGTAAT	GACC-AGTTC	CATTGGTGCC	TTTTGGTACT	GTGGAT--AG	GGGTAC--GG
TxRC-5	AGGAGGTAAT	GACC-AGTTC	CATCGATGCC	ATTCCGTATT	GTGGAATAGG	GGGTACCACT
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	TGTTTACAGA	GATAGAGTTC	TAATTGGGAC	TCCCTGCGTA	TCAAGCAGGA	GGAAGAGGGT
TfRC-24	TGTTTACAGA	GATAGAGTTC	TAATTGGGAC	TCCCTGCGTA	TCAAGCAGGA	GGAAGAGGGT

Cistrón-T.vag	TTTTCCACCG	TACCGAAACC	TAGCAGAGGG	-CCAGTCTG	GTGCCAG--C	AGCT-GCGGT
TxRC-5	TTTTCCACTG	TACCGAAACC	TAGCAGAGGG	GCCAGTCTG	GGGCCAGGCC	AGCTTGCGGT
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	AGCAATAACA	GGTCCGTGAT	GTCCTTTAGA	--TGCTCTG	GGCTGCA--	CGCGCGCTAC
TfRC-24	AGCAATAACA	GGTCCGTGAT	GTCCTTTAGA	--TGCTCTG	GGCTGCA--	CGCGCGCTAC



Cistrón-T.vag	AATTCC-AGC	T-CTGC-GAG	TTTGCTCCAT	ATT----GTT	GCAGTTAA	-CGCC-GTAG
TxRC-5	AATTCACG	TTCTGCCGAG	TTTGCTCCCC	ATAATGGTT	GCAGTTAA	ACGCCCCGTA
TxRC-11	-----	-----	-----	----TGCCT	ACTCTTAAT	ATTCCCCGTA
TfRC-11	AATGTTAGGA	TCAAAGAGA-	--TGCTGTCC	TGAAAAGGCT	ACAGCTA--	-CTCTCGCAA
TfRC-24	AATGTTAGGA	TCAAAGAGA-	--TGCTGTCC	TGAAAAGGCT	ACAGCTA--	-CTCTCGCAA

Cistrón-T.vag	TCTGAA--TT	GGCCAGCAAT	GGTCGTACGT	ATTTTACGT	TCACTGTGAA	CAAATCAGGA
TxRC-5	TCTGAAATTT	GGCCAGCAAT	GGTCGTATGT	ATTTATACGT	TCACTGTGAA	CAAATCAGGA
TxRC-11	CGTAG--TT	GG-----GAT	TGACGTTTGT	ATTACG----	CGTCATGAA	CCAG--GAAT
TfRC-11	TACCTAACGT	AGTTGG-GAT	TGAGGATTGT	AATCAT----	TCTCATGAA	CCAG--GAA
TfRC-24	TACCTAACGT	AGTTGG-GAT	TGAGGATTGT	AATCAT----	TCTCATGAA	CCAG--GAA

Cistrón-T.vag	CGCTTAGAGT	ATGGCCACAT	GAATGACTCA	GCGCAGTATG	AAGTCTTTGT	TTTCTTCCGA
TxRC-5	CGCTTAGAGT	ATGGCTACAT	GAATGACTCA	GCGCAGTATG	AAGTCTTTGT	TTTCTTCCGA
TxRC-11	CCCTTGGTAA	ATTG-TGTGT	CAACAACGCA	-CGTTGAAT-	ACGTCCCTGC	CCTTTTGGTA
TfRC-11	TCCCTTGTA	ATG--CGTGT	CAACAGCGCG	-CGTTGAAT-	ACGTCCCTGC	CCTTT--GTA
TfRC-24	TCCCTTGTA	ATG--CGTGT	CAACAGCGCG	-CGTTGAAT-	ACGTCCCTGC	CCTTT--GTA

