



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO QUE CODIFICA
PARA UNA PROTEÍNA DE UNIÓN A CAJA TATA (PUT) EN LOS GENES
DE *Taenia solium*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

OSCAR RODRÍGUEZ LIMA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Marisol López López

VOCAL: Profesor: Luz del Carmen Castellanos Román

SECRETARIO: Profesor: Abraham Landa Piedra

1er. SUPLENTE: Profesor: María Benita Leonor Fernández Salgado

2° SUPLENTE: Profesor: José Cordero Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGÍA

MOLECULAR DE *TAENIA SOLIUM*, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: ABRAHAM LANDA PIEDRA

SUSTENTANTE (S): OSCAR RODRÍGUEZ LIMA

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

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 80134 que corresponde al proyecto “Desarrollo de fármacos biológicos contra la *Taenia solium*” y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN207507 “Anticuerpos recombinantes: Herramientas para identificar antígenos de membrana y como inhibidores de enzimas esenciales en *Taenia solium*”.

A Violeta, Liborio y Rocío...

Agradecimientos.

A mis padres por ser por ser el motor que me impulso durante todos estos años, y por brindarme su apoyo cuando más lo necesite... a ustedes les debo todo...

A mis hermanos por su apoyo para que yo estuviera aquí, por aguantar las inclemencias que provocó mi estancia lejos de casa, por los buenos momentos en vacaciones, pero sobre todo... por ser mis mejores amigos...

A mi tía Rocío por ser mi segunda mamá...

Al Dr. Abraham Landa por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas y consejos. Por que además de ser un buen tutor, es un buen amigo.

A todo el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*; a la M. en C. Alicia Ochoa y a la Dra. Lucía Jiménez por enseñarme las técnicas y procedimientos que utilicé para el desarrollo de este trabajo. A los ya casi Drs. en C.: Anayetzin, Felipe, Ponciano, Ricardo y Víctor, de una u otra forma aprendí algo de ustedes, todos mis respetos. A los ya casi QFB's, Biólogos y Biomédicos: Aramís, Daniel, Omar, Sergio y Viridiana, por que con ustedes conocí el complejo mundo de la Biología Molecular, pero sobre todo por los momentos de diversión que pasamos juntos.

A mis amigos de la Facultad de Química: David, Fabiola, Goretti, José, Mariana, Mercedes, Ricardo, Roberto, Rocío, Rodolfo, Sara. Por que juntos sobrevivimos el tortuoso camino para convertirnos en Químicos, por los buenos y malos momentos y por ser como mi familia durante mi estancia en el DF.

A mis amigos de Tlaxcala por su apoyo incondicional y sus buenos deseos, especialmente a Zam por estos 11 años de amistad.

A Vera, por escucharme y estar conmigo siempre que lo necesite, por ser mi mejor amiga, por ser "tan genial" (aprendiste del mejor), en fin... por todo...

A todos los que creyeron en mí, su apoyo fue fundamental; pero aun más a los que nunca creyeron en mí, eso me hizo más fuerte...

ÍNDICE GENERAL.

Abreviaturas	7
I. Resumen	8
II. Introducción	9
2.1 Taeniosis / Cisticercosis	9
2.1.1 <i>Taenia solium</i>	11
2.1.2 Ciclo de vida	13
2.1.3 Epidemiología	14
2.1.4 Diagnóstico	15
2.1.5 Tratamiento	16
2.2 El proceso de la transcripción	18
2.2.1 Las ARN polimerasas y la transcripción	18
2.2.2 El inicio de la transcripción	19
2.2.3 Proteína de unión a caja TATA (PUT)	20
2.2.4 Estructura	20
2.2.5 Reconocimiento del sitio de unión de la PUT al ADN	21
III. Hipótesis	24
IV. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
V. Material y métodos	26
5.1 Material biológico	26
5.2 Reactivos	26
5.3 Preparación del extracto crudo	27
5.4 Inmunoelectrotransferencia	27
5.5 Obtención de la sonda	28
5.6 Marcaje radioactivo	29
5.7 Tamizaje para el aislamiento de clonas	29
5.8 Purificación de ADN a partir de fagos	30
5.9 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)	31
5.10 Ligación y transformación bacteriana	32
5.11 Preparación grande de ADN plasmídico	32
5.12 Secuenciación	33
VI. Resultados	35
VII. Discusión de resultados	41
VIII. Conclusiones	44
IX. Anexo	45
X. Referencias	47

Abreviaturas.

2X	Dos veces la concentración
5X	Cinco veces la concentración
°C	Grados Celsius
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	Polimerasa de ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNsn	Ácido ribonucleico nuclear pequeño
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
hr	Horas
kDa	Kilo Daltones
min	Minutos
NC	Neurocisticercosis
N-terminal	Extremo amino terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PIC	Complejo de pre-iniciación de la transcripción
PUT	Proteína de unión a caja TATA
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
T/C	Taeniosis/Cisticercosis
TAF's	Factores asociados a PUT
TF	Factores de transcripción
V	Voltios

I. Resumen.

La taeniosis y la cisticercosis son enfermedades causada por el parásito *Taenia solium*. Estas dos afecciones son un gran problema de salud pública en países en vías de desarrollo como México. La falta de una infraestructura sanitaria y el mal manejo de los animales de consumo humano como el cerdo hacen que estos padecimientos prevalezcan y no puedan ser erradicados.

Las investigaciones recientes realizadas por varios grupos de investigación buscan una solución a estas enfermedades, sobre todo intentando intervenir en el ciclo de vida del parásito. Se han realizado avances importantes, sin embargo la enfermedad aun persiste. Una propuesta para desarrollar estrategias nuevas es estudiar el mecanismo de transcripción del parásito, con la meta de descubrir blancos que nos permitan eliminar a este organismo.

La transcripción es el proceso por el cual la RNA polimerasa junto con varias proteínas o factores de transcripción sintetiza los diferentes ARNs de la célula. Una de éstas, es la proteína de unión a la caja TATA (PUT, o "TBP" por sus siglas en inglés). La PUT inicia la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC), complejo crucial para el reclutamiento de otros factores de transcripción, que permiten el posicionamiento de la RNA polimerasa y el inicio de la transcripción.

En este trabajo se realizó la identificación de la presencia de la PUT en los genes de *Taenia solium* y después la clonación y caracterización del ADN complementario que la codifica. Se encontró un ADNc de 816 pb que codifica para una proteína de 217 aa con un peso molecular teórico de 30.1 kDa. Se identificaron todos los sitios esenciales de unión a ADN y los dos extremos característicos. Mediante un alineamiento múltiple se encontró un alto porcentaje de identidad con respecto a otras PUT's.

II. Introducción.

2.1 Taeniosis / Cisticercosis.

El origen de la taeniosis/cisticercosis (T/C) en los humanos se remonta a miles de años, muy probablemente en África, en donde el hombre primitivo, comía los desperdicios de otros carnívoros. Este tipo de alimentación y la aparición del canibalismo, hicieron que esta enfermedad se estableciera en humanos. La T/C como la conocemos hoy en día en el hombre, es debido a los deficientes métodos de crianza de los hospederos intermediarios (cerdo/res) y a la falta de educación e higiene (Larralde C. y De Aluja A., 2008).

La T/C son infecciones producidas por los helmintos de la familia *Taeniidae*. Existen dos especies que causan la taeniosis en los humanos: la *Taenia solium* y la *Taenia saginata*. El hombre es el único hospedero definitivo para ambas tenias (Sarti E., 1997). Por otro lado, el agente causal de la cisticercosis humana y porcina, es el metacéstodo o cisticerco (forma larvaria) de *T. solium*. El humano adquiere la enfermedad por la ingesta de huevos que produce el adulto de este parásito. El adulto vive en el intestino delgado del hombre y produce huevos que son liberados en la materia fecal, y por malas prácticas higiénicas pueden contaminar alimentos y agua potable. Asimismo, un portador del parásito adulto puede auto infectarse y adquirir la cisticercosis por el sistema conocido como ano-mano-boca o infectar a la gente que convive con él (García H. et al., 2003).

La neurocisticercosis (NC) que es la forma más grave de esta enfermedad. Es causada por el alojamiento de cisticercos en el Sistema Nervioso Central (SNC). La infección puede desde no causar síntomas hasta la muerte del paciente, estos son muy variables e incluye mareos, dolores de cabeza e hidrocefalia, y dependen del número, localización y viabilidad de los cisticercos (Hancock K., et al., 2003). Varios estudios han mostrado que en países donde es endémica esta enfermedad, del 18 al 50% de los casos presentan ataques de epilepsia (Medina

M., et al., 1990), siendo éste uno de los principales síntomas por los cuales se llega al diagnóstico de la NC. Se estima que en América Latina existe alrededor de 400 000 casos de NC asintomática y mucha más gente con riesgo de ser infectada (Bern C., et al., 1999).

Por otro lado, debido a que la taeniosis por lo general sigue un curso benigno, y a la falta de métodos diagnósticos eficientes, hace que la detección de esta enfermedad sea muy baja.

La T/C en México causada por *T. solium* es de gran importancia, debido a la alta prevalencia de estos padecimientos, no sólo en zonas rurales, si no, en todos aquellos lugares donde la higiene en los alimentos no es la adecuada, las condiciones sanitarias son pobres y donde la crianza de cerdos es de traspatio.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) no considera a la cisticercosis como una de las principales enfermedades epidemiológicas causantes de muerte en el mundo (OMS, 2009). Sin embargo, la neurocisticercosis es una enfermedad que incapacita al individuo, por lo que se invierte una gran cantidad de dinero en estos pacientes (Flisser A., 1988). La T/C no sólo es prevalente en México sino también en países pobres de África, Asia y América Latina, especialmente en áreas urbanas y rurales que carecen de infraestructura sanitaria (Meza y Aguilar, 2002).

Los grupos dedicados al estudio de este parásito han tratado de encontrar formas para eliminarlo, y a pesar de que se han realizado avances significativos como una vacuna y existen antihelmínticos eficaces, aun no se ha encontrado un método eficaz para su eliminación.

2.1.1 *Taenia solium*.

