



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO DE ACTINA DE *Tritrichomonas foetus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

KARELIA LILIANA RANGEL RUIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **RANGEL RUIZ KARELIA LILIANA** con número de cuenta **099286457** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GÉNICO DE ACTINA DE *Tritrichomonas foetus*"**, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ
Secretario: DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Suplente: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 1° de Diciembre de 2009.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradezco el apoyo otorgado para la realización de esta tesis al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la beca CONACYT.

También, deseo agradecer el apoyo de mi comité tutorial sin el cual no habría sido posible el presente trabajo:

Dr. Roberto Hernández

Dra. Imelda López

Dr. Javier Ambrosio

Les agradezco enormemente todos los consejos y observaciones para esta tesis.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la acertada dirección del Dr. Roberto Hernández Fernández.

Agradecimientos

Deseo agradecer a mi Jurado, por todos sus comentarios para la mejora de esta tesis:

Dr. Luis Felipe Jiménez

Dr. Julio Cesar Carrero

Muy especialmente a la Dra. Ana María Cevallos, cuyo apoyo ha sido invaluable para la elaboración de esta tesis.

Durante la realización de esta tesis se recibió la acertada ayuda de las técnicas académicas:

M. en C. Juliana Herrera López

Biol. Olivia Reynoso Ducoing

Quienes tienen toda mi gratitud y mis mejores deseos.

Agradezco también a todos los miembros de los laboratorios del Dr. Roberto Hernández, la Dra. Imelda López y el Dr. Javier Ambrosio, quienes me han apoyado incondicionalmente, para ustedes mi eterna gratitud y todo mi cariño.

Para mi familia y amigos, cuyo apoyo y palabras de aliento han sido primordiales para la realización de este trabajo. Gracias a todos.

INDICE GENERAL	
INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS	9
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	10
I. RESUMEN	11
1. ABSTRACT	12
II. INTRODUCCIÓN	13
1. TRICHOMONADIDOS	13
A) GENERALIDADES	13
B) TAXONOMIA	14
2. <i>Tritrichomonas foetus</i>	17
A) CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES	17
B) GENOMA	18
C) TRICHOMONIASIS BOVINA	20
D) CITOESQUELETO	21
2. ACTINA	23
A) ACTINA EN PROTOZOARIOS	24
B) ACTINA EN TRICHOMONADIDOS	27
C) ACTINA EN <i>Tritrichomonas foetus</i>	27
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. HIPÓTESIS	30
V. OBJETIVOS	31
1. OBJETIVO GENERAL	31
2. OBJETIVOS PARTICULARES	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	32
1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE <i>T. foetus</i>	32
2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	32
3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	33
4. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO DEL GEN DE ACTINA DE <i>T. foetus</i>	33

5. SOUTHERN BLOT HIBRIDADO CON ActinaTf	35
6. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	35
7. NORTHERN BLOT CON ActinaTf	36
8. LISADOS TOTALES	37
9. WESTERN BLOT CON SUERO INMUNE ANTI-ACTINA DE <i>T. cruzi</i>	37
10. INMUNOBLOTS DE DOBLE DIMENSIÓN	38
A)OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS	38
B)ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA	39
C) ISOELECTROENFOQUE	40
D) ELECTROFORESIS 2D E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	41
VII. RESULTADOS	43
1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	43
2. FRAGMENTO ActinaTf	46
3. SOUTHERN BLOT CON ActinaTf	50
4. NORTHERN BLOT CON ActinaTf	51
5. WESTERN BLOT	52
6. INMUNOBLOTS DE DOBLE DIMENSIÓN	53
VIII. DISCUSIÓN	56
IX. CONCLUSIONES	61
X. LITERATURA CITADA	62
XI. ANEXOS	68
1. ANEXO 1	68
2. ANEXO 2	72

INDICE DE TABLAS	
Tabla 1: Taxonomía de <i>T. foetus</i> y algunos otros trichomonadidos parásitos. Tomado, traducido y modificado de: http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/trichtut.htm	16
Tabla 2: Características principales del gen, transcrito y proteína de actina en algunos protozoarios parásitos.	26
Tabla 3: Alineamiento entre las secuencias del marco abierto de lectura del gen de actina de <i>T. vaginalis</i> (Actina) y la secuencia consenso de actina de <i>T. foetus</i> (Fragmento), obtenida en este trabajo.	45
Tabla 4: Secuencias de los oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de EST's encontradas en la base de datos de <i>T. foetus</i> .	46
Tabla 5: Alineamiento entre el fragmento Actina Tf y el marco abierto de lectura del gen de actina de <i>T. vaginalis</i> .	49

INDICE DE FIGURAS	
Figura 1: Morfología de <i>T. foetus</i> . Micrografía de la morfología exterior de <i>T. foetus</i> se observa su forma aplanada, la membrana ondulante y los flagelos.	17
Figura 2: Estructura interior de <i>T. foetus</i> , cuya membrana plasmática fue removida con Tritón X-100.	22
Figura 3: División de los trichomonadidos en dos ramas dependiendo de su capacidad para cruzar con el anticuerpo Sigma A4700.	28
Figura 4: Imagen representativa de la alineación de las 32 secuencias encontradas en la base de datos de EST's de <i>T. foetus</i> , y el marco abierto de lectura de la actina de <i>T. vaginalis</i> y la secuencia consenso del gen de actina de <i>T. foetus</i> .	44
Figura 5: Ubicación de los oligonucleótidos diseñados para la técnica de PCR anidado, respecto a la secuencia consenso de actina en <i>T. foetus</i> .	46
Figura 6: Mapa lineal de los sitios de corte encontrados para el fragmento Actina <i>Tf</i>	47
Figura 7: Fotografía del gel de agarosa de la electroforesis donde se muestran las diferentes etapas de la reacción de PCR anidado.	48
Figura 8: Esquema representativo de la ubicación de la secuencia consenso de actina en <i>T. foetus</i> y el fragmento utilizado como sonda homóloga de <i>T. foetus</i> , respecto a la secuencia del marco abierto de lectura del gen de actina de <i>T. vaginalis</i>	50
Figura 9: Fotografía del corrimiento electroforético e imagen del gel de la electroforesis teñido con bromuro de etidio del Southern elaborado con las muestras de DNA de <i>T. foetus</i> y <i>T. vaginalis</i> e hibridadas con la sonda Actina <i>Tf</i> .	51
Figura 10: Fotografías de la electroforesis y del revelado del northern blot, donde para <i>T. foetus</i> , se observan dos señales de hibridación encontradas, además se observa para <i>T. vaginalis</i> , una señal de hibridación.	52
Figura 11: Imagen del western blot realizado con muestras de lisados totales de <i>T. foetus</i> .	53
Figura 12: Resultados del SDS PAGE teñido con azul de Coomassie y el western blot donde se corrieron muestras obtenidas de <i>T. foetus</i> mediante el protocolo de muestras para geles 2D.	54
Figura 13: Isoformas obtenidas mediante inmunolectroforesis 2D de proteínas de <i>T. foetus</i> .	55

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	
2D	Doble dimensión
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
EST	Express sequence tags
h	Hora
kb	Kilo bases (1,000 bases)
kDa	Kilo Daltons (1,000 Daltons)
µm	Micrómetros
min	Minutos
mM	Mili Molar
pb	Pares de bases
nt	Nucleótidos
pI	Punto isoeléctrico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos

I. RESUMEN

T. foetus es un protozoo de divergencia temprana que tiene la capacidad de parasitar el aparato sexual del ganado llegando a causar importantes pérdidas económicas. Su citoesqueleto ha sido escasamente estudiado, por lo que en el laboratorio existe un especial interés en la caracterización de actina de *T. foetus* específicamente en su sistema génico. En este trabajo, se identificó una secuencia consenso del gen de actina del trichomonadido de aproximadamente 945 pb, ensamblada a partir de alineamientos entre el marco abierto de lectura del gen de actina de *T. vaginalis* y las secuencias obtenidas en la base de datos de EST de *T. foetus* del NCBI. A partir de esta secuencia, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para realizar PCR anidado con DNA genómico y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 497 pb, el cual fue clonado y su identidad confirmada mediante secuenciación. Este fragmento fue utilizado como sonda homóloga para ser cruzada con DNA genómico un Southern blot obteniendo 4 bandas de hibridación, las que probablemente correspondan a 4 posibles genes de actina en *T. foetus*. En el caso del northern blot se obtuvieron dos bandas de hibridación de aproximadamente 1.8 y 1.5 kb, las cuales corresponden a 2 mensajeros de diferentes tamaños.

Para iniciar su caracterización a nivel de proteína, se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce la actina de *T. cruzi*. Estudios de inmunquímica demostraron el reconocimiento de dos señales de aproximadamente 43 y 37 kDa. Estudios de geles de 2D demostraron la presencia de 4 isoformas con pIs de 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 en la banda de 43 kDa. Los resultados del presente trabajo han proporcionado información preeliminar sobre actina, lo que contribuye a conocer más acerca del papel que juega en la biología de *T. foetus*.

1. ABSTRACT

T. foetus is an early divergent protozoan that is able to parasitize the sexual apparatus of cattle coming to cause significant economic losses. Its cytoskeleton has been poorly studied, we are interest in characterizing its structure with special attention in the actin system of *T. foetus*. In this work, we identified a consensus sequence of the gene encoding for actin in the trichomonad of approximately 945 bp assembled from alignments from open reading frame of the actin gene of *T. vaginalis* and the EST database of *T. foetus* of NCBI. From this sequence, we designed two pairs of primers for nested PCR with genomic DNA and obtained a fragment of approximately 497 bp, which was cloned and its identity confirmed by sequencing. This fragment was used as homologous probe to hybridized with genomic DNA in a Southern blot, observing 4 bands, which probably corresponding to 4 putative actin genes in *T. foetus*. In the case of Northern blot hybridization yielded two bands of approximately 1.8 and 1.5 kb and which correspond to 2 distinct transcripts. To initiate characterization of the protein, we used a polyclonal antibody that recognizes actin of *T. cruzi*. Immunochemical studies demonstrated the recognition of a band of approximately 43 and 37 kDa. Studies of 2D gels showed the presence of 4 isoforms with pIs of 5.2, 5.3, 5.4 and 5.5 in the band of 43 kDa. The results of this work give us preliminary information about actin, which is important to know more about its paper in the biology of *T. foetus*.

II. INTRODUCCIÓN

1. TRICHOMONADIDOS

A) GENERALIDADES

Los trichomonadidos son organismos que pueden ser encontrados en una amplia variedad de ambientes, miden aproximadamente de entre 10-25 μm de largo y de 3-12 μm de ancho, la mayoría de ellos son considerados comensales de animales domésticos y de vida libre, sin embargo, dentro del grupo se incluyen organismos con importancia médica y veterinaria (ver cuadro 1) (Felleisen, 1999; Kleina y cols., 2004). En el humano se pueden encontrar los trichomonadidos comensales *Trichomonas tenax* (boca) y *Pentatrichomonas hominis* (intestino), pero, el más importante de los parásitos humanos dentro de este grupo es *Trichomonas vaginalis* quién produce la enfermedad venérea conocida como trichomoniasis humana. Este parásito es el trichomonadido mejor estudiado (Pereira-Neves y Benchimol, 2007). *Tritrichomonas foetus* es otro parásito que ha llamado la atención debido a que causa una enfermedad venérea en el ganado similar a la producida por *T. vaginalis*. La principal diferencia entre la infección producida por estos organismos es que *T. foetus* es mucho más invasiva, ya que se puede ser encontrada en la placenta y en el feto (pulmones, ganglios linfáticos e intestino) (Rae y Crews, 2006).

Otras diferencias tales como el contraste en la infectividad en los ratones, sugieren la existencia de diferencias fundamentales entre *T. foetus* y *T. vaginalis* que deberían ser consideradas al extrapolar hipótesis entre ellas (Schwebke y Burgess, 2004).

B) TAXONOMÍA

Los trichomonadidos se encuentran clasificados dentro del Phylum Axostylata, clase Parabasalea, orden Trichomonadida (Yarlett, 2001 www.els.net) cada una de estas clasificaciones taxonómicas posee características específicas que se enlistaran continuación.

El Filum Axostylata incluye a todos los protozoos que poseen una estructura con forma de varilla compuesta de varios microtúbulos, que se encuentra acomodada a lo largo de todo el cuerpo celular tiene un papel en la movilidad celular y en la estructura de cuerpo celular, esta estructura es conocida como axostilo (Meyer-Mariante y cols., 2004). Los organismos de la clase Parabasalea contienen cuerpos parabasales, que consisten en un conjunto de cisternas aplanadas, largas y cilíndricas (dictiosomas) que se encuentran a todo lo largo del aparato Golgi, poseen una fibra, el filamento parabasal, que se ubica a todo lo largo de los cuerpos parabasales y termina en los cuerpos basales de los flagelos (cinetosomas) (Amos y Grimstone, 1968). Además los Parabasalidos no poseen mitocondrias, aunque hay evidencia de que en algún momento pudieron estar presentes en estos organismos (Kleina y cols., 2004) sin embargo presentan hidrogenosomas, con los cuales llevan a cabo el metabolismo fermentativo de los carbohidratos con el hidrógeno como aceptor de electrones (Schwebke y Burgess, 2004),

Por su parte, el orden Trichomonadida comprende a cinco familias: Trichomonadidae, Monocercomonadidae, Devescovinidae, Cochlosomatidae y Calonymphidae (Kleina y cols., 2004). La familia Trichomonadidae tiene cuatro subfamilias de las cuales tres contienen organismos que parasitan al ser humano y animales superiores (Tabla 1) y se

caracteriza por la presencia de: una membrana ondulante que es bordeada por un flagelo; el axostilo que es notorio y la costa que esta desarrollada, la cual es una estructura fibrilar, que se haya asociada con los hidrogenosomas y da sostén al flagelo recurrente (Tasca y De Carli, 2003). Así mismo, dentro de la subfamilia Tritrichomonadinae se ubica el género *Tritrichomonas* el cual se distingue por exhibir un axostilo robusto y una pelta pequeña ó ausente, esta estructura de tubulina es membranosa y tiene forma de cresta su función es reforzar la pared del canal flagelar. En este género se incluye *T. foetus* (Yarlett, 2001 www.els.net).