Cistrón-T.vag	AAACAAGCTC	AATGAGAGCC	ATCGGGGGTA	GATCTATCTC	ATGACGAGTG	GTGGAAT-AC
TxRC-5	AAACAAGCTC	AATGAGAGCC	ATCGGGGGTA	GATCTATCTC	ATGACGAGTG	GTGGAAT-AC
TxRC-11	CACACCGCCC	GGTCGGCTCC	T-----	-ACCGATTGG	ATGACT--CG	GTGAAATCAC
TfRC-11	CACACCGCCC	GTC--GCTCC	T-----	-ACCGATTGG	ATGACT--CG	GTGAAAT--T
TfRC-24	CACACCGCCC	GTC--GCTCC	T-----	-ACCGATTGG	ATGACT--CG	GTGAAAT--T

Cistrón-T.vag	TTTGACTCAT	GAGAG-AGAA	GCTGAGGCGA	AGGCGTCTAC	CTAGAGG--G	TTTCTGTGCA
TxRC-5	TTTGACTCAT	GAGAG-AGAA	TCTGAGGCGA	AGGCGTCTAC	CTAGAGG--G	TTTCTGTGCA
TxRC-11	CCGATGCTT	ACGAGCAGAA	AGTGATTAAA	TCACGT-TAT	CTAGAGGAAG	GAGAAGTCGT
TfRC-11	ATCGGACCTT	GCGAG-GAAA	GGTAAT-AAA	TCACGT-ATC	T-----AGAG	AAGGAGT---
TfRC-24	ATCGGACCTT	GCGAG-GAAA	GGTAATTAAA	TCACGTATC	TTAGAGGAAG	GAGAAGTCGT

Cistrón-T.vag	TCAAGGGCGA	GAGTAGGAGT	ATCCAAC-AG	GATTAGAGAC	CCTGGTAGTT	CCTACCTTAA
TxRC-5	TCAAGGGCGA	GAGTAGGAGT	ATCCAAC-AG	GATTAGAGAC	CCTGGTAGTT	CCTACCTTAA
TxRC-11	AACAAGGTAA	CGGTAGGTGA	ACCTGCC-G-	--TTGGA--	-----TCAGT	TCTAGTTTAA
TfRC-11	-----	-----	GTCAAAC-AG	GCGCGGCGTT	GAATAACGTC	CC--TGCCCT
TfRC-24	AACAAGGTAA	CGGTAGGGTG	GTCAAACAG	GCGCGGCGTT	GAAATACGTT	CCCTTGCCCC

Cistrón-T.vag	ACGATGCCGA	CAGGAGTTTG	TCA-TTTGTT	AATGGCAGAA	TCTTTGGAGA	AATCATAGTT
TxRC-5	ACGATGCCGA	CAGGAGTTTG	TCA-CTTGTT	AGTGGCAGAA	TCTTTGGAGA	AATCATAGTT
TxRC-11	T---AATAA	TACCAACTTC	TT--TTTATT	AAT--CAAAA	AC--TAATCA	AATTATAAAT
TfRC-11	TTTGTACACA	CCCGGCCCGG	TCGGTTCCCT	ACCGAATTGG	GATGGACTTC	GGTGAAATTA
TfRC-24	TTTGTACACA	CACCGCCCCG	TCG-CTCCCT	ACCGATT--G	GATG-ACTCC	GGTGAAATTA

Cistrón-T.vag	CTTGGGCTCT	GGGGGAACCTA	CGACCGCAAG	GCTGAAACTT	GAAGGAATTG	ACGGAAGGGC
TxRC-5	CTTGGGCTCT	GGGGGAACCTA	CGACCGCAAG	GCTGAAACTT	GAAGGAATTG	ACGGAAGGGC
TxRC-11	----AACT--	-----AACTT	CATCA--AAA	ATCAAGTCTC	TAAGCAATGG	ATGTCTTGGC
TfRC-11	TCGGGACCTT	GCGAGGGAAA	GGTAATTAAA	T-CCACGTTT	TTCTAGAGGA	AGGAGAAGTC
TfRC-24	ATCGGACCTT	GCGAGG-AAA	GGTAATTAAA	TTCCACGTTA	TCTTAGAGGA	AGGAGAAGTC