Carlos Linneo clasificó e incluyó a la *T. solium* en la décima edición de su *Systema Naturae* en 1758. Actualmente este organismo se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Animalia
Filo: Platyhelminthes
Clase: Cestoda
Orden: Cyclophyllidea
Familia: Taeniidae
Género: *Taenia*
Especie: *T. solium*

Este parásito también es conocido como “solitaria”, y en su forma adulta presenta un cuerpo largo, aplanado, segmentado de color blanquecino. Generalmente supera los dos metros de largo y se han reportado casos donde llega a medir hasta 8 metros (Herrera L., et al., 1999). Se aloja en el intestino delgado del hombre, fijándose través del rostelo compuesto por una doble corona de ganchos y ventosas contenidos en su escólex (Figura 1) que tiene el tamaño de un alfiler.

El cuerpo del gusano adulto, llamado estróbilo, está recubierto por el tegumento o epitelio, que le permite absorber los nutrientes del medio en el que habita. El estróbilo está compuesto de segmentos o proglótidos que parten del cuello unido al escólex. Los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, es decir, no han desarrollado los órganos sexuales. Los proglótidos maduros se encuentran en la parte media del estróbilo y presentan sus órganos sexuales diferenciados. Cada proglótido maduro posee genitales masculinos y femeninos, debido a que este parásito es hermafrodita, haciendo de cada uno de estos segmentos una

verdadera unidad de reproducción (Flisser A., et al., 2006a). Los segmentos mas alejados del estróbilo se conocen como proglótidos grávidos, los cuales presentan ramas uterinas llenas de huevos; generalmente estos proglótidos se desprenden del estróbilo y son liberados en las heces. Aproximadamente cada proglótido grávido contiene alrededor de 50,000 huevos los cuales son evacuados en las heces (Flisser A., et al., 2006b).

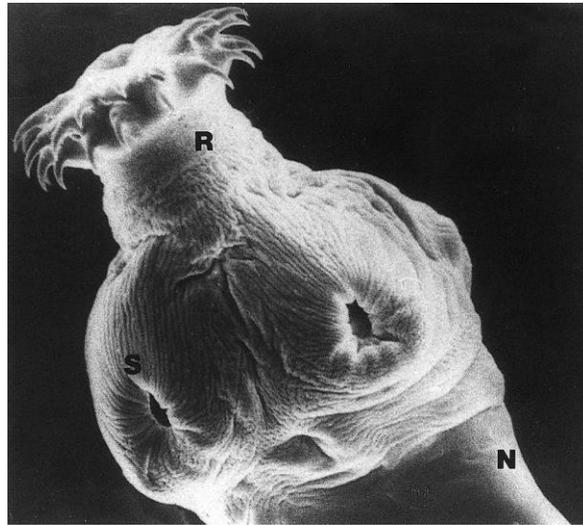


Figura 1. Micrografía electrónica del escólex del parásito adulto de *Taenia solium*, en el cual se puede observar el rostellum (R), con su doble corona de ganchos; ventosas (S) y el cuello (N) (Tomada de Sciutto E., et al., 2000).

Los huevos (Figura 2A) son esféricos y presentan una apariencia radial (al microscopio óptico), en su interior contienen una oncosfera o embrión con seis ganchos (hexacanto); la capa principal que protege a la oncosfera es el embrióforo. Este último está constituido por bloques de una proteína similar a la queratina, la que es muy resistente e impermeable, la cual hace posible soportar el medio inclemente presente en el estómago. Los bloques proteicos están unidos por una sustancia sensible a la digestión enzimática por los jugos gástricos y a la acción de las sales biliares del intestino lo que permite la liberación de la oncosfera.

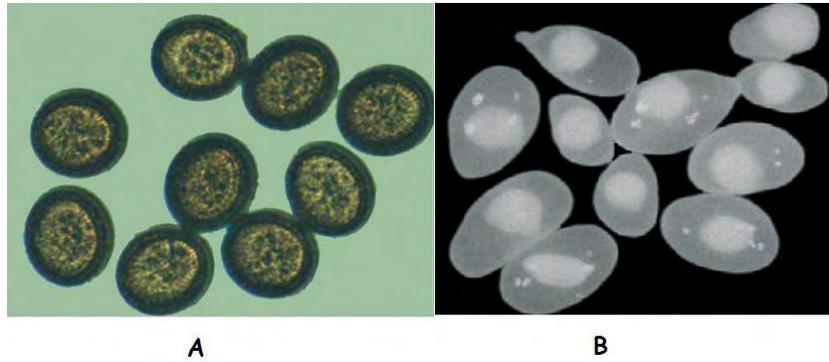


Figura 2. Fotografía tomada a través de microscopio óptico de: (A) huevos y (B) cisticercos de *T. solium* (Tomada de Flisser A., et al., 2006a).

El cisticerco (Figura 2B) es una vesícula ovalada y translúcida, de 0.5 a 2 centímetros de diámetro, dotada de un pequeño escólex en su interior, que al igual que en el parásito adulto posee una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. También está dotada de un tegumento que permite la absorción de los nutrientes del hospedero necesarios para su desarrollo.

2.1.2 Ciclo de vida.

La *Taenia* adulta (Figura 3) habita en el intestino delgado del humano en donde constantemente produce huevos que se expulsan en la materia fecal. El cerdo se infecta al ingerir estas heces. Cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco ocasionando la cisticercosis porcina. Una vez que los huevos se encuentran en el tracto digestivo del cerdo, las enzimas proteolíticas y las sales biliares producen la activación del embrión hexacanto. El embrión activado penetra la pared intestinal del hospedero intermediario, alcanzando los capilares sanguíneos y linfáticos que lo distribuyen a varios órganos y tejidos. Se requieren al menos 10 semanas para que éste se pueda convertir en cisticerco y ser capaz de vivir por varios años en el hospedero (Villalobos-Perozo R., 2003).

El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo insuficientemente cocida infectada con cisticercos, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares participan en la activación y evaginación del cisticerco, el cual con su

escólex se fija a la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece, madura y se diferencia hasta convertirse en un gusano adulto. La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto, puede ocasionar la ingestión de huevos, produciendo cisticercosis en los humanos y cerdos (Willms K., et al., 2008).

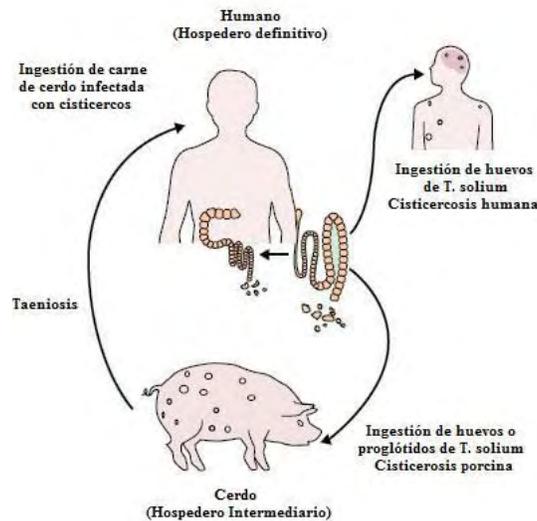


Figura 3. Ciclo de vida de *T. solium*. El humano es el hospedero definitivo que adquiere la taeniosis por ingestión de cisticercos presentes en la carne de cerdo, se desarrollo al adulto en el intestino delgado, produce huevos que causan la cisticercosis porcina (hospedero intermediario) o cisticercosis humana (hospedero accidental) (Tomada de García H., et al., 2003).

2.1.2 Epidemiología.

La cisticercosis es una enfermedad endémica en América Latina, África y Asia, donde la NC es la infección parasitaria del SNC más común (Sloan L., et al., 1995). En años recientes se ha observado un incremento en los casos de NC en países de primer mundo, debido al aumento en la cantidad de migrantes hacia éstos (Kaminsky R., 1991).

La NC humana en México fue por primera vez reportada en 1901, por el Dr. Ignacio Gómez Izquierdo (Flisser A. y Gyorkos T., 2007), quien describió el caso de un paciente proveniente de Cuba que murió en un hospital psiquiátrico con un

diagnóstico de alcoholismo o tuberculosis. Los análisis de autopsia realizados al cuerpo del paciente revelaron la presencia de un cisticerco en el cerebro.

En México, por medio de estudios hospitalarios se reporta una tasa de hasta 8.6 por 100 hospitalizados, y en las necropsias se han encontrado hasta 2453 por cada 100 000 habitantes, se señala que el 43.3% de los casos eran asintomáticos y el 80% fue un hallazgo de necropsia (Sarti E., 1992). Las estadísticas oficiales muestran un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100 000 habitantes (Correa M., et al., 1994). Desde el año de 1990 hasta el año 2005 la disminución de la incidencia de taeniosis ha sido considerable, ya que en 1990 se tenía un reporte nacional de 14013 casos de taeniosis y 586 casos de cisticercosis, y en el 2005 fue de 393 casos de taeniosis y 306 de cisticercosis (SSA, México 2007).

Uno de los estudios de epidemiología basado en serología realizado en la República Mexicana (Larralde C., et al., 1992) mostró que la prevalencia de la cisticercosis va desde un 0.06% hasta un 2.97%, con un promedio nacional de 1.2%. Asimismo se encontró que hay una mayor prevalencia en zonas rurales con respecto a las zonas urbanas; y el porcentaje incrementa de acuerdo al nivel socioeconómico (clase baja > clase media > clase alta).

2.1.4 Diagnóstico.

Clásicamente la taeniosis ha sido detectada por exámenes coproparasitológicos. Estos métodos de detección son muy inespecíficos y se basan en la observación microscópica de huevos o proglótidos (Wilkins P., et al., 1999). El examen directo de huevos es inútil y se requieren exámenes de tinción de proglótidos, para poder observar el número de ramas uterinas; en donde *Taenia solium* posee de 7 a 13 ramas laterales y *Taenia saginata* presenta de 15 a 20. Recientemente se han desarrollado ensayos de detección de coproantígenos, los cuales han incrementado la sensibilidad en la detección de casos de taeniosis. Este tipo de

ensayos utilizan sueros hiperinmunes de conejo en contra de extractos de adultos, acoplados a un ensayo ELISA; aquí se detectan antígenos del parásito, presentes en las heces. Estas pruebas han demostrado tener un 99% de sensibilidad y 99% de especificidad para *Taenia sp.* Una de las desventajas es que este ensayo es incapaz de distinguir entre *Taenia solium* y *Taenia saginata* (Allan J., et al., 2003).