Tabla 1: Taxonomía de *T. foetus* y algunos otros trichomonadidos parásitos. Tomado, traducido y modificado de: <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/trichtut.htm>

Reino	Protista
Subreino	Dimastigota
Superfilum	Tetramastigota
Filum	Axostylata
Clase	Parabasalea
Orden	Trichomonadida
Familia	Trichomonadidae Monocercomonadidae Devescovichidae Calonymphidae
Subfamilia	Trichomonadinae [T] Tritrichomonadinae [Tt] Trichomitopsiinae Pentatrichomonoidinae [Pt]
Hospedero	
Perros y gatos	<i>T. canistomae</i> – Cavidad oral canina <i>T. felistomae</i> – Cavidad oral felina
Aves	<i>T. anatis</i> – Intestino del pato <i>Tt. eberthi</i> – Intestino del gallo <i>T. gallinae</i> – Tracto digestivo superior del gallo <i>T. gallinarum</i> - Intestino e hígado del gallo
Roedores	<i>Tt. caviae</i> – Intestino del cobayo <i>Tt muris</i> – Intestino <i>Tt. wenoni</i> - Intestino y colón de roedores y primates <i>Tt. minuta</i> – Intestino y colón <i>T. microti</i> - Intestino
Caballo	<i>Tt. equi</i> - Intestino y colón <i>T. equibuccalis</i> – Boca del caballo y mono
Cerdos	<i>T. buttreyi</i> - Intestino y colón <i>Tt. rotunda</i> - Intestino <i>Tt. suis</i> – Intestino y nariz del cerdo y rumiantes
Rumiantes	<i>Tt. enteris</i> – Intestino y colon de reses <i>Tt. foetus</i> – Tracto genital de reses <i>T. pavlovi</i> – Intestino grueso de reses
Primates	<i>T. tenax</i> – Boca del humano <i>T. vaginalis</i> – Tracto genitourinario del humano <i>Pt. hominis</i> – Intestino y colon del humano <i>T. macacovaginae</i> – Vagina del mono Rhesus

. Tt: *Tritrichomonas*, T: *Trichomonas* Pt: *Pentatrichomonas*

2. *Tritrichomonas foetus*

A) CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES

T. foetus es un protozoo parásito de forma generalmente piriforme ó de gota con la parte anterior redondeada y la posterior puntiaguda, su tamaño es de entre 10 a 20 μm , posee un núcleo simple y cuatro flagelos. Estos flagelos surgen desde el complejo cinetosómico en la parte anterior, tres de ellos se encuentran libres y orientados hacia la parte anterior con un tamaño de entre 11 a 17 μm , mientras que el cuarto tiene un tamaño de alrededor de 16 μm y se extiende hacia la parte posterior. *T. foetus* posee una membrana ondulante compuesta de dos a cinco ondas con un característico movimiento ondulante; también tiene un axostilo prominente, delgado y hialino (Rae y Crews, 2006; Lun y cols., 2005) (Figura 1).



Figura 1: Morfología de *T. foetus*. Micrografía de la morfología exterior de *T. foetus* se observa su forma aperada, la membrana ondulante y los flagelos (F). Tomado de Benchimol, 2005.

T. foetus tiene un ciclo de vida directo y posee un solo estadio: el trofozoíto, aunque se ha observado que cuando este organismo se encuentra en condiciones de estrés puede cambiar su morfología, tomando una forma redondeada y sésil llamada pseudoquiste debido a que no forman una pared quística, (Pereira- Neves y cols., 2003; Meyer-Mariante y cols., 2004). No está bien establecido si los pseudoquistes son formas de vida funcionales o únicamente células preapoptóticas, aunque son capaces de adherirse a células del epitelio vaginal (VEC por sus siglas en inglés). También se ha observado que son una forma reversible cuando la transformación se da de manera natural, pero sí es inducida mediante agente químicos, como la hidroxiaurea, o por ciclos de calentamiento y enfriamiento, puede volverse letal dependiendo del tiempo de exposición y/o concentración de la droga empleada (Meyer Mariante y cols., 2004).

T. foetus, frecuentemente puede ser confundida con algunos flagelados que no tienen importancia médica, como *Bodo foetus*, *Cercomonas crassicauda*, *Monocercomonas ruminantium*, *Protrichomonas ruminantium*, *Spiromonas angusta* y particularmente *Pentatrichomonas hominis* (Lun y Gajadhar, 1999).

B) GENOMA

Mediante experimentos con desnaturalización térmica se ha descubierto que el DNA de *T. foetus* tiene una temperatura media de fusión de 82° C, lo que corresponde a un contenido de GC del 31%. Aparentemente no posee secuencias altamente repetitivas, sin embargo, tiene un 46.7% de su genoma con secuencias moderadamente repetitivas mientras que las secuencias de copia única constituyen el 53.3%, lo que correspondería a 2.5×10^7 pb aproximadamente. Se calcula que la cantidad de DNA que posee *T. foetus* es

de 51 fg por célula. A la fecha no se ha detectado presencia de DNA extracromosomal en este organismo (Wang y Wang, 1985).

Se considera que *T. foetus* es diploide y Xu y colaboradores (1998) reportaron haber observado cinco pares de cromosomas durante metafase en este organismo.

Respecto a la transcripción en *T. foetus* se sabe que posee las tres RNA polimerasas (RNAPs) que se hayan presentes en eucariontes y que la resistencia de estas a las drogas que frecuentemente son utilizadas para inhibir su actividad difiere de la que se presenta en la mayoría de los eucariontes (Vanáčová y cols., 2003).

La RNAP I se inhibe a una concentración más elevada de α -amanitina de la que se presenta en vertebrados la cantidad de droga necesaria para inhibir su transcripción es de 1 mg/mL. La RNAP II tiene una alta sensibilidad a dicha droga, una concentración de 5 μ g/mL inhibe aproximadamente el 90% de su transcripción. La RNAP III posee una resistencia poco común a la α -amanitina (Vanáčová y cols., 2001). Las diferencias de sensibilidad a drogas entre las polimerasas de *T. foetus* y las de los demás eucariontes hacen interesante su estudio.

Los genes de los trichomonadidos están organizados en unidades de transcripción monocistrónicas (Vanacova y cols., 2003). En *T. vaginalis* se ha identificado un motivo conservado denominado Iniciador (Inr) que se ubica cerca del sitio de inicio de la transcripción de todos los genes que codifican para proteínas lo que sugiere que este motivo es un elemento promotor análogo a la caja TATA en eucariontes. En base a tres genes accesados, compararon la secuencia del Inr de *T. vaginalis* y *T. foetus* encontrando secuencias semejantes (Liston y Jonson, 1999).

C) TRICHOMONIASIS BOVINA

Es una enfermedad producida por *T. foetus* y es transmitida por el coito ó la inseminación artificial de toros a vacas susceptibles. En el toro, la infección generalmente persiste por años sin sintomatología aparente (Lun y cols., 2005).

Los parásitos generalmente se alojan en la cavidad del prepucio aunque ocasionalmente pueden ser encontrados en partes más profundas del sistema urogenital. En vacas el parásito invade y coloniza la vagina, el útero y el oviducto (Felleisen, 1999; Lucas y cols., 2008). Los síntomas clínicos varían desde vaginitis media ó uretritis hasta una inflamación a través de todo el tracto reproductivo; durante la preñez las vacas pueden sufrir aborto e infertilidad permanente lo que es causa de una significativa pérdida económica para la industria de la ganadería (Vieira y cols., 2008; Lun y Gajadhar, 1999; Schwebke y Burgess, 2004).