Cistrón-T.vag	ACACCAGG--	GGTGGAGCCT	GTGGCTTAAT	TTG--AATCA	ACACGGGG-A	AACCTACCAG
TxRC-5	ACATCAGG--	GGTGGAGCCT	GTGGCTTAAT	TTG--AATCA	ACACGGGGGA	AACCTACCAG
TxRC-11	TCCTCACAC-	GATGAAGAAC	GTGGCATAAT	GTGTTAAGTA	GCCGGAGTTG	CATACATCAT
TfRC-11	GTAACAAGGT	AACGGTAGGT	GAACCTGCCG	TTG--GATCA	GTTTCGTTAA	TAATTAC---
TfRC-24	GTAACAAGGT	AACGGTAGGT	GAACCTGCCG	TTG--GATCA	GTTTCGTTAA	TAATTAC---



Cistrón-T.vag	GACCAGATGT	TTTTTATGAC	TGACAGGCTT	CGGGTCTTTC	AGGATATTGT	TTTTGGTGGT
TxRC-5	GACCAGATGT	TTTTTATGAC	TGACAGGCTT	TGGGTCTTTC	AGGATATTGC	TTTTGGTGGT
TxRC-11	GACAGGTTAA	TCTTTGAATG	CAAATTGCGC	TAAACTT---	-GGCTTCGGC	T---GAGAA
TfRC-11	AAACATATTT	TTTAAATGTC	TATAACTATT	TATACAAAAT	TAAACACATA	ATCTAAAAAA
TfRC-24	AAACATATTT	TTTAAATGTC	TATAACTATT	TATACAAAAT	TAAACACATA	ATCTAAAAAA

Cistrón-T.vag	GCATGGCCGT	TGGTGGTGCG	TGGG-TTGAC	CTGTC-TAGC	GTGATTCT--	AGCTAACGAG
TxRC-5	GCATGGCCCT	TGGTGGTGCG	TGGGGTTGAC	CTGTC-TAGC	GTGATTCT--	AGCTAACGAG
TxRC-11	GCATG-CGTG	TAACAGTACA	ACA---TAAT	TTATAATAAT	TCTTATTCTA	AGCGAATAAG
TfRC-11	TTTAGACCTT	AGGCAATGGA	TGTC-TTGGC	TTCTTACA-C	GATGAA----	GAACGTTGCA
TfRC-24	TTTAGACCTT	AGGCAATGGA	TGTC-TTGGC	TTCTTACA-C	GATGAA----	GAACGTTGCA

Cistrón-T.vag	CGAGATTATC	GCCAATTA--	TTTACTTTGC	CGAA-GTCCT	TCGGTTAAAG	TTCT-AATTG
TxRC-5	CGAGATTATC	GCCAATTTAT	TTTACTTCGT	CTAA-GTCCT	TAGATGCAAG	TTCTTAATTG
TxRC-11	TAAATAAATT	ATAAGACAAA	CTTACGTTGT	CTGCTATACG	CAGGAAGACC	CGCTGAACTG
TfRC-11	TAATGCGATA	AGCGGCTGGA	TTAGCTTTCT	TTGC----GA	CAAGTTCGAT	CTTTGAA-TG
TfRC-24	TAATGCGATA	AGCGGCTGGA	TTAGCTTTCT	TTGC----GA	CAAGTTCGAT	CTTTGAA-TG

Cistrón-T.vag	GGA-CTCCCT	GCGATTTTAT	CAGGTGGAAG	AGGGTAGCAA	TAACA-GGTC	CGTGATGCCC
TxRC-5	GGAACTCCCT	GCGATTTTAT	CAGGTGGAAG	AGGGTAGCAA	TAACA-GGTC	CGTGATGCCC
TxRC-11	AAG-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	CACATTGCGC	GCCGTTTTAT	CTTGCTAGAA	CACGCATATA	TGTTACAGTA	ACCCATATTA
TfRC-24	CACATTGCGC	GCCGTTTTAT	CTTGCTAGAA	CACGCATATA	TGTTACAGTA	ACCCATATTA