El diagnóstico de la cisticercosis se basa en los hallazgos clínicos, epidemiológicos y/o serológicos. Los estudios de resonancia magnética y las tomografías axiales computarizadas son las herramientas más sensibles y específicas (Sloan L., et al., 1995), pero no son muy utilizadas, debido a su alto costo. Actualmente el único método funcional para el diagnóstico de cisticercosis en un laboratorio, es la detección serológica de anticuerpos en contra del cisticerco, en especial la inmunoelectrotransferencia que utiliza como antígenos las glicoproteínas descritas por Tsang (Tsang V., et al., 1989; Hancock K., et al., 2004).

2.1.5 Tratamiento.

El medicamento de elección hasta hace varios años para la taeniosis era la niclosamida que actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero. No tiene acción contra los huevos ni los cisticercos. Su uso trajo gran polémica, debido a que se pone en riesgo al paciente de contraer cisticercosis, pues destruye a los proglótidos y libera a los huevos dentro de la luz intestinal. Estas razones, aunadas al costo del medicamento, hicieron que éste quedara en desuso (Herrera L., et al., 1999).

El prazicuantel es la segunda droga de elección. Es especialmente efectivo contra las formas larvianas de céstodos pero también contra el parásito adulto de la *Taenia solium*. Su mecanismo de acción es que lesiona y hace permeable el

tegumento del parásito adulto y de la larva debido a que interfiere con los canales de calcio (Pearson R. y Guerrant R., 1983; King C. y Mahmoud A., 1989).

El albendazol es la tercera droga de elección, sobre todo en los menores de cinco años de edad. Tiene la ventaja de que no sólo actúa contra las larvas y adultos de la *Taenia solium*, si no también contra la mayoría de helmintos y nemátodos (Sarti E., 1997). El mecanismo de acción de este medicamento es como el de todos los bencimidazoles, modifica el metabolismo de los carbohidratos, mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa (Prichard R., 1973), e impide la captación de glucosa causando la disminución de las reservas de glucógeno (Lacey E., 1988). Asimismo, inhibe la secreción de acetil colinesterasa y la polimerización de los microtúbulos.

2.2 El proceso de la Transcripción.

La transcripción es el proceso por el cual se sintetizan las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) utilizando como molde una de las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN). El resultado es la producción de una molécula de ARN que formará moléculas de ARN de transferencia, o ARN estructurales como los de los ribosomas o que traducen a proteínas (Klug S., et al., 2006). El proceso de transcripción representa el paso inicial del flujo de información dentro de la célula.

2.2.1 Las ARN polimerasas (pol) y la transcripción.

Para el proceso de la transcripción los genes eucarióticos utilizan tres ARN polimerasa (pol). La ARNpol I que transcribe los genes para el ARN ribosómico (ARNr); la de tipo II que transcribe los genes de mantenimiento produciendo RNA mensajeros (ARNm) y los genes para RNA nucleares pequeños (ARNsn); la de tipo III que transcribe los genes para los ARN de transferencia (ARNt), el ARNr 5S y otros ARNsn (Hernandez N., 1993).

La actividad de la ARNpol II es regulada por elementos del propio gen que actúan en *cis* y por algunos factores que actúan en *trans*. Un ejemplo de elemento en *cis* es la caja TATA que se encuentra presente en la mayoría de los genes eucarióticos y que presenta la secuencia consenso TATAAAAG. (Chalkley G. y Verrijzer P., 1999; Juo Z., et al., 1996).

La caja TATA es el sitio donde la ARNpol II se une al ADN típicamente, la transcripción inicia aproximadamente a 25 – 30 pares de bases, corriente debajo de ella. De hecho, la localización de la caja TATA determina la posición nucleotídica exacta en la que empieza la transcripción. Esta posición se denomina sitio de inicio de la transcripción (Müller F., et al., 2001).

2.2.2 El inicio de la transcripción.

Una serie de proteínas conocidas como factores de transcripción (TF) actúan sobre el ADN para controlar el inicio de la transcripción. Estas moléculas no forman parte de la ARNpol II, pero se ensamblan en un orden específico formando el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC), que proporciona el andamio para que la ARNpol II reconozca el sitio exacto de unión (Hochheimer A. y Tjian R., 2003).

Para que el PIC se forme, se requiere que la proteína de unión a la caja TATA (TBP, o "TBP" por sus siglas en inglés) se una a esta caja y junto con aproximadamente otras trece proteínas (Figura 4), denominadas factores asociados a TBP (TAF's) formen el complejo conocido como TFIID (Chen B. y Hampsey M., 2002). El TFIID responde al contacto de proteínas activadoras por medio de cambios conformacionales que facilitan la unión de otros factores adicionales como TFIIB; que es una proteína que interacciona con la TBP y con secuencias de ADN corriente arriba de la caja TATA. Entonces se agregan el TFIIA, la ARNpol II y otros factores adicionales, como TFIIF; a esto, sigue la unión de TFIIE, TFIIH y TFIIJ y entonces la ARNpol II deja la caja TATA y empieza el proceso de la transcripción (Hernández N., 1993).

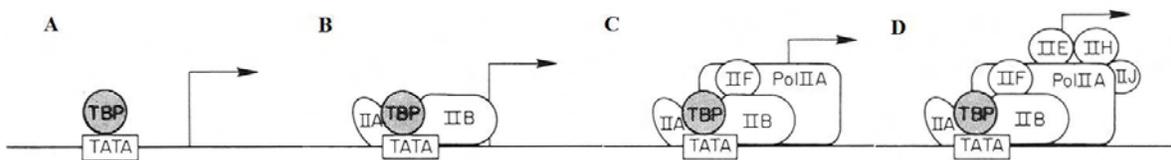


Figura 4. Proceso de inicio de la transcripción; (A) unión de la TBP a la caja TATA y reclutamiento de los factores asociados a TBP, para dar lugar al complejo TFIID; (B) unión del TFIIA y TFIIB, lo que produce la señal para que la (C) ARNpol II se una al complejo junto al TFIIF; (D) unión de los últimos Factores e inicie la transcripción (Tomada y modificada de Hernández N., 1993).

2.2.3 Proteína de unión a caja TATA (PUT).

La PUT es una proteína de entre 26 kDa y 40 kDa (PDB, 2009), que se identificó como una subunidad del complejo TFIID, al que une la ARNpol II en la transcripción, donde se observó su actividad por vez primera. Asimismo, se sabe que ésta también participa en la transcripción mediada por las ARNpol I y III, y por lo mismo se le catalogó como un factor universal para la transcripción. La PUT junto con los factores asociados a ella, se encargan de la formación del PIC para iniciar el proceso de la transcripción y es ésta uno de los elementos esenciales en la regulación de este proceso. Estudios *in vitro* han mostrado que la transcripción se puede llevar a cabo en ausencia del complejo TFIID, pero no en ausencia de la PUT (Burley S., 1996a). La PUT es el componente clave de la transcripción y el único factor que hace contacto con una secuencia específica del ADN (Lewine B., 2008).

2.2.4 Estructura.

La PUT de *Arabidopsis thaliana* tiene una estructura de “silla de montar” (Figura 5), con dimensiones aproximadas de 32 Å x 45 Å x 60 Å (Nikolov D. y Burley S., 1994), está compuesta por una estructura simétrica de hélices α y láminas β , con dos dominios estructurales de entre 89 a 90 aminoácidos, los cuales conforman el segmento carboxilo-terminal (C-terminal) altamente conservado (180 aa aproximadamente con un 80% de conservación), y por un segmento amino-terminal (N-terminal) flexible, pero muy variable entre especies que comprende desde 18 aa en las PUT de plantas, hasta 159 aa en la PUT de humano (Heard D., et al., 1993). La cara cóncava de la estructura de “silla de montar” consiste en diez láminas β anti paralelas, altamente curvadas, en las cuales se localizan todos los aa implicados en la unión al ADN. La cara convexa, está conformada por cuatro hélices α anfipáticas, que contienen residuos importantes para la interacción con otros factores de transcripción (Kim J. y Burley S., 1994).

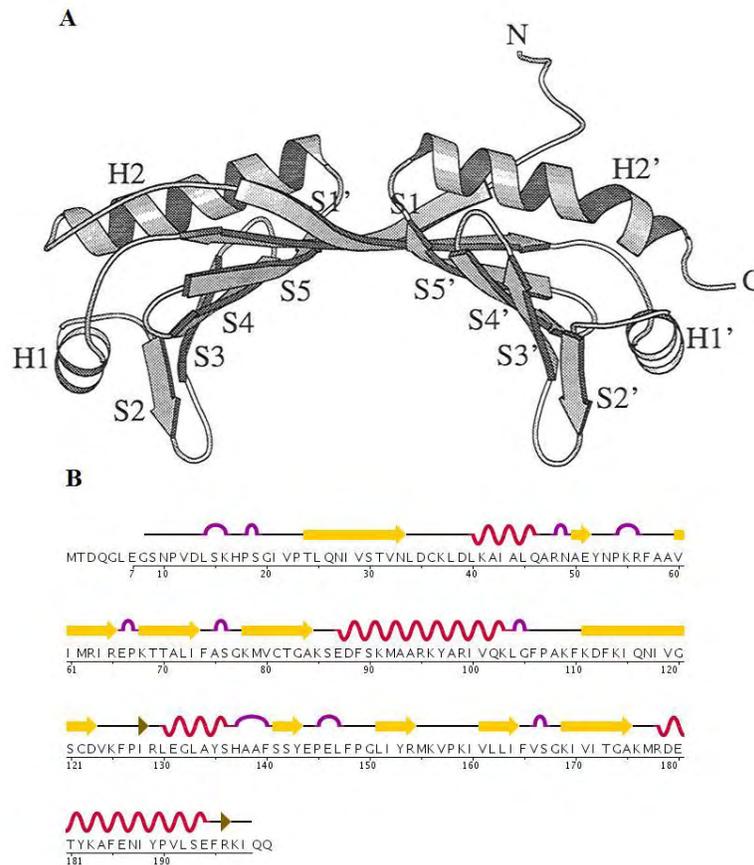


Figura 5. Estructura de la PUT de *Arabidopsis thaliana*. (A) Muestra la estructura terciaria con sus dos dominios: el dominio cóncavo, con el cual se produce la unión al ADN y el dominio convexo, que sirve para interactuar con otras proteínas. Se aprecia la conformación de "silla de montar", las 10 láminas (S) β y las 4 hélices (H) α . (B) Muestra la estructura primaria de la PUT, señalando sobre la secuencia de aminoácidos la estructura secundaria que se forma. (Tomada y modificada de Davidson I., 2003; y de Protein Data Bank, 2009: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1VOK>).