Los efectos citotóxicos producidos por *T. foetus* observados de manera experimental aparecen a partir de las 3 h después de la exposición al parásito con una completa destrucción de las células después de 24 h (Singh y cols., 1999).

Algunos estudios sugieren que *T. foetus* produce daño al epitelio a través de: la adhesión del parásito a las células del epitelio vaginal bovino (BVEC, por sus siglas en inglés) y las toxinas que este libera al medio (da Silva, y cols., 1996; Felleisen, 1999; Singh y cols., 1999).

La adhesión de *T. foetus* a células epiteliales del sistema reproductivo de los bovinos se lleva inicialmente a través de sus flagelos recurrente y anteriores (da Silva y cols., 1996), posteriormente involucran diferentes tipos de moléculas, tales como: la adhesina Tf190, los receptores para proteínas de la matriz extracelular, las lectinas del parásito y los

carbohidratos del hospedero (Felleisen, 1999). Se ha reportado que la capacidad de adhesión de este organismo a su hospedero esta mediada por el reconocimiento específico de la superficie de las células del organismo a parasitar (De Carli y cols., 2004).

Algunos autores creen que la patogenicidad de *T. foetus* es posible únicamente cuando hay contacto entre este parásito y las células del hospedero (Meyer-Mariante y cols., 2004). Se cree que la formación de pseudópodos durante el estadio trofozoíto en *T. foetus* puede representar un mecanismo muy eficiente para el contacto entre el parásito y las células (Felleisen, 1999; De Carli y cols., 2004).

D) CITOESQUELETO

La adquisición de un citoesqueleto fue un evento relevante en la evolución de las células eucariotas, proveyéndolas con cierto grado de organización celular, coordinación y comunicación (Viera y cols., 2008). En el caso de los trichomonadidos su citoesqueleto es complejo y poco estudiado. Se caracteriza por la presencia de estructuras estables tales como: el axostilo, el pelta y la costa (Madeiro da Costa y cols., 2004).

Otras estructuras que también componen el citoesqueleto de *T. foetus* son las siguientes:

- Complejo cinetosómico (Cuerpos basales): compuesto por nueve tripletes de microtúbulos y da origen a los axonemas flagelares.
- Atractóforo (MTOC, Microtubule Organizing Center): Formado por material electrodenso encontrado en la base de la costa y da origen al huso acromático.
- Axonemas: Estructura microtubular que posee un arreglo 9+2; *T. foetus* tiene cuatro y sirve para el movimiento celular y tiene una participación en la división celular.

- Filamentos parabasales: Estructuras periódicas que se encuentran después del aparato de Golgi y cuya función probable es que sirven de soporte para el aparato de Golgi.
- Filamentos Sigmoidales: Filamentos curvados que conectan los cuerpos basales con el pelta, se cree que pueda estar compuesto de centrina (Benchimol, 2005).

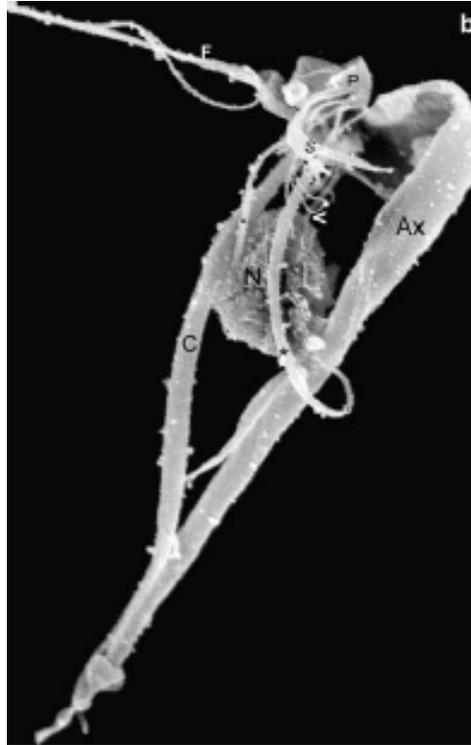


Figura 2: Estructura interior de *T. foetus*, cuya membrana plasmática fue removida con Tritón X-100, se puede apreciar el axostilo (Ax), el núcleo (N), los flagelos (F), el pelta (P), la costa (C), los filamentos sigmoidales (S) y los filamentos parabasales (*). Tomado de Benchimol, 2005.

En un estudio realizado por Madeiro da Costa y cols. (2004), se observó el efecto de algunos fármacos que interaccionan con el citoesqueleto, como taxol, colchicina y nocodazol. El efecto morfológico inmediato con los tres tipos de fármacos fue la pérdida de la típica forma celular y alteraciones en la motilidad celular, posteriormente, el axostilo y la pelta se arquearon y se formó un pseudoquiste. Únicamente el taxol y el nocodazol, indujeron la formación de células multinucleadas. Este estudio sugiere que hay al menos

dos clases de microtúbulos dentro del citoesqueleto de los trichomonadidos y son definidos por su sensibilidad a los químicos: los que se encuentran en el aparato flagelar y los que se hallan en el sistema pelta-axostilar (Madeiro da Costa y cols., 2004).

Además se ha observado mediante técnicas de microscopía de transmisión electrónica, microscopia electrónica de barrido (FESEM, por sus siglas en inglés) y la técnica llamada “cell sandwich”, que tanto en el citoplasma como embebidas dentro del núcleo se encuentran estructuras fibrilares de diferentes tamaños, que son componentes importantes del citoesqueleto de este organismo (Benchimol, 2005).

2. ACTINA

Es una de las proteínas más abundantes y conservadas en las células eucariotas (Pollard y Borisy, 2003) ubicándose tanto en el citoplasma como en el núcleo; hasta el momento, solo se han identificado dos estados de actina: globular o G- actina y filamentosa ó F- actina, y ambas coexisten en equilibrio en la célula. *In vitro*, G- actina polimeriza espontáneamente formando filamentos, la formación de filamentos depende de la concentración crítica (Cc) de actina en la célula, así mismo se ha observado que *in vivo* la polimerización y despolimerización de actina está fuertemente regulada por una amplia variedad de proteínas de unión a actina (Hofmann y de Lanerolle, 2006).

A esta proteína se le han conferido características funcionales en el núcleo tales como: cofactor de las ARN polimerasas (RNAP) y en la remodelación de los cromosomas (Hofmann y de Lanerolle, 2006). A nivel citoplasmático, se cree que todas sus funciones están relacionadas con la formación de filamentos como: la movilidad celular, citocinesis,

transporte intracelular (en células no musculares), contracción y generación de fuerza en células musculares (Reisler, 1993).

A) ACTINA EN PROTOZOARIOS

En eucariontes inferiores, la actina se encuentra involucrada en una amplia variedad de procesos incluyendo la estructura del citoesqueleto, la motilidad celular, movilidad de la superficie celular, transporte intracelular, corrientes citoplasmáticas, citocinesis, endocitosis y exocitosis (Hightower y Meaguer, 1986).

Como se puede observar en la Tabla 2, el tamaño del gen que codifica para actina en las diferentes especies de protozoarios parásitos es similar y refleja la conservación de actina, ya que va de 1,122 nucleótidos (nt) en *Dictyostelium discoideum* hasta 1,254 nt en *Plasmodium falciparum* (Kim y cols, 1992; Wesseling y cols., 1989).