Cistrón-T.vag	TTTAGATGCT	CTGGGCTGCA	CGCGTGCTAC	AATGTTAGGA	TCAATAGGAC	TGCGAGCCTG
TxRC-5	TTTAGATGCT	CTGGGCTGCA	CGCGTGCTAC	AATGTTAGGA	TCAATAGGAC	TGCAAAGCCG
TxRC-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	ATTTAATACC	AAATTCTCTT	TTTAAGCAAA	AGAGCGGAAA	ACAAATATGT	ATTAA--CAA
TfRC-24	ATTTAATACC	AAATTCTCTT	TTTAAGCAAA	AGAGCGGAAA	ACAAATATGT	ATTAA--CAA

Cistrón-T.vag	AGAGGGTGCG	CTACTCTTAT	AATCCCTAAC	GTAGTTGGGA
TxRC-5	AGAGGCTGCG	CTACTCTTAT	AATCCCTAAC	GTAGTTGGGA
TxRC-11	-----	-----	-----	-----
TfRC-11	AAGGGTTCTG	TCTCATATAG	GAAGACCCGC	TGAACTGAAG
TfRC-24	AAGGGTTCTG	TCTCATATAG	GAAGACCCGC	TGAACTGAAG



❖ Extremo 5' de la región [intergénica+28S].

Cistrón-T.vag	AAGACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAA	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATTCCC
pTxRI-1	AAGACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAA	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATTCCC
TxRI-1	--AACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAG	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATTCCC
TfBRI-4	AAGACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAA	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATACTC
TfBRI-1	AAGACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAA	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATACTC
TfCRI-1	AAGACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAA	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATACTC
TfCRI-16	AAGACCCGCT	GAAGTGAAGC	ATCTCATTAA	GCGGAGGAAA	AGAAACTAAC	TAGGATACTC

Cistrón-T.vag	TTAGTAAAGG	CGATCGAAAA	GGGAACAGCC	CAACGTCTTA	ATCCCGCAAG	GGAAATGTAG
pTxRI-1	TGAGTAAAGG	CGATCGAAAA	GGGAAAAGCC	CAACGTCTTA	ATCCCGCAAG	GGAAATGTAG
TxRI-1	TGAGTAAAGG	CGATCGAAAA	GGGAAAAGCC	CAACGTCTTA	ATCCCGCAAG	GGAAATGTAG
TfBRI-4	ATAGTAAAGT	CGACCGAAGA	GAGTAGAGTT	CGTCGACCTA	ATCCCTC--G	GGAAATGTGG
TfBRI-11	TTAGTAAAGT	CGACCGAAGA	GAGTAGAGTT	CGTCGACCTA	ATCCCTC--G	GGAAATGTGG
TfCRI-1	TTAGTAAAGT	CGACCGAAGA	GAGTAGAGTT	CGTCGACCTA	ATCCCTC--G	GGAAATGTGG
TfCRI-16	TTAGTAAAGT	CGACCGAAGA	GAGTAGAGTT	CGTCGACCTA	ATCCCTC--G	GGAAATGTGG

Cistrón-T.vag	TCG-GTTCAC	CTATTGCACT	GGTCTAAGTC	AGATGGAATG	CTGCGCGATT	CAGAGTAAAA
pTxRI-1	TCT-GTTCAC	CTATTGCACT	GGTCTAAGTC	AGCTGGAATG	CTGTGCGATT	CAGAGTAAAA
TxRI-1	TCT-GTTCAC	CTATTGCACT	GGTCTAAGTC	AGCTGGAATG	CTGTGCGATT	CAGAGTAAAA
TfBRI-4	TTGAGAGGGC	TTTTTGCCCT	AGCGTAACTG	GAGTCGAATC	TCCGGCTATA	AAGAGTTTAA
TfBRI-11	TTGAGAGGGC	TTTTTGCCCT	AGCGTAACTG	GAGTCGAATC	TCCGGCTATA	AAGAGTTTAA
TfCRI-1	TTGAGAGGGC	TTTTTGCCCT	AGCGTAACTG	GAGTCGAATC	TCCGGCTATA	AAGAGTTTAA
TfCRI-16	TTGAGAGGGC	TTTTTGCCCT	AGCGTAACTG	GAGTCGAATC	TCCGGCTATA	AAGAGTTTAA