2.2.5 Reconocimiento del sitio de unión de la PUT al ADN.

Se sabe que el contacto entre la PUT y el ADN se da exclusivamente en el surco menor de la doble hélice α , ya que esto provee el ambiente adecuado para que se de el reconocimiento de secuencias específicas mediante interacciones polares y no polares. Recientemente se ha propuesto que el reconocimiento del sitio de unión al ADN se da por cuestiones termodinámicas y electrostáticas (Kim J. y Burley S., 1994). Uno de las propuestas más aceptadas menciona que la caja

TATA puede ser dividida en dos debido a sus diferencias en “flexibilidad” (electrostática) (Juo Z., et al., 1996), en donde las láminas β del dominio C-terminal de la PUT interaccionan más favorablemente con la parte 5' de la caja, que es más “flexible”; mientras que el extremo 3', que es más “rígido”, se une al extremo N-terminal debido a su característica electropositiva (Liu Y. y Schepartz A., 2001).

En ensayos recientes se ha recabado evidencia que apunta que el extremo N-terminal influencia la unión de la PUT al ADN, mediante la formación primero de un complejo ADN-PUT con el N-terminal doblado y un segundo complejo, más estable, con el N-terminal sin doblar (Davidson I., 2003). Este segundo complejo permite que el dominio formado por las láminas β , quede expuesto para la interacción caja TATA-PUT (Lescure A., et al., 1994).

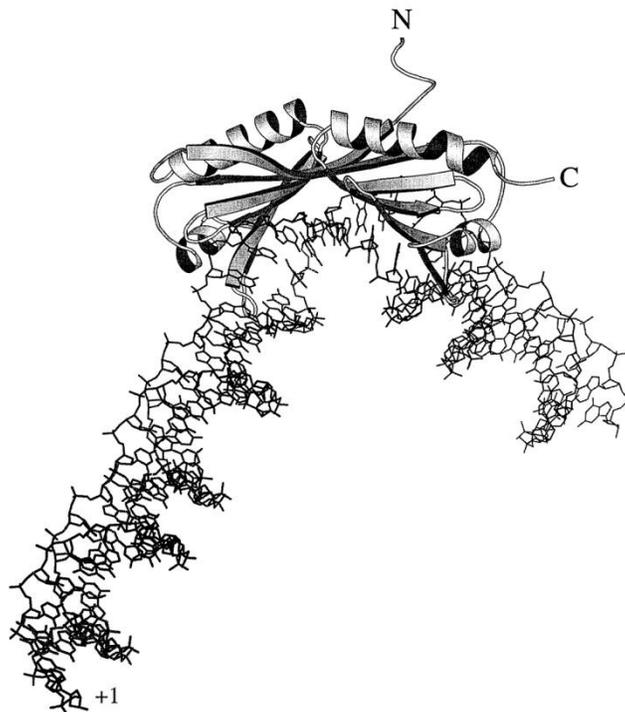


Figura 6. Esquema que muestra como se produce la unión de la PUT al ADN en el surco menor (Tomada de Burley S., 1996a).

Las láminas β hacen contacto en la porción conformada por el fosfato-ribosa en las 8 pares de bases que conforman a la caja TATA (Figura 6). El extremo 5' de la

cadena de ADN entra en la parte baja de la estructura de “silla de montar” y se induce un desenrollamiento en la doble hélice de ADN, por la inserción de dos residuos de fenilalanina (F) (Kim J. y Burley S., 1994). La F¹⁴⁸ hace contacto, mediante fuerzas de van der Waals, con el O4 y el C2 de la T¹, asimismo con el O4 del azúcar unido a la A². De forma similar la F⁵⁷ hace contacto con el O4, C2 y O2 de la T⁷ (cadena no codificante), produciendo un pandeo en 4 de las bases restantes (Burley S., 1996b). Estas bases hacen contacto con la PUT mediante interacciones de Van der Waals entre grupos no polares, y entre grupos polares (Cox J., et al., 1997).

III. Hipótesis.

Los genes de *Taenia solium* poseen cajas TATA en su región promotora, por lo que es posible que este parásito cuente con una proteína de unión a dichas cajas (PUT).

IV. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

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

4.2 Objetivos Particulares.

- Identificación de la PUT en *Taenia solium* mediante la inmunoelectrotransferencia.
- Producción de una sonda de ADNc para la PUT.
- Aislamiento del ADNc que codifica para esta proteína.
- Secuenciación y caracterización del ADNc.

V. Material y Métodos.

5.1 Material Biológico.

Las cepas de las bacterias utilizadas pertenecen a la especie *Escherichia coli*, cepas: XL1-Blue *mrf*⁻ [*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*⁻ F'(proAB⁺ *lacI*^q *lacZ*ΔM15 Tn10 tet^R)] y TOP10 [F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hdsRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 dROS recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL*(Str^R) *endA1 nupG*] de la casa Invitrogen.

Los cisticercos de *Taenia solium* fueron obtenidos del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente. Los parásitos se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS, ver anexo) y se guardaron a -20°C, hasta su uso.

El ARN total fue obtenido por la técnica de Trizol y almacenado a -70°C, y la biblioteca de ADNc construida con el fago λZAP, fueron preparados anteriormente en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM.

5.2 Reactivos.

Los oligonucleótidos PUT-5' y PUT-3' fueron diseñados a partir de los sitios RNAEYNP y YEPELFP, secuencias altamente conservadas en varias PUT's. Los oligonucleótidos que flanquean la región de clonación del fago λZAP denominados T3 y T7 fueron comprados a la casa comercial Pharmacia. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-PUT de la casa comercial AbCam. Para las reacciones de PCR se utilizó el estuche producido por la casa Biotecnologías Universitarias. El estuche para la reacción conjunta de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) fue el Superscript One-Step RT-PCR de la casa Invitrogen. Se utilizó el Estuche Random Prime Labelling System

para el marcaje radioactivo de las sondas, de la casa comercial GE Healthcare. El isótopo radiactivo ^{32}P -dCTP con una actividad específica de 250 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ (110 TBq/mmol) para realizar el marcaje de la sonda fue comprado a la casa comercial Amersham Bioscience. Las placas de rayos X fueron de la marca KODAK. Las membranas de nylon fueron de la marca Hybon de Amersham Bioscience y las membranas de nitrocelulosa de la casa Millipore.

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

5.3 Preparación del extracto crudo.

Aproximadamente 10g de cisticercos de *Taenia solium* fueron homogenizados en un Ultraturrax T-8 de la casa comercial IKA, con una la solución de extracción con inhibidores de proteasas [Tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) 10mM, Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.5M, Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 200mM]. La homogeneización se realizó mediante 3 pulsos de 30 seg cada uno, con 1 min de incubación en hielo entre cada uno. El homogenado se centrifugó 30 min a 25,000 rpm (AvantiTM 30 Centrifuge, Beckman) y se colectó el sobrenadante, el cual se dializó en 4L de una solución PBS, pH 7.4 durante toda la noche. Al término de la diálisis, el sobrenadante se centrifuga por 15 min a 25,000 rpm. Al sobrenadante obtenido se determina la concentración de proteína por el método de Bradford, se divide en alícuotas y se almacena a -20°C hasta su uso. La composición de los extractos se determinó por geles de poliacrilamida con SDS.

5.4 Inmunoelectrotransferencia.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% para separar los componentes del extracto de larva de *T. solium*. Se cargó el extracto crudo (3 $\mu\text{g}/\text{mm}$ de gel) y la electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 1 hr. Una vez terminado el proceso

de electroforesis, se retiraron los geles y se colocaron en una cámara de transferencia en contacto con una membrana de nitrocelulosa cortada al mismo tamaño del gel. La transferencia se realizó a 100V durante 1 hr. Una vez terminada ésta, se retiran las membranas de nitrocelulosa, son lavadas en PBS y cortadas en tiras (aproximadamente 2 mm). Las tiras fueron colocadas en charolas con 500 µL de una solución bloqueadora (ver anexo) por 30 min, se adiciona el primer anticuerpo a una dilución 1:250, el anti-PUT de humano en conejo (experimental) o una y Normal de Conejo como control negativo y se incuban a temperatura ambiente por 1 hr con agitación lenta. Transcurrido ese tiempo, se realizan tres lavados con una solución de PBS y Tween 0.3% de cinco minutos cada uno con agitación. Entonces se colocan sobre la tira de membrana 500 µL del segundo anticuerpo (α peroxidasa de conejo) diluido 1:2000 en PBS y Tween 0.3% y se deja incubar a temperatura ambiente por 1 hr más. La membrana se lava como antes, agregando un lavado con PBS sólo. Los anticuerpos unidos a las membranas se revelan con 1 mL de una solución conteniendo 0.005% de diaminobencidina (DAB) y 1 µL de H₂O₂ al 30% con agitación lenta hasta la aparición de bandas en las membranas (aproximadamente 5 min).