Se conoce que actina es generalmente codificada por una familia multigénica, aunque el tamaño de las familias es variable dependiendo de cada especie (Hightower y Meaguer, 1986). En este caso, para seis de los organismos descritos en la Tabla 2, su gen de actina es codificado por una familia multigénica, ya sea presentando isoformas ó por presencia de diferentes locus; sin embargo, en el caso de *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* y *Giardia lamblia* su actina se encuentra codificada solamente por un gen (Kim y cols, 1992; Dobrowolsky y cols., 1997; Drouin y cols., 1995).

En la mayoría de los casos referidos en el Tabla 2 la actina de los organismos se ha reportado como formadora de filamentos. Sin embargo, para *G. lamblia* (Drouin y cols., 1995), no se ha reportado que actina forme filamentos, así que la función que se le atribuye a actina en estos organismos es la locomoción y/o endocitosis.

Como podemos observar en el Tabla 2 el tamaño de la proteínas de actina deducido a partir de la secuencia de los genes de actina varía entre 41.7 y 44 kDa en *P. tetraurelia* y *T. gondii*, respectivamente con una media de 42 kDa (Sehring y cols., 2007; Dobrowolsky y cols., 1997).

Tabla 2: Características principales del gen, transcrito y proteína de actina en algunos protozoarios parásitos.

ORGANISMO	<i>Trichomonas vaginalis</i> ¹	<i>Cryptosporidium parvum</i> ²	<i>Dictyostelium discoideum</i> ³	<i>Trypanosoma cruzi</i> ⁴	<i>Toxoplasma gondii</i> ⁵	<i>Plasmodium falciparum</i> ⁶	<i>Entamoeba histolytica</i> ⁷	<i>Giardia lamblia</i> ⁸	<i>Paramecium tetraurelia</i> ⁹
Tamaño	1128	1131	1122	1128	1131	1254	1128	1128	1113-1185
Num de copias	Mínimo 9	1	20	3	1	2	4	1	6
Aminoácidos (aa)	376	376	376-380	376	376	418 y 376 (Act I)	376	376	375-376
Intrones	No	No	No	Si 466 pb	Si de 420pb	Si (Act II)	No	No	Si (2)
Familias multigénicas	Si más de 5 isoformas	No	Si	Si (3 genes: 2 en tándem)	No	Si (2 isoformas)	Si (7 genes)	No	Si (1-10 isoformas)
Formación de filamentos	Si	Si	Si	NR	Si dinámicos	Si	Si	NR	Si Cortos
Función	Adhesión	Locomoción	Locomoción (pseudópodos)	NR	Locomoción	NR	Locomoción (Trofozoíto)	NR	NR
Tamaño del mensajero (kb)	1.2	1.77	1.11	1.6	1.59	2.5 (asexual) 1.9 (sexual) (Act I)	1.5	NR	1.4
Peso de la proteína (kDa)	41.8*	42.106*	42	42	44	NR y 42	42.036*	42	41.4-42.4*

NR: No reportados. 1: Bricheux y Brugerolle, 1997; 2: Kim y cols., 1992; 3: Vanderkerckhove y Weber, 1980 y Romans y cols., 1985; 4: Cevallos y cols., 2003 y Viera y cols., 2008; 5: Dobrowolsky y cols., 1997 y Drouin y cols., 1995; 6: Wesseling y cols., 1989; 7: Edman y cols., 1987; 9: Sehring y cols., 2007.*: Deducidos a partir de su secuencia de aminoácidos.

B) ACTINA EN TRICHOMONADIDOS

La presencia y función de actina esta pobremente estudiada en la mayoría de los trichomonadidos. Sin embargo, ha sido bien caracterizada en *T. vaginalis* y se sabe que esta codificada por al menos 9 miembros y 5 isoformas. El gen de actina posee un marco abierto de lectura de 1,128 pb su transcrito tiene un tamaño de aproximadamente 1.3 kb (Espinosa y cols, 2002).

La proteína que codifica es de 376 aa con un tamaño esperado de 41.8 kDa, posee tres isoformas con pIs de 5.05 a 5.23 (Cuervo y cols., 2008), tiene una baja afinidad por la faloidina e inhibe la actividad de DNAsa I (Cappuccinelli y cols., 1986; Brugerolle y cols., 1996; Bricheux y Brugerolle, 1997).

En dos estudios independientes al hacer tinciones con faloidina e inmunolocalizado con un anticuerpo IgG anti-actina de amiba a células fagocíticas de *T. vaginalis*, se encontró que actina se ubicaba por debajo de la membrana celular, especialmente en los pseudópodos y alrededor de las partículas fagocitadas (Pereira-Neves y Benchimol, 2007) sin embargo, en células de *T. vaginalis* en reposo teñidas también con faloidina e inmuloalizando con un anticuerpo comercial anti-actina, la actina se halló dispersa a través de toda la célula (Brugerolle y cols., 1996).

C) ACTINA EN *Tritrichomonas foetus*

En un estudio realizado por Benchimol y Souza (1987) se encontró una reactividad difusa a través de todo el cuerpo celular al incubar *T. foetus* con anticuerpos anti-actina además, se afirma que probablemente actina se encuentra asociada con miosina.

Por su parte, Brugerolle y colaboradores (1996) reportaron que al realizar un estudio en *T. vaginalis* y *T. foetus* de inmunoquímica con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la parte C-terminal de actina de conejo, hubo un reconocimiento diferencial entre las actinas de ambas especies. Para *T. vaginalis* se encontró una banda de aproximadamente 43 kDa, mientras para *T. foetus* no se obtuvo reactividad, por lo cual se probó un segundo anticuerpo anti-actina, con el cual sí hubo reconocimiento en ambas especies. Con base a este reconocimiento diferencial se propuso clasificar a los trichomonadidos en dos ramas dependiendo de su reconocimiento con el primer anticuerpo (Fig. 3): la rama Tritrichomonadida, donde se encuentran organismos tales como *T. foetus*, *T. augusta* y *Monocercomonas* sp. y la rama Trichomonadida, donde se colocaron los organismos que sí cruzaban con el primer anticuerpo, como: *T. vaginalis*, *Tetratrichomonas gallinarum*, *Trichomitus batrachorum* e *Hypotrichomonas acosta*.

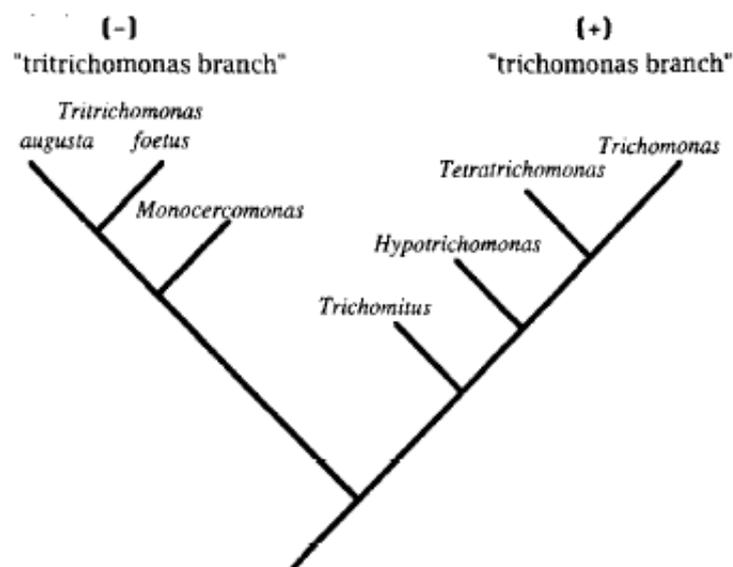


Figura 3: División de los trichomonadidos en dos ramas dependiendo de su capacidad para cruzar con el anticuerpo Sigma A4700, en + y - se indica sí cruzan ó no. Tomado de Brugerolle y cols., 1996.