Cistrón-T.vag	GCCTCGTATG	ACCAACC	GC	AGCTTAC	GGACCGGGGA	GAGTCGGATA	CTTTGAGAGT
pTxRI-1	GCCTCGTATG	ACCAACC	GC	AGCTTAC	GGGCAGGGGA	GAGTCGGATA	CTTTGAGAGT
TxRI-1	GCCTCGTATG	ACCAACC	GC	AGCTTAC	GGGCAGGGGA	GAGTCGGATA	CTTTGAGAGT
TfBRI-4	GCCTCGTA--	GCTATGGGCA	AGCTA--GGT	CCTTGTA	GAGTCGGGCA	GCTTGAGAAT	
TfBRI-11	GCCTCGTA--	GCTATGGGCA	AGCTA--GGT	CCTTGTA	GAGTCGGGCA	GCTTGAGAAT	
TfCRI-1	GCCTCGTA--	GCTATGGGCA	AGCTA--GGT	CCTTGTA	GAGTCGGGCA	GCTTGAGAAT	
TfCRI-16	GCCTCGTA--	GCTATGGGCA	AGCTA--GGT	CCTTGTA	GAGTCGGGCA	GCTTGAGAAT	

Cistrón-T.vag	AGTGTCTTAA	GG-GGGTGGT	ATGTCCCATC	CAAGGCTAAA	TAAAGTGAGG	AGACCGATAG
pTxRI-1	AGTGTCTTAA	GG-GGGTGGT	ATGTCCCATC	CAAGGCTAAA	TAAAGTGAGG	AGACCGATAG
TxRI-1	AGTGTCTTAA	GG-GGGTGGT	ATGTCCCATC	CAAGGCTAAA	TAAAGTGAGG	AGACCGATAG
TfBRI-4	GCTGCCTCAA	GATGGGTGGT	ACGCCCCATC	CAAACTAAA	TACTGTAAGA	AGACCAATAG
TfBRI-11	GCTGCCTCAA	GATGGGTGGT	ACGCCCCATC	CAAACTAAA	TACTGTAAGA	AGACCGATAG
TfCRI-1	GCTGCCTCAA	GATGGGTGGT	ACGCCCCATC	CAAACTAAA	TACTGTAAGA	AGACCGATAG
TfCRI-16	GCTGCCTCAA	GATGGGTGGT	ACGCCCCATC	CAAACTAAA	TACTGTAAGA	AGACCGATAG

Cistrón-T.vag	ATTACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACAGAGGGTG	AAAA-GTTCC
pTxRI-1	ATTACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACAGAGGGTG	AAAA-GTTCC
TxRI-1	ATTACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACAGAGGGTG	AAAA-GTTCC
TfBRI-4	AGCACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACGAGAGAGC	AAAA-GCGCC
TfBRI-11	AGCACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACGAGAGAGC	AAAA-GCGCC
TfCRI-1	AGCACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACGAGAGAGC	AAAA-GCGCC
TfCRI-16	AGCACAAGTA	GTGTGAACGA	AAGATGAAAA	GAAGTCTAAA	ACGAGAGAGC	ATGATACATA

Cistrón-T.vag	TGAAGTTGCT	TAGGGTTAAG	GCT--ATTTA	TAGTA-CCCG	TCTTGAAAC-	ACGGATTAGG
pTxRI-1	TGAAGTTGCT	TAGGGTTAAG	GGG--ATTTA	TCCTA-CCCG	TCTTGAAACC	ACGGATTAGG
TxRI-1	TGAAGTTGCT	TAGGGTTAAG	GGG--ATTTA	T-----CCTG	CCAAGGAAGC	ACAC-----
TfBRI-4	TGAAGTTGTC	TAGGGTTAAG	TATTTATCTA	ATACA-CCCG	TCTTGAAAC-	ACGGATTAGG
TfBRI-11	TGAAGTTGTC	TAGGGTTAAG	TATTTATCTA	ATACA-CCCG	TCTTGAAAC-	ACGGATTAGG
TfCRI-1	TGAAGTTGTC	TAGGGTTAAG	CGTCACTTTA	C-----CCA	TACAGTGGCA	ATAAGATAAA
TfCRI-16	TGGAATATT	ATGAATACAA	TATTAATAAA	TAGCAAAATA	TATCAAAAGTA	ATATA-TACA