5.5 Obtención de la Sonda.

Para generar la sonda para la PUT se realizó un RT-PCR utilizando los oligonucleótidos PUT-5' y PUT-3' y 1µg de ADNc de larva de *Taenia solium*. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% (ver anexo) corriéndose en una cámara de electroforesis de la casa Life Technologies, a 100V durante 1 hora. El fragmento obtenido fue cortado del gel y disuelto en una solución NaI 6M a 37°C por 15 minutos. Después de que se ha disuelto la agarosa, a la mezcla se le agregan 2µL de perlas de vidrio, se agita y se incuba a 4°C por 2 hr. Inmediatamente se centrifuga a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 30 seg y se desecha el sobrenadante. Se lavan las perlas una vez con 500 µL de NaI, se centrifuga a 14,000 rpm durante 30 seg, se adiciona una solución de etanol al 50% en TRIS-HCl, se resuspenden las perlas de vidrio y se

centrifuga como antes, este paso se repite por 2 veces más. Finalmente, después de desechar el sobrenadante, las perlas se secan a 37°C y el ADN se eluye resuspendiendo las perlas en 25 µL de amortiguador TE (ver anexo) e incubando la mezcla a 37°C por 30 min. El fragmento de ADN obtenido fue amplificado por PCR y ligado en el vector pCRII-TOPO. Con la ligación anterior se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa TOP10; se encontraron dos clonas positivas conteniendo el fragmento, las cuales se secuenciaron en un secuenciador automático SEQ4x4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

5.6 Marcaje radioactivo.

El fragmento anterior fue marcado radiactivamente con el estuche Random Prime Labelling System de la casa GE Healthcare. Para esta metodología se necesitan 25 ng del fragmento en un volumen de 45 µL de amortiguador TE. Se calienta a 100°C por 5 min e inmediatamente se enfría en hielo por 5 min. La mezcla se coloca en el tubo de reacción del estuche para marcaje RedPrime, se adicionan 5 µL de ³²P-dCTP al tubo y se incuba durante 10 min a 37°C, transcurrido este tiempo se detiene la reacción con 5 µL de EDTA 0.2 M. Finalmente antes de utilizar la sonda para realizar el tamizaje de la biblioteca de ADNc, ésta debe desnaturalizarse a 100°C por 5 min y mantenerse a 4°C por otros 5 min.

5.7 Tamizaje para el aislamiento de clonas.

Una colonia de la bacteria *E. coli* XL1-Blue mrf⁻ fue inoculada en 50 mL de medio SOBM e incubada a 37°C durante toda la noche. La titulación de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo realizando diferentes diluciones de la misma. Estas bacterias (200 µL) se infectaron con diferentes volúmenes de las diluciones de la biblioteca por 15 min, para después mezclarse con medio SOBM-Top líquido (a una temperatura de 55°C), y sembrarse en cajas Petri con SOBM-agar (ver anexo). Una vez solidificado el medio se incuban toda la noche a 37°C. Se cuenta el número de placas líticas se multiplica por la dilución y se obtiene el título de la

biblioteca. Se sembraron 45,000 fagos en tres cajas petri de 180 mm de diámetro, siguiendo el protocolo antes mencionado. Las placas líticas producidas por los fagos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, colocando la membrana por encima del tapete crecido en la caja petri, estas membranas se mantuvieron por 2 min, se marcaron con tinta china para tener puntos de referencia que permitan relacionar las autoradiografías con la posición de los placas líticas. Las membranas fueron colocadas sobre una solución alcalina desnaturizante (ver anexo) por 2 min para desnaturizar el ADN del fago, las membranas son neutralizadas con una solución neutralizante de Tris-HCl (ver anexo) por otros 2 min. Finalmente las membranas se lavan con una solución de citratos 5X (SSC 5X, ver anexo) durante 2 minutos. El ADN se fija a la membrana mediante luz UV, utilizando un equipo UV Stratalinker 2400 de la casa Stratagene. Las membranas se secan a temperatura ambiente y después son colocadas en una solución de hibridación (ver anexo) por 1 hr a 50°C. Se agrega la sonda marcada con ³²P-dCTP y se deja hibridar con las membranas toda la noche a 55°C. Las membranas se lavaron 3 veces con 100 ml de SSC 2X por 5 min en agitación. Las membranas se secaron y se expusieron a placas de rayos X toda la noche, entonces las placas se revelan. Las clonas positivas se aíslan y almacenan en 1mL de medio SM (ver anexo) a 4°C. Se realizaron un segundo y tercer tamizaje para obtener clonas de fagos aisladas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

5.8 Purificación de ADN a partir de fagos.

Para la obtención del ADN de los fagos se infectan 300 µL de bacterias *E. coli* XL1-Blue con aproximadamente 1×10^6 fagos de una clona, esta mezcla se incuba 15 min a 37°C y se siembra en una caja Petri de SOBm-agar como ya describió en la sección anterior. Se deja crecer toda la noche a 37°C hasta obtener un lisis total del tapete bacteriano, entonces los fagos se recuperan con 5 ml de medio SM (ver Anexo) agitando por 1 hr a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, 2 mL mas de SM son adicionados a la caja para recuperar los fagos remanentes. El SM con los fagos se transfiere a tubos Falcon de 15 ml y se le adicionan 200 µL de

CHCl₃, se agita y se centrifuga a 3400 rpm (Centra CL2, IEC) por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se almacena a 4°C. De allí se toman 700 µL y se mezclan con 700 µL de solución PEG (ver anexo I) en un tubo de microfuga de 1.5 mL y se mantienen en hielo por 2 hr, se centrifuga a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 15 min, a temperatura ambiente, se tira el sobrenadante. Y el botón se resuspende con 200 µL de medio SM y se le agrega 2 µL de ARNasa (1 mg/mL) y 2 µL de ADNasa (100 µg/mL) incubándose a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se agregan 2 µL de SDS al 10% y 2 µL de EDTA 0.5M pH=8.0, y se incuban a 68°C por 15 min. La mezcla anterior se somete a extracciones con 200 µL de fenol saturado con TE y 200 µL de CHCl₃ en la primera extracción y 200 µL de CHCl₃ en la segunda. A la fase acuosa obtenida en la segunda extracción se le adicionan 200 µL de isopropanol y se mantiene a -70°C por más de 2hrs. A continuación se centrifugan las muestras a 14,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se tira el sobrenadante y el botón se resuspende en etanol al 70%, se vuelve a centrifugar a 14,000 rpm por 5 min y se tira el sobrenadante. El botón (ADN) se seca a 37°C por 10 min y se resuspende en 50 µL de amortiguador TE.

5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para cada reacción de PCR se utilizaron las siguientes cantidades: 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X, 2.5 µL de dNTP's 2mM, 1.25 µL de MgCl₂ 20X, 1 µL de cada oligonucleótido, 0.25 µL de enzima (5 U/µL), 1 µL (1 ug) de ADN templado y H₂O hasta un volumen final de 25 µL. Las muestras fueron colocadas en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystems) usando las siguientes condiciones: Un primer ciclo de 95°C por 3 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, 30 ciclos de 95°C durante 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min y un último ciclo de 95°C por 1 min, 52°C por 2 min, 72°C por 4 min.

5.10 Ligamiento y transformación bacteriana.

La reacción de ligamiento se llevó a cabo utilizando el estuche de ligación TOPO-TA Cloning System de la casa Invitrogen, para lo cual se utilizó 1 μL del vector pCR II-TOPO, 1 μL de amortiguador de ligación salino, 1 μL de agua y 3 μL de un PCR fresco. Por último la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hr. A 50 μL de *E. coli* TOP10 competentes se le adicionaron 2 μL de la ligación. La mezcla se incubó en hielo por 1 hr y en seguida se sometió a un choque térmico a una temperatura de 45°C por 30 seg. Rápidamente, se les adicionan 400 μL de medio SOC y se incuban a 37°C por 30 min en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación las bacterias, se siembran en una caja petri con LB-agar (ver anexo) con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se dejan crecer a 37°C toda la noche. Se escogen algunas colonias para preparar su ADN plasmídico y por medio de la PCR con los oligonucleótidos T3 y T7 se identifican las clonas que contienen los insertos de interés.

5.11 Preparación de ADN plasmídico.

Las bacterias transformadas que presentaban el inserto de interés se hicieron crecer en 100 mL de medio LB (ver anexo) con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C toda la noche. Para obtener el ADN plasmídico se realizó el método de la lisis alcalina. El cultivo anterior se centrifugó a 3400 rpm (Centra CL2, IEC) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 5 mL de la solución hipotónica (solución 1, ver anexo) dejando incubar la mezcla por 10 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se le agregan 10 mL de una solución alcalina recién preparada (solución 2, ver anexo), se agita la mezcla suavemente por inversión lenta y se incubó en hielo por 10 min, en seguida se adicionan 7.5 mL de solución 3 (ver anexo), se agita perfectamente y se deja 10 min en hielo, se centrifuga a 3400 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. La pastilla se resuspende en un tubo de microfuga en 200 μL de TE y se le agregan 2 μL de ARNasa (1

mg/mL) incubando por 30 min a 37°C. Posteriormente la muestra se extrae con fenol y cloroformo y la fase acuosa se pasa por una columna de sefarosa CL4B previamente equilibrada con TE. Fracciones de 500 µL fueron colectadas y las fracciones conteniendo el ADN plasmídico (visualizadas en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio) se precipitan con acetato de sodio 3M pH=5.2 y etanol absoluto, dejando la mezcla de 2 a 12 horas a -70°C. Las muestras se centrifugan 10 min a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C), se tira el sobrenadante, la pastilla se seca y resuspende en 50 µL de TE.

5.12 Secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo con el estuche Thermo Sequence Cy 5.5 Dye Terminator Sequencing Kit, en el cual se necesita un mínimo de 500 ng de ADN plasmídico que debe llevarse a un volumen de 12 µL con agua desionizada. A la dilución anterior se le agrega 1 µL de cebadores marcados fluorescentemente (2 – 5 µM) y se agita suavemente, esta mezcla se le conoce como “master mix”. Para las reacciones de terminación se necesitan 3 µL de dideoxinucleótidos del estuche repartidos en sus respectivos tubos, uno para A, para C, para G y para T, a cada una de estas reacciones se le agrega 3 µL de “master mix”, se agitan perfectamente los cuatro tubos y se someten a 20 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Terminados los ciclos las mezclas se enfrían a 4°C y entonces se les agrega 6 µL de amortiguador TE. Todos los elementos anteriores se agitan en vortex y se somete a 72°C por 3 minutos y 1 minuto en hielo. Para mejorar las señales de eliminación por el exceso de fluorocromos, las mezclas antes de ser cargadas en el gel se pasan a través de una microcolumna de sefarosa G-50 para eliminar todos los dideoxi nucleótidos y cebadores que no se incorporaron durante la extensión, inmediatamente las muestras se secan utilizando vacío y se resuspenden en 6 µL de amortiguador de cargado con formamida y colorante. La secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador SEQ4x4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech. Los análisis de

la secuencias nucleótidas obtenidas, así como la traducción de la secuencia a aminoácidos y los alineamientos tipo Clustal se realizaron con el programa PCGENE.