III. JUSTIFICACIÓN

Considerando la importancia veterinaria y económica de la enfermedad producida por *T. foetus* y ya que algunos de los principales mecanismos de patogenicidad que posee son el contacto inicial entre el parásito y las células del hospedero, la adhesión y la motilidad, y que estos juegan un importante papel en la interacción huésped-parásito (De Carli y cols., 2004; Meyer-Mariante y cols., 2004), hemos decidido aproximarnos al problema con la caracterización del sistema génico de actina en este protozoo, con la finalidad de analizar el posible papel de actina en tales procesos (Benchimol y Souza, 1987 y Singh cols., 1999).

IV. HIPÓTESIS

Dado que en eucariontes superiores actina tiene importantes funciones, en este estudio hemos decidido comenzar con la caracterización y estudio de actina en *T. foetus*, ya que probablemente tenga funciones primordiales en la fisiología de este parásito.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el sistema génico de actina de *Tritrichomonas foetus* y caracterizar su expresión a nivel de RNA mensajero y de proteína.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar las secuencias que codifiquen para actina en *T. foetus*.
2. Obtener una sonda homóloga al gen de actina de *T. foetus*.
3. Determinar si actina en *T. foetus* está codificada por una familia génica.
4. Determinar la presencia y el tamaño del transcrito del gen de actina en *T. foetus*.
5. Determinar la presencia y el tamaño de actina en lisados totales de proteínas de *T. foetus*.
6. Determinar el número de isoformas y el pI de actina en *T. foetus*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE *T. foetus*

El aislado de *T. foetus* utilizado para la realización de todos los experimentos fue proporcionada por la Dra. Imelda López. El subcultivo se realizó diariamente con medio TYM (de las siglas en inglés Trypticase Yeast extract Maltose), suplementado con suero de caballo 10%, incubándolo a 37° C (Diamond, 1957).

2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Las células de un cultivo de 50 mL de *T. foetus* con una densidad de entre 1.6 a 2.5 x 10⁶ células por mL fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 min a 4° C (centrifuga Allegra 21 R de Beckman Coulte, rotor horizontal S4180). El botón celular fue lavado y resuspendido en 20 mL de PBS frío (pH 7.4). Después de ser nuevamente centrifugadas (3,000 rpm durante 10 min. a 4° C) las células, se resuspendieron en 4 mL de PBS (pH 7.4), la suspensión celular se dividió en cuatro tubos eppendorf de 1.5 mL (1 mL por tubo) y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad por 1 min (microcentrifuga Eppendorf 5415D). Al precipitado se le agregaron 300 µl de buffer de extracción (Ver Anexo) y 300 µl de fenol. Después de ser emulsionado y centrifugado (3 min a máxima velocidad), el DNA recuperado de la fase acuosa (superior) fue extraído nuevamente con fenol y cloroformo (1:1) y se centrifugó (3 min a máxima velocidad). El DNA se extrajo con cloroformo (500 µl), y se dejó precipitando toda la noche a -20° C con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M. El DNA fue posteriormente recuperado por centrifugación (15 min a máxima

velocidad), el precipitado resultante fue lavado con etanol al 70% frío y se resuspendió en 50 µL de TE (Ver Anexo) y se incubó con 0.5 µL de RNAsa 2 mg/mL a 37° C durante 30 min. Se almacenó a -20° C hasta su uso (Espinosa y cols., 2001).

3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Se utilizó la secuencia para el marco de lectura abierto del gen de actina en *T. vaginalis* (AF237734) accesada en la página electrónica del National Centre of Biotechnology Information (NCBI) para realizar una búsqueda de secuencias semejantes en el banco de datos de “*expressed sequence tags*” (EST) de *T. foetus* (NCBI) y así poder obtener secuencias que pudieran corresponder al marco abierto de lectura del gen de actina en *T. foetus*. Una vez obtenidas estas secuencias se alinearon y se formó una secuencia consenso del gen de actina en *T. foetus*, la cual se comparó con la secuencia accesada para *T. vaginalis* y de esta manera obtener el grado de identidad entre ellas con el programa ClustalW 2.0 (Larkin y cols., 2007).

4. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO DEL GEN DE ACTINA DE *T. foetus*

A partir de la región más conservada de las secuencias de EST’s alineadas previamente se diseñaron dos pares de oligonucleótidos (KRF1 y KRR2, y KRAF3 y KRAR4) para llevar a cabo amplificación génica por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (PCR anidado), con la finalidad de obtener un fragmento de DNA de un(os) gen(es) que codifiquen para actina y así conseguir una sonda homóloga al gen de actina en *T. foetus*.

Para las dos rondas del PCR se utilizaron los siguientes programas de temperaturas: 30 seg a 94° C, 30 seg a 56° C, 30 seg a 72° C durante 29 ciclos, utilizando *Taq* polimerasa (Invitrogen).

Una vez obtenido el fragmento del PCR anidado, se ligó al vector pGEM (Promega) con 2X Rapid Ligation Buffer (PROMEGA). Con esta construcción se transformaron bacterias *Escherichia coli* JM109 mediante choque térmico, a las colonias obtenidas se les extrajo su DNA plasmídico empleando QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen). Como una manera adicional de comprobar que la construcción poseyera un fragmento compatible con la secuencia consenso derivada del alineamiento de los EST`s, se obtuvo un mapa lineal de sitios de restricción para el fragmento con el programa DNA man 2.0. Una vez elegidas las enzimas a utilizar (*Bgl* II y *Hind* I II) se digirió el DNA plasmídico obtenido de la construcción. De igual forma, este DNA plasmídico fue digerido con *Eco* RI ya que el fragmento obtenido del PCR anidado fue liberado del vector mediante dicha digestión. Posteriormente, se confirmó la identidad del fragmento por secuenciación (secuenciador automático ABI Prism 310). Una vez comprobada la identidad del fragmento obtenido del PCR anidado, se nombró Actina *Tf* y se alineó con la secuencia del gen de actina de *T. vaginalis* para conocer el grado de identidad entre ellas con el programa ClustalW 2.0.

El fragmento Actina *Tf* se utilizó como sonda para hibridarla con DNA genómico y RNA total de *T. foetus*. Fue marcado radioactivamente con α dCTP (Invitrogen) mediante el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham) para hibridarlo con las membranas obtenidas del Southern y northern blot.