Cistrón-T.vag	GAGTTTATCT	---GTAGTGC	G-AGTCTTTG	CAC-GTTAAC	TGTAAA-GGC	GTAGAGAAAG
pTxRI-1	GAGTTTATCT	T--GTAGTGC	GGAGTCTTTG	CACCGTTAAC	TGTAAAAGGC	GTAAAAGAAA
TxRI-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfBRI-4	GAGTTTAACT	---GTAGTAC	G-AGTCTTTG	CCTTATAAAG	-GTGAA-GGC	GAAAGGAGAC
TfBRI-11	GAGTTTAACT	---GTAGTAC	G-AGTCTTTG	CCTTATAAAG	-GTGAAAGGC	GAAAGGAGAC
TfCRI-1	ACCTAGAGGG	A--ATTAAAA	ATACTCTTAA	TTT-ATTATA	TTTGAATACT	TGGTTGATCC
TfCRI-16	TCGTAAAAGT	GCCATAAAAT	GTTGCTCCAT	CCATAATAAA	TATTTTTTTC	GAGATGAAAC

Cistrón-T.vag	---CAACTGG	-CGTTTGCAT	-GGCTACTGA	G--CATTACT	G-ATAGGA--	CCCGAAAGGT
pTxRI-1	AGCCAAGTGG	GCATCAGCAT	TGGCTATTGG	AGCCATTACT	GGATAGGGAC	CCCGAAAGGT
TxRI-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfBRI-4	---TGACTGG	-CATCTGCAT	GGAGT-CTGA	G--TACTACT	GTT---AG--	TTTGATACTT
TfBRI-11	---TGACTGG	-CATCTGCAT	GGAGT-CTGA	G--TACTACT	GGTAGAA--	CCCGAATGGA
TfCRI-1	CTGCCAAGGG	-AAAGCACAC	AAAGGGCCGA	A---ATTCCC	AGCCACCAAC	TTGGCCGGCC
TfCRI-16	ATGTCGAAAA	-CATCCATAT	ATGAAGAAGA	GTCTGGAAGG	AACAGTAGTA	GTAATAACT

Cistrón-T.vag	GGTGAA--CT	TTGCCTGCAC	A---GGTTGA	AGTCAGGGG-	-AAACTCT-G	ATGGA-GGAC
pTxRI-1	GGTGAAACTT	TTGCCTGCCC	A---AGTTGA	AGTCAGGGGG	AAACTCTTG	ATGGAAGGAC
TxRI-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfBRI-4	GGTTGA--TC	CTGCCAAGGA	A---GCACAC	AATCACTAGT	GGAATTCG-C	GGCCGCCTGC
TfBRI-11	GGTGAA--CT	ATGCCTGCAC	A---GATCCG	AAGTCAGAAG	GAAACTCT-G	ATGGAGGAAT
TfCRI-1	CGTTTA--CC	TAGTGGAAT	T--CCGAAG	CTCCGGTACC	CAAGCTTTGG	ATGCCATAGC
TfCRI-16	ATTTAGTTCT	GGGATTGATC	ATATACCATA	AAAAGGGGAG	GAATCCCTAG	GTTATGATCC

Cistrón-T.vag	CGTACGGGTT	-ATTGATGTG	CAAATCATTT	TTCTGATGTA	GGTAAAGGTG	CGAAAGACTC
pTxRI-1	CGTACGGGTT	TATTG----	-----	-----	-----	-----
TxRI-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TfBRI-4	AGTCGACCA	TATGGGAGAG	CTC-CCACGC	GTTGGGATGC	CATAGCTTTG	AGTATTCTAT
TfBRI-11	CGTTGGGCGT	TATTGATGTG	CAAATCATTT	GCTAAGATG-	--TGGGTATA	GGTGC-----
TfCRI-1	TTTGGAGTAT	TTCTAT----	-----	-----	-----	-----
TfCRI-16	CGCTTGTGAA	TAGTGGGCC	CAGTTGTTAG	AGTTTGAGTA	CATCACTTTA	GTAATAGATC