VI. Resultados.

La Figura 7 muestra el ensayo de inmunoelectrotransferencia con el extracto crudo de larva de *Taenia solium* y los anticuerpos anti-PUT comerciales de humano. Se observa que los anticuerpos reconocieron una banda en aproximadamente 36 kDa en el extracto probado. En contraste, no se observaron bandas en la membrana conteniendo el extracto del parásito, cuando una fracción y normal de conejo fue utilizada como control negativo.

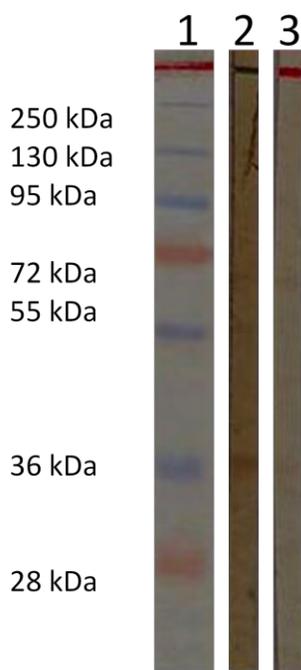


Figura 7. Inmunoelectrotransferencia de extractos larvarios de *Taenia solium* enfrentados contra un anticuerpo anti-PUT de humano. 1) Marcador de peso molecular, 2) Extracto crudo de larva de *Taenia solium*, incubado con el anticuerpo anti-PUT de humano, 3) Extracto crudo de larva de *Taenia solium* incubado con una fracción de y normal de conejo.

La Figura 8A muestra el fragmento de 306 pb de ADN amplificado por la RT-PCR a partir de un ADNc de larva de *T. solium* utilizando los oligonucleotidos PUT-5' (RNAEYNP) y PUT-3' (YEPELFP). Los análisis de la secuencia nucleotídica (FIG. 8B) mostraron que la secuencia de aminoácidos de este fragmento presenta una alta identidad y algunos motivos específicos encontrados en las PUTs de otros organismos.

Este fragmento de 306 pb fue marcado radioactivamente con ^{32}P -dCTP y fue utilizado como sonda marcada para el aislamiento e identificación de clonas que pudieran contener la secuencia completa que codifica para la PUT de *Taenia solium*. Se realizó un tamizaje de una biblioteca de ADNc construida en el fago λ ZAP.

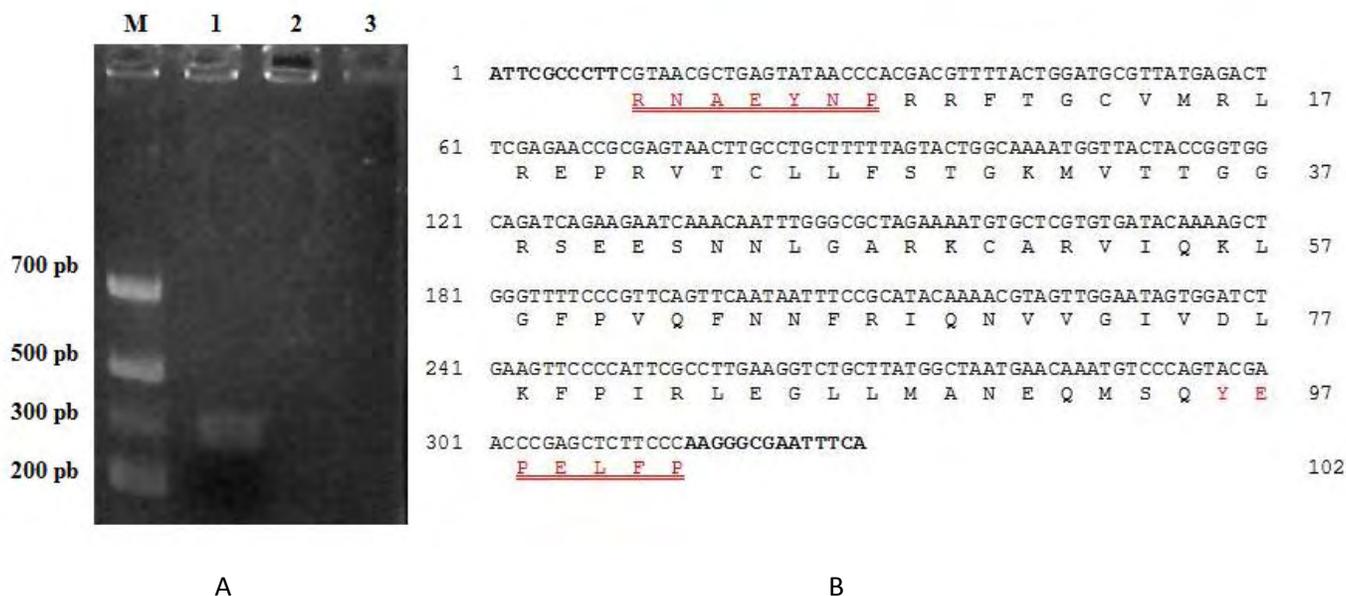


Figura 8. A la izquierda (A) se observa un gel de agarosa al 2%, donde en el carril marcado como M, se encuentra un marcador de pesos moleculares. En el carril 1 se observa el fragmento producido de la reacción de PCR usando los oligonucleótidos PUT-5' y PUT-3'. En el carril 2 se observa una reacción de PCR donde se utiliza solamente el oligonucleótido PUT-5' y en el carril 3 se observa una reacción de PCR donde se utiliza solamente el oligonucleótido PUT-3'. La imagen de la izquierda (B) muestra la secuencia de aa obtenida a partir de la secuencia nucleotídica de la sonda. En rojo y subrayadas se muestran las regiones de aa donde se diseñaron los PUT 5' y 3'.

Una vez realizado el tamizaje de 45,000 fagos, se encontraron 6 clonas, después del tamizaje terciario solo 2 clonas resultaron positivas y se denominaron B311 y B341 (Fig. 9). Ambas clonas por medio de PCR utilizando los oligonucleótidos T3 y T7 que flanquean el polilinker del vector ZAP, mostraron tener un tamaño de ~ 1kb y un patrón de restricción idéntico cuando se digieren con las endonucleasas *Bam* HI y *Hind* III (No mostrado).

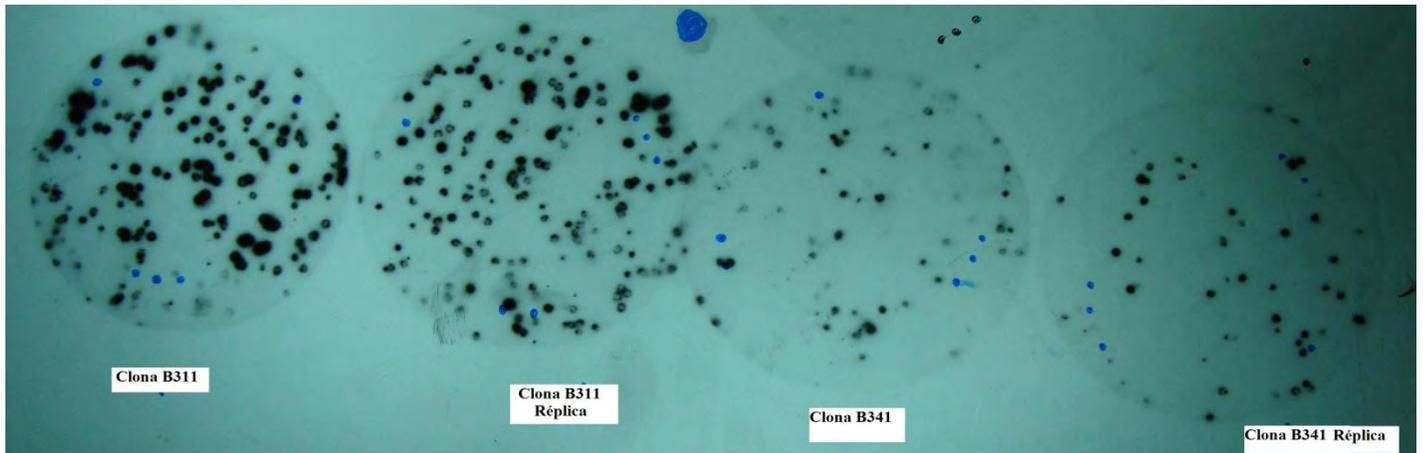


Figura 9. Autoradiografía del tamizaje terciario de las clonas B311 y B341 con sus originales y sus relicas que dieron una hibridación positiva con la sonda de ADNc de PUT marcada con ^{32}P -dCTP.

Los fragmentos de ADN amplificados con los oligonucleótidos T3 y T7 de las clonas B311 y B314 fueron clonados en un vector pCRII-TOPO, transformados en células de *E. coli* TOP 10 y secuenciados. En la Figura 10 se muestran el análisis de la secuencia nucleotídica de la clona B311, que muestra que el inserto está compuesto de 1149 pb. Presenta un marco abierto de lectura del nucleótido 167 al nucleótido 983 y codifica para una proteína de 271 aminoácidos. Es importante mencionar que no se encontró la secuencia ATG que usualmente marca la posición de inicio de la transcripción. La secuencia de terminación TAA se encontró en el nucleótido 981. Tampoco se encontró un sitio de poliadenilación clásico. Cabe mencionar que la clona B341 mostró una secuencia idéntica a la clona B311.

Los análisis de comparación de la secuencia primaria de la clona B311 muestran además que el dominio C-terminal está conformado por 190 aa, mientras que el dominio N-terminal está conformado por 81aa (Fig 10). Asimismo, se comparó la secuencias de aa de la clona B341 con otras secuencias de PUTs de otros organismos depositadas en bancos de datos como GenBank (Fig 11), lo que mostró que el dominio C-terminal de la clona tiene gran identidad con otras

especies: 74.4% con *Caenorhabditis elegans*, 76.7% con *Homo sapiens* (humano), 77.8% con *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y 79.5% con *Bombyx mori* (gusano de seda). Por otro lado, el extremo N-terminal tiene una identidad menor al 1% con estas mismas especies.

El extremo N-terminal es rico en residuos de S (16%) y de P (19%). Mientras que el extremo C-terminal es rico en residuos de A (9%), L (10%), I (8%), R (8%) y K (8%). También se encontró que los aminoácidos que tienen contacto con el ADN están bien conservados en la clona B311: Q⁸⁵, N⁸⁶, V⁸⁸, R¹¹⁵, F¹¹⁶, R¹²², R¹²⁷, T¹²⁹, S¹³⁵, K¹³⁷, V¹³⁹, T¹⁴¹, G¹⁴², K¹⁴⁴, Q¹⁷⁵, N¹⁷⁶, F²⁰⁷, P²⁰⁸, V²¹¹, R²¹³, V²²⁰, F²²⁴, S²²⁶, K²²⁸, V²³⁰, T²³², K²³⁵. Solo existe un aminoácido diferente que es V²²⁰ que en las otras especies corresponde a una I²²⁰.

El análisis computacional realizado en el programa PCGENE predijo una masa molecular de la proteína de 30.1 kDa y un PI también predictivo de 10.51.

```

1 AAAATGTTTTAATATCTGGTGTCTATTTCCAAACAGCATTAGCTTATTCTATTTGCCAT
61 TACCATTGGCACTGGTATTCAAATATTGGACTTTCTTCTCGATTTTGGCGCTTCATACCC
121 AACAAATGTCAACATTAATAATTCTTCTTGTAAATTTGCCTCATTAAAAATCCATTTGATT
                                     N P F D 4

181 CCAACAGCCCTTCGTGGACCCCGCAACCAAGCAATGTAAGCATCGGCAGCATCTCAACA
   S N S P S W T P Q P S N V S I G S I L N 24

241 GCAACCCTCCGGGTTCTGTGCGAGCAGATGCAGCCAACCCCATCAATCAGCTCGTCAGTG
   S N P P G S V E Q M Q P T P I N Q L V S 44

301 TTGTCGGGAGCTATGCAGCTCCTTCCAGTACTCAGGCACATAGCAGGCCGCCGTATACTC
   V V G S Y A A P S S T Q A H S R P P Y T 64

361 CAAACACTCCTGGTACACCATTTACGAACGCGATGGTGCGATACCTCAGCCACAGCTAC
   P N T P G T P F H E R D G A I P Q P Q L 84

421 AAAACATTGTGTGTACAGTAAATCTTGAGATAAGATTGGACTTAAGACGGATAGCTCGGA
   Q N I V C T V N L E I R L D L R R I A R 104

481 GCGCCCGTAAACGCTGAATACAATCCCAAACGATTGCGCCCGTGATTATGCGTATTGCGG
   S A R N A E Y N P K R F A A V I M R I R 124

541 AGCCACGAACCACTGCACTCATCTTCTCCTCCGGCAAAATGGTATGCACTGGCGCCAAAA
   E P R T T A L I F S S G K M V C T G A K 144

601 GTGAAAACGAGGCGCGTCTTGCTGCGCGCAAGTACGCTCGAATAATTCAAAGCTGGGGT
   S E N E A R L A A R K Y A R I I Q K L G 164

661 TCGATGCTCGGTTTAAAGGTTTTACAATTCAAACATGGTGGGATCCTGTGACGTGCGGT
   F D A R F K G F T I Q N M V G S C D V R 184

721 TCCATATCCGTCTGGAGGGCCTAAACGCTGCACAAAAGAAATTTACCACATATGAACCCG
   F H I R L E G L N A A Q K K F T T Y E P 204

781 AGTTGTTTCCGTCTTGTGTTTATCGGATGCAAAGCCCAAGATTGTCTTTTGATTTTCG
   E L F P G L V Y R M Q K P K I V L L I F 224

841 TTTCCGGGAAAATCGTCTTAACTGGTGCCAAAGTGCAGATGAGATCTATCAAGCCTTCA
   V S G K I V L T G A K V R D E I Y Q A F 244

901 ATAACATCTATCCGATACTGAAGAACTTTATGAAATTGGATTCAGACAAAATCGGGACTGC
   N N I Y P I L K N F M K L D S D K S G L 264

961 ATCAGCCAGCACTTACTGGCTAAATCACCACGTTTATCCGTGTGTGCATAAAGAAGTAGCC
   H Q P A L T G 271

1021 TTTCCGGTCCCCTGTATACACAACCACAGATGATCCAACCCCGTCCCCTCTTTCTATCAT
1081 GTCAAATGCTTGCAATTCATCTCTGACAGTAGAATTTGTATTGATGTGAAAAAAAAAAAA
1141 AAAAAAAAAA *****

```

Figura 10. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos obtenida del ADNc de la clona B311. Los números de la izquierda corresponden a los nucleótidos (pb), mientras que los de la derecha indican los aminoácidos traducidos. Los aminoácidos subrayados corresponden a la sonda utilizada en el tamizaje. Los aminoácidos en cajas se encargan de la unión al ADN. En negritas y subrayado se muestra el codón de terminación de la traducción, mientras que marcado con asteriscos se muestra el sitio putativo de poliadenilación.

VII. Discusión.

Se conoce que en todos los organismos eucariontes se lleva a cabo el proceso de la transcripción y que éste está regulado por la PUT aunque las ARNpol, y otros factores asociados a ésta (TAF's) que forman el complejo TFIID (Wong J., et al., 1992) son necesarios para iniciar la transcripción.

El uso de la inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos anti-TBP de humano, permitió identificar una banda de alrededor de 36 kDa en el extracto crudo de larva de *T. solium*. Tamaño que concuerda con lo reportado en la literatura para varias PUTs que presentan un peso molecular que va desde los 28 kDa hasta los 40 kDa (PDB, 2009). Por otro lado, este reconocimiento de la banda de 36 kDa por los anticuerpos anti-PUT de humano confirma la alta identidad que las PUT presentan entre especies, probablemente debido a dominios conservados para su función.

Una vez identificada una banda putativa para una PUT en la *T. solium*, nos avocamos a producir una sonda de ADN, por medio de la PCR utilizando un ADNc de la larva de *T. solium*, los oligonucleótidos (PUT5' y 3') diseñados en 2 regiones altamente conservadas de la proteína. Se obtuvo un fragmento de 306 pb, tamaño esperado de acuerdo al diseño realizado para los oligonucleótidos (ver Fig 8). El análisis de la secuencia nucleotídica de este fragmento y su comparación con otras PUTs en bases de datos mostraron que el fragmento contenía motivos encontradas en varias PUTs. Por lo que éste fue utilizado como sonda, en un proceso de tamizaje de 45 000 fagos de una biblioteca de ADNc de adulto de *T. solium*. Se aislaron dos clonas que contienen un ADNc que codifican para una PUT de *T. solium*. Cabe mencionar que este transcrito representa el 0.005% en este estadio del parásito.

Los ADNc obtenidos de ambas clonas al ser secuenciados y analizados, mostraron que son idénticos en secuencia nucleotídica, de aminoácidos y poseen

una alta identidad con otras PUTs reportadas en GenBank. El análisis de la secuencia primaria mostró que la proteína puede dividirse en dos estructuras: en extremo C-terminal y el extremo N-terminal (Burley S., 1996a); cada uno de estos extremos tiene características y funciones especiales. Por ejemplo, el extremo C-terminal encargado de la unión de la proteína al ADN tiene gran identidad con las PUT's de otros organismos; revela una identidad de 74.4% con *Caenorhabditis elegans*, 76.7% con *Homo sapiens* (humano), 77.8% con *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y 79.5% con *Bombyx mori* (Hernandez N., 1993; Heard D., et al., 1993; Juo Z., et al., 1996). Asimismo en esta porción de la proteína, se encontraron conservados todos los aminoácidos que realizan los contactos con el ADN, la única excepción es la I²²⁰ presente en muchas otras PUTs de diferentes organismos, mientras que en *Taenia solium* se encontró la presencia de una V²²⁰, lo que no trae grandes repercusiones debido a que solo es el cambio de un aminoácido no polar por otro no polar. Es importante mencionar que además se encontraron los residuos conservados F¹¹⁶ y F²⁰⁷ que inician el proceso de unión al ADN (Burley S., 1996b), lo que sugiere que la unión al ADN por parte de la PUT de *Taenia solium* es similar a otras PUT's (Burley S., 1996b; Juo Z., et al., 1996; Adachi N., et al., 2008).

En contraste, el extremo N-terminal no está nada conservado entre especies y esto se debe a que la función que realiza es el reclutamiento de los TAF's y de otras proteínas que son necesarias para llevar a cabo la transcripción (Davidson I., 2003). La literatura reporta que las diferencias en este extremo van desde el tamaño con la presencia de 19 aminoácidos en PUT's de plantas hasta 159 aminoácidos en la PUT de humano (Heard D., et al., 1993). La secuencia de la PUT de *Taenia solium* reveló la presencia de 81 residuos en este extremo terminal, sin embargo cuando se comparó con otros organismos se encontró un nivel de conservación menor al 1%. (Wong J., et al., 1992).

Asimismo no se encontró el codón que generalmente marca el inicio de la transcripción, el ATG que codifica para una metionina (M), pero se encontró que

esta secuencia inicia con N (Asparagina). Esto puede deberse a que el ARN sufrió degradación o que la metionina de inicio está ubicada en una posición anterior, es decir en la parte anterior donde se abre el marco de lectura de la secuencia realizada. Esto se puede corroborar con el peso molecular predicho mediante los análisis computacionales, ya que el peso aproximado encontrado en la inmunoelectrotransferencia es de 36 kDa, mientras que el predicho es de 30.1 kDa. Tamaño que también puede ser debido a procesos traduccionales como la glicosilación entre otros. Cabe mencionar que en muchas especies de PUTs, el extremo N – terminal tiene secuencias largas con gran cantidad de residuos de Q, estos residuos permiten la interacción con los TAF's o con otras proteínas (Chalkley G, et al., 1999); mientras que la secuencia de la clona PUT presenta pocos de estos residuos. Sin embargo, la gran abundancia de residuos de P en esta clona probablemente estén sustituyendo la ausencia de Q, debido a que ambos son residuos de tipo polar y que podrían cumplir la misma función (Hansen S., et al., 1997). También se encontró un punto isoeléctrico (PI) predictivo de 10.51, el cual concordaría con la función de la proteína, ya que a pH fisiológico esta proteína tendría carga positiva, lo que explicaría su gran afinidad al ADN, debido a que éste último está cargado negativamente.

Finalmente, este trabajo muestra por primera vez un ADNc que codifica para una PUT en helmintos y proporciona las bases para empezar a entender cómo se lleva a cabo la transcripción en éstos, por ejemplo, permitirá producir una PUT recombinante para realizar estudios de unión a ADN y determinar su papel regulatorio en este proceso esencial que se lleva a cabo en todos los organismos.

VIII. Conclusiones

- La *Taenia solium* cuenta con una PUT.
- Se obtuvo por primera vez un ADNc que codifica para una PUT.
- Su ADNc tiene un tamaño de 816pb y codifica para una proteína de 271 aa.
- La PUT contiene los dos dominios clásicos: El extremo C-terminal altamente conservado con 190 aa y el N – terminal muy variable con 81 aa.
- Los resultados de este trabajo abre nuevos senderos para estudiar la transcripción en helmintos.

IX. Anexo.

Soluciones.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Solución 3 (lisis alcalina): Acetato de Amonio 7.5M.

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

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

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

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

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

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

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

X. Referencias.

1. Adachi N., Senda M., Natsume R., Senda T., Horikoshi M. "Crystal structure of Methanococcus jannaschii TATA box-binding protein". *Genes to Cells* 13: 1127 – 1140 (2008).
2. Allan J., Wilkins P., Tsang V., Craig P. "Immunodiagnostic tools for taeniasis". *Acta Tropica* 87: 87 – 93 (2003).
3. Bern C, Garcia HH, Evans C. "Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country". *Clin Infect Dis* 29:1203–1209 (1999).
4. Burley S. "The TATA box binding protein". *Cur Opin in Struc Biol* 6: 69 – 75 (1996).
5. Burley S. "X-ray crystallographic studies of eukaryotic transcription initiation factors". *Phil Trans R Soc Lon* 351: 483 – 489 (1996).
6. Chalkley G., Verrijzer P. "DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF_{II}250 – TAF_{II}150 complex recognizes the initiator". *The EMBO J* 18(17): 4835 – 4845 (1999).
7. Chen B., Hmapsey M. "Transcription activation: unveiling dispatch essential nature of TFIID". *Cur Biol* 12: R620 – R622 (2002).
8. Correa M., Flisser-Steinbruch A., Sarti-Gutiérrez E. "Teniasis y cisticercosis". En: Valdespino-Gómez J., Del Río-Zolezzi A., Velasco-Castrejón D., Escobar A., Ibáñez-Bernal S., Magos-López E., ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México, D.F.: *Secretaría de Salud* 8:335-345 (1994).
9. Cox J., Hayward M., Sanchez J., Gegnas L., Van der Zee S., Dennis J., Sigler P., Schepartz A. "Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box". *Proc Natl Acad Sci* 94: 13475 – 13480 (1997).
10. Davidson I. "The genetics of TBP and TBP-related factors". *Trends in Bio Sci* 28(7): 391 – 398 (2003).
11. Flisser A., Vargas-Parada L., Lacleite P. "*Taenia solium*: un parásito cosmopolita". *Investigación y Ciencia* 24-33 (2006)
12. Flisser A., Rodríguez-Canul R., Willingham III A. "Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments". *Veterinary Parasitology* 139: 283–292 (2006).
13. Flisser A., Gyorkos T. "Contribution of immunodiagnostic tests of epidemiological intervention studies of cysticercosis/taeniosis in México". *Parasite Immunology* 29:637–649 (2007).
14. Flisser A. "Neurocysticercosis in Mexico". *Parasitology Today* 4(5): 131 – 137 (1988).
15. García H., Gonzalez A., Evans C., Gilman R. "*Taenia solium* cisticercosis". *The Lancet* 361 (8): 547 – 556 (2003).
16. Hancock K., Khan A., Williams F., Yushak M., Pattabhi S., Noh J., Tsang V. "Characterization of the 8-Kilodalton antigens of *Taenia solium* metacoestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis". *Journal of Clin Micro* 41(6): 2577-2586 (2003).

17. Hancock K., Pattabhi S., Greene R., Yushak M., Williams F., Khan A., Priest J., Levine M., Tsang V. "Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis". *Mol & Bio Para* 133: 115 -124 (2004).
18. Hansen S., Takada S., Jacobson R., Lis J., Tjian R. "Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein TRF". *Cell* 91: 71 – 83 (1997).
19. Heard D., Kiss T., Filipowicz W. "Both Arabidopsis TATA binding protein (TBP) isoforms are functionally identical in RNA polymerase II and III transcription in plant cells: evidence for gene specific changes in DNA binding specificity of TBP". *The EMBO J* 12(9): 3519 – 3528 (1993).
20. Hernandez N. "TBP, a universal eukaryotic transcription factor?". *Genes & Dev* 7: 1291 – 1308 (1993).
21. Herrera L., Benitez-Bibriesca L., Sotelo J., Ostrosky-Wegman P. "La quimioterapia de la cisticercosis. Revisión acerca de su farmacocinética y toxicología". *Gac Med Mex* 136 (5): 477-489 (1999).
22. Hochheimer A., Tjian R. "Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression". *Genes & Dev* 17: 1309 – 1320 (2003).
23. Juo Z., Chiu T., Lieberman P., Baikalov I., Berk A., Dickerson R. "How proteins recognize the TATA box". *J Mol Biol* 261: 239 – 254 (1996).
24. Kaminsky, R. G. "Taeniasis-cysticercosis in Honduras". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 531–534 (1991).
25. Kim J., Burley S. "1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG". *Structural Biol* 1(9): 638 – 653 (1994).
26. King C., Mahmoud A. "Drugs five years later: Praziquantel". *Ann Intern Med* 110: 290-296 (1989).
27. Klug S., Cummings M., Spencer C. "Conceptos de genética". Ed. Pearson Educación. Madrid 2006. Págs: 363 – 375, 478 – 484.
28. Lacey E. "The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles". *Int J Parasitol* 18: 885 – 936 (1988).
29. Larralde C., De Aluja A. "Cisticercosis guía para profesionales de la salud". Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura económica. (2008): 15 – 17.
30. Larralde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepúlveda J. "Seroepidemiología de la cisticercosis en México". *Salud Publica Mex* 34: 197 – 210 (1992).
31. Lescure A., Lutz Y., eberhard D., Jacq X., Krol A., Grummt I., Davidson I., Chambon P., Tora L. "The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA-containing RNA polymerase II and III promoters". *The EMBO J* 13(5): 1166 – 1175 (1994).
32. Lewine B. "Genes IX". Jones & Bartlett Publishers 2008.

33. Liu Y., Schepartz A. "Kinetic preference for oriented DNA binding by the yeast TATA-binding protein TBP". *Biochemistry* 40(21): 6257 – 6266 (2001).
34. Medina, M., E. Rosas, F. Rubio, and J. Sotelo. "Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico". *Arch Intern Med* 150: 325–327 (1990).
35. Meza-Lucas A., Aguilar Rebolledo F. "Taeniosis humana por *Taenia solium*". *Rev Mex Patol Clin* 49 (2): 92-99 (2002)
36. Müller F., Lakatos L., Dantonel J., Strähle U., Tora L. "TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish". *Cur Biol* 11: 282 – 287 (2001).
37. Nikolov D., Burley S. "2.1 Å resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP)". *Structural Biol* 1(9): 621 – 637 (1994).
38. Pearson R., Guerrant R. "Praziquantel: A major advance in anthelmintic therapy". *Ann Intern Med* 99:195-198 (1983).
39. Prichard R. "The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics". *Int J Parasitol* 3: 409 – 417 (1973).
40. Sarti E. "La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*". *Sal Pub Mex* 39 (3): 225-231 (1997).
41. Sarti E, Schantz PM, Plancharte A, Wilson M, Gutierrez R, Lopez AS, Roberts J, Flisser A. "Prevalence and risk factor for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico". *Am J Trop Med Hyg* 46: 677-684 (1992).
42. Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Laclette J., Sotelo J., Aluja A., Vargas L., Larralde C. "Taenia solium disease in human and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions". *Microbes and Infections* 2: 1875 – 1890 (2000).
43. Sloan L., Schneider S., Rosenblatt J. "Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis". *J Clin Micro* 33(12): 3124 – 3128 (1995).
44. Tsang V., Brand J., Boyer A. "An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*)". *J Infec Dis* 159(1): 50 – 59 (1989).
45. Villalobos-Perozo R. "Clinical manifestations in the presentation of neurocysticercosis". *Kasmera* 31(2): 80 – 85 (2003).
46. Willms K., Vargas-Parada L., Laclette J. "Biología del parásito" en: Larralde C., De Aluja A. "Cisticercosis guía para profesionales de la salud" Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura económica. (2008): 19 - 40.
47. Wilkins P., Allan J., Verastegui M., Acosta M., Eason A., Garcia H., Gonzalez A., Gilman R., Tsang V. "Development of a serological assay to detect *Taenia solium* taeniasis". *Am J Trop Med Hyg* 60(2): 199 – 204 (1999).
48. Wong J., Liu F., Bateman E. "Cloning and expression of the *Acanthamoeba castellanii* gene encoding transcription factor TFIID". *Gene* 117: 91 – 97 (1992).

Paginas web.

1. Gen Bank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, 5-Ene-09, 10:00 pm.
2. Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/whosis/en/index.html> , 11-Ene-09, 11:20 pm.
3. Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1VOK>, 22-Ene-09, 11:55 am.
4. SSA México: www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem41/pdf/edit4107, 23-Ene-09, 12:35 pm.