5. SOUTHERN BLOT HIBRIDADO CON Actina*Tf*

Una vez obtenida la sonda Actina *Tf*, se realizó un Southern con diferentes concentraciones de DNA de *T. foetus* (1 µg, 5 µg y 10µg) y *T. vaginalis* (1 µg), digeridas con *Eco* RI durante 15 h a 37° C. El DNA resultante se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M durante toda la noche a -20° C y se resuspendió en un volumen final de 15 µl con TE y buffer de carga. Luego en un gel de agarosa 0.8% a 65 V (cámara Horizon 11-14 de Gibco BRL) se corrió una electroforesis con estas muestras y se utilizó como marcador DNA de *Lambda* digerido con *Hind* III. Una vez obtenido el gel se lavó con solución despurinizante (2 de 15 min, ver Anexo 1), solución desnaturalizante (2 de 30 min, ver Anexo 1) y solución neutralizante (2 de 45 min, ver Anexo 1). El DNA fue transferido mediante capilaridad a una membrana de nailón con SSC 20X, durante 20 h a temperatura ambiente (sistema de transferencia Blot Transfer System 11-14 de Gibco BRL). Posteriormente, la membrana se prehibridó por 2 h a 37° C y se hibridó con la sonda Actina *Tf*, bajo el siguiente protocolo: hibridación, 37° C durante 20 h, 2 lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente en presencia de una solución de SDS 0.5% y SSC 2X exponiéndose durante 24 h. La digitalización de la imagen se hizo con un fotodocumentador FX (Espinosa y cols., 2001).

6. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

A partir de cultivos con una densidad entre 1.6 y 2.1×10^6 células/mL se tomaron alícuotas de 8.5×10^6 células para realizar la extracción de RNA total.

Las células se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4° C (centrifuga modelo 14 K de BioRad) y el botón obtenido se resuspendió en PBS-DEPC (Dietil pirocarbonato, ver Anexo 1), la mezcla se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, y se centrifugó a

máxima velocidad durante 1 min a 4° C. El botón resultante se resuspendió en TRIZOL (Invitrogen) y mediante pipeteo las células fueron lisadas. El lisado celular se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se extrajo el RNA por adición de 200 µL de cloroformo, se mezcló e incubó durante 2 min a temperatura ambiente, la muestra nuevamente se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min a 4° C (microcentrifuga Eppendorf 5415D). En seguida, la fase acuosa observada se transfirió a un tubo que contuviera 500 µL de alcohol isopropílico, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a 4° C. El botón se lavó con 1 mL de etanol al 75% en agua DEPC (ver Anexo 1), se mezcló y centrifugó a 7,000 rpm durante 5 min a 4° C. El botón se dejó secar durante 5 min y se resuspendió en 10 µL de agua DEPC. Finalmente se guardó a -70° C (Espinosa y cols., 2001).

7. NORTHERN BLOT CON *ActinaTf*

Se corrió un northern blot con RNA total de *T. foetus* teniendo como control RNA total de *T. vaginalis*. Para este ensayo se utilizó como sonda al fragmento *Actina Tf*.

Se preparó un gel desnaturalizante (formaldehído) con agarosa al 1 % y las muestras se corrieron a 80 V (cámara Horizon 11-14 de Gibco BRL) con buffer de electroforesis MOPS/EDTA 1X (ver Anexo 1). Una vez completada la electroforesis, se realizó la transferencia mediante capilaridad en el sistema de transferencia Blot Transfer System 11-14 de Gibco BRL durante 20 h a temperatura ambiente con SSC 10X elaborado con agua DEPC. La hibridación se llevó a cabo durante 20 h a 37° C, con la sonda *Actina Tf*. Se lavó 3 veces durante 30 min a 37° C con SDS 0.5% y SSC 0.2X (Espinosa y cols., 2001).

8. LISADOS TOTALES

A un cultivo de 6 mL de *T. foetus* con una densidad entre los 1.6 y 2.1×10^6 células por mL se le agregó 20 mL de PBS pH 7.4 y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15min (centrifuga Allegra 21 R de Beckman Coulte, rotor horizontal S4180). El botón resultante se lavó con 20 mL de PBS pH 7.4 y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 min. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS pH 7.4 y se traspasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 2,400 rpm por 6 min en la centrifuga 5415 D de Eppendorf y el botón resultante se resuspendió en la cantidad necesaria de buffer de carga para una lisis mediante SDS (ver Anexo 1) obteniendo una densidad final de 3×10^4 células / mL (Segura- Kato, 2008).

9. WESTERN BLOT CON SUERO INMUNE ANTI-ACTINA DE *T. cruzi*

Con lisados totales de *T. foetus* (descritos arriba), se corrió un SDS PAGE 10 % (ver Anexo) a 65 v, se emplearon como control lisados totales de *T. vaginalis* y de *T. cruzi* (obtenidos con el protocolo anterior) en la cámara Mini Protean 3 (Bio-Rad) y la fuente de poder Power Pac 1000 (Bio-Rad). Luego de la electroforesis las proteínas se transfirieron mediante electrotransferencia húmeda a una membrana de nailón, para la cual se utilizó buffer de Transferencia 1X (ver Anexo 1) en una cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 150 mA por 1 h a 4° C con agitación constante. Luego la membrana se recuperó y bloqueó con suero de cabra (Normal Goat Serum, NGS) al 5 % en PBS pH 7.4 durante toda la noche a 4° C; posteriormente, se incubó en una dilución 1:8,000 de suero inmune anti-actina 1 de *T. cruzi* (obsequiado por la Dra. Cevallos). La membrana se lavó 3 veces por 10 min con PBS- Tween 0.05% en agitación constante a temperatura ambiente. Luego, la membrana se incubó con el

anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano; PIERCE), en una dilución 1:50,000 por 30 min a temperatura ambiente, y se lavó bajo el mismo procedimiento descrito arriba.

El revelado de la reacción enzimática se llevó a cabo mediante una reacción quimioluminiscente, de acuerdo a lo que establece el fabricante: se agregó una mezcla 1:1 de las soluciones del kit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE) se incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente las membranas se expusieron a placas radiográficas Hyperfilm ECL (Amersham) durante 10 seg, 30 seg y 1 min, luego de transcurridos los tiempos de exposición las placas se revelaron y fijaron (Segura-Kato, 2008).

10. INMUNOBLOTS DE DOBLE DIMENSIÓN (Modificado de Ambrosio y cols., 2003)

A) OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

Esta técnica se realizó en el laboratorio del Dr. Javier Ambrosio y consistió en la extracción de proteínas bajo condiciones óptimas para someterlas a un corrimiento de gel 2D. El protocolo de extracción fue diferente al utilizado para la obtención de lisados totales, que se utilizó para el western blot anterior, ya que las muestras para 2D tienen requerimientos especiales.

A un cultivo con una densidad de 1.35×10^6 células por mL (74.25×10^6 células totales) se le centrifugó a 4,000 rpm durante 15 min (centrifuga Allegra 21 R Beckman Coulter). El botón obtenido se resuspendió en 20 mL de PBS pH 7.4 y se centrifugó dos veces más a 4,000 rpm durante 15 min. El botón se resuspendió en 1 mL de PBS pH 7.4

y se centrifugó nuevamente dos veces más a 2,400 rpm por 6 min (Centrifuga Eppendorf 5424). Posteriormente se agregaron 150 μ l de Solución A (ver Anexo 1) y la suspensión celular se sonicó (sonicador Vibracell 75185) a 30% de amplitud durante 30 seg 3 veces con descansos de 1 min en cámara de hielo. Después, se adicionaron 1 mL de solución para precipitar proteínas (ver Anexo 1), se sonicó por 10 seg al 30% de amplitud. Luego, la muestra se incubó a -20° C durante 2h y al precipitado formado se le añadió 1 mL de DTT 20 mM. La mezcla se sonicó a 30% de amplitud durante 10 seg y la mezcla resultante se centrifugó a 10 krpm durante 15 min. El botón obtenido se resuspendió en 300 μ L de Tris 5mM. La concentración de las proteínas fue cuantificada mediante la técnica modificada de Lowry con el kit Pc Protein-Assay (Bio-Rad) y se guardó a -20° C, hasta su uso.

B) ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA

Se realizó una separación electroforética en gel de poliacrilamida al 12% en una cámara Mini Protean 3 (Bio-Rad) con 30 y 50 μ g de la proteína de *T. foetus* resuspendida en buffer de Laemmli. Como control positivo se utilizó 30 μ g de actina de músculo de pollo comercial (Worthington).

Las condiciones de separación se llevarón a cabo a 125 V a 4° C. Luego las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (Polivinilidenofluoruro) mediante una transferencia semiseca a 85 V por 35 min a temperatura ambiente en un equipo Dry strip Trans Blot SD Semi-dry Transfer (Bio-Rad).

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, esta se bloqueó durante 30 min a temperatura ambiente en BSA 0.25%-PBS -Tween 0.15% (ver Anexo). Una vez

transcurrido el tiempo de incubación, la membrana fue lavada 5 veces a temperatura ambiente bajo agitación constante durante 5 min con PBS.

Después, la membrana se incubó con suero inmune anti-actina 1 de *T. cruzi* en una dilución 1: 8,000 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.15% durante 10 min a temperatura ambiente en agitación constante. Una vez realizados los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario ZyMax Goat anti-Rabbit IgG HRP Conjugate (Zymed) a una dilución 1:50,000 durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron 15 lavados de 5 min alternando PBS 1X y TBS-Tween 0.15%, y 10 lavados de 5 min con PBS. Finalmente para el revelado la membrana se utilizó el Kit Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate y se expuso a placas radiográficas X-Omat AR Film XAR-5 (Kodak) durante 1, 3, 15 y 30 min, se reveló y fijó.

C) ISOELECTROENFOQUE

Para esta técnica se utilizaron tiras Immobilized pH gradient (IPG; Amersham) de 7 cm de pH lineal 4-7. Inicialmente las tiras se hidrataron durante 17 h a temperatura ambiente con 108.3 μ L de solución de rehidratación (ver Anexo) y 50 μ g de proteínas de *T. foetus*. Una vez rehidratadas, las tiras se colocaron en un equipo Protean IEF Cell (Biorad) con cambios cada hora de los puentes de papel Whatman colocados en el ánodo y el cátodo una vez comenzado el programa de corrida de voltaje del equipo. El tiempo y voltaje utilizados se programaron de la forma siguiente:

1. 250 V x 20 min con pendiente lineal
2. 4,000 V x 2 h con pendiente lineal
3. 4,000 V con pendiente rápida hasta 10,000 V/h

Los datos obtenidos se registraron cada 5 min por el equipo DPU 414 Thermal Printer (SONY). Una vez terminada la corrida, las tiras IPG se guardaron a -70°C hasta su uso.

D) ELECTROFORESIS 2D E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Las tiras IPG se descongelaron a temperatura ambiente y se sometieron a 2 lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente bajo agitación constante. En el primer lavado se utilizó una solución de equilibrio (ver Anexo 1) y DTT, mientras que para el segundo se utilizó solución de equilibrio y Iodoacetamida. Luego, las tiras IPG se colocaron en geles comerciales NuPAGE (Biorad) de 1 mm y el moldeado de los geles se hizo con agarosa 0.5%/0.002% de azul de bromofenol. Se añadieron 5 μL de los marcadores moleculares Precision Plus Protein Western C (Biorad).

Los geles se procesaron en una cámara XCell Sure Lock (Invitrogen), en presencia del buffer Nu PAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen) a 200 V a 4°C .

La transferencia se realizó en membranas de PVDF con el módulo interno XCell Blot module (Invitrogen) y con el buffer Nu PAGE Transfer Buffer 20X (Invitrogen) complementado con 0.01% de antioxidante. La transferencia se llevó a cabo a 30 V por 1 h a 4°C .

El bloqueo de las membranas se realizó con PBS- Tween 0.1% BSA 0.25% durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primario (suero inmune anti-actina 1 de *T. cruzi*) y secundario ZyMax Goat anti-Rabbit IgG HRP Conjugate (Zymed). Para ello una membrana (A) se incubó con el anticuerpo primario a una dilución 1: 8,000 y los dos restantes (B y C) a una dilución 1: 5000 durante 1 h a temperatura ambiente, luego las membranas se lavaron 5 veces con

PBS-Tween 0.15% durante 5 min a temperatura ambiente bajo agitación constante. Una vez realizados los lavados se incubaron con el anticuerpo secundario: membrana A en una dilución 1:50,000 y las membranas B y C en una dilución 1:30,000. También se agregó una dilución 1:10,000 del anticuerpo para marcadores moleculares Precision Streptactin HRP Conjugate (Biorad), durante 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas 15 veces por 5 min de forma alternada con PBS y TBS-Tween 0.15% y 10 lavados de 5 min con PBS.

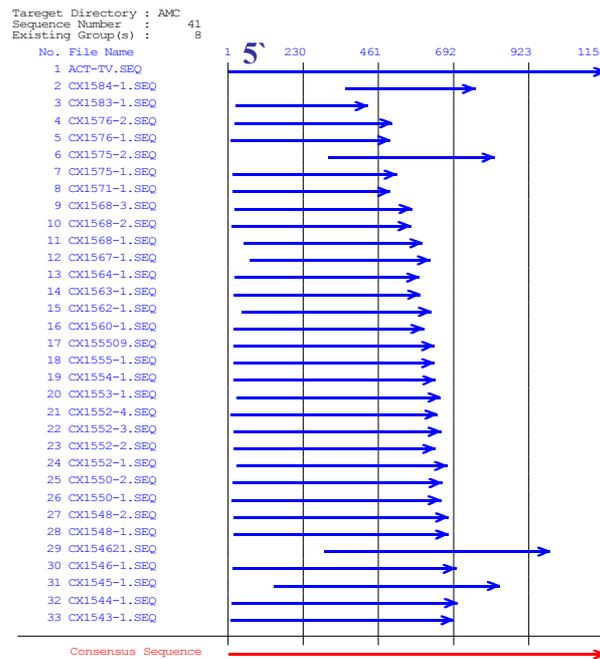
Finalmente las placas se revelaron por quimioluminiscencia como se describió anteriormente durante 1, 3, 15 y 30 min, se revelaron y se fijaron. Las imágenes se digitalizaron y analizaron en un fotodocumentador Chemidoc XRS (Bio-Rad) con el programa PD Quest versión 7.4.

VII. RESULTADOS

1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Para lograr obtener una sonda homóloga al gen de actina de *T. foetus* que pudiera ser utilizada para su caracterización fue necesario realizar varios análisis bioinformáticos. Al alinear la secuencia del gen de actina de *T. vaginalis* y la base de datos de EST's de *T. foetus* del NCBI se identificaron 32 secuencias, las cuales codifican para la parte 5', aunque no poseen