Cistrón-T.vag	ATCGAACCAC	CTAATAGCTG	GTTTCCTCCG
pTxRI-1	-----	-----	-----
TxRI-1	-----	-----	-----
TfBRI-4	AG-----	-----	-----
TfBRI-11	-----	-----	-----
TfCRI-1	-----	-----	-----
TfCRI-16	CTTCTTTTTA	AAGCCTACTT	GGACC-----



❖ Extremo 3' de la región [intergénica+28S].

Cistrón-T.vag TAGCGATTAT CCAGGCTTGT ATCCTGGGGG CTGAT---GA GGAGTAGGG- ---TTTCTGG
TfBRI-11 ----- --CTGGGGGG CTGATTGAAG GAAGTAAGGG GTTTTCTTGG

Cistrón-T.vag AC--AACTTA AA--CAGATC C-AGAGTTA- GTCGA--TCC TAATCTCAAT AAT--GGGAG
TfBRI-11 GCCAAACTTA AAACCAGTCC CCAGAGTTAA GTCGGGTTC TTAATCCGAT TATTTGGGAG

Cistrón-T.vag AAAGGGAG-- TACAGTTGAT A--TTCTGTA ACTGACAACA GTTCGCGGCA ACGCAT--AC
TfBRI-11 AAAGGGGAAC TTCGGTTGAC CATTTCGAG ACTAATGCTA TCATGTGGCA ACAACTTGGT

Cistrón-T.vag TATTTTCTC CGCCAATCTT -ATAC-CGTT GGTAGGGATC TCTTTCCTAC ATGACAGTAC
TfBRI-11 AATCTTTATC CGTCAATTCT GATACTCGGT GGTAGGGATC TCTTTCCTAT ATGACTCGGT

Cistrón-T.vag TAATACCCAG GGAAACTGGT CATCAGGCGA ACTGCGGCGT TCTGCTGGCA AAACATAGCT
TfBRI-11 ATGCGTCCTA GGAATCAGGT CAACTGGGGA ATAGCGATGT ATTTGAGGCA AACTGCAAA

Cistrón-T.vag TCGGTTATGT CAATGGCTAT TGGATTGGTC CATGAAGCGA AAAATAGTTT ACTGTGTCAC
TfBRI-11 TCGTTTGCAG CCTGGGCTAT TGGATTGATC CTTGAAGAGA GGATTACTTA GATAGTATAC

Cistrón-T.vag TCGTACCGAT AACCGCATCA GGTCTTCTAG GTAAGTAGCC TATGGCCATT GAGGCATGAT
TfBRI-11 CCGTACCGAT GACCGCATCA GGTCTCCTAG GTGAGAAGCC TATGGCCATT GAGGTGTGGT

Cistrón-T.vag AGTTCAGGGA ATTCGGCCAA TTAGAGCTGT AACTTCGGGA TAAAGCTTGG CTCTGATGAA
TfBRI-11 AGTTCAGGGA ATTCGGCCAA TTGGAGCTGT AACTTCGGGA TAAAGCTTGG CTCTGATGGA

Cistrón-T.vag AATCAGAACC GATTGTTACG CGGAGAGCCC AACTGTTTAA TAAAAACGTA GTGTCGCGCT
TfBRI-11 AATCAGAACC GATAGTTACA AGGAGAGCCC AACTGTTTAA TAAAAACTTA GTCTTGCGCT

Cistrón-T.vag GTGGTAGTAT AGCCAGTGAA CGCGACATGA ATCCTGCTCA GTGCTGTGTC TGTTAATATG
TfBRI-11 GTGCTCTTAT AGGCAGTGAA CGCAAGATGA ATCCTGCTCA AGGAAGCACA C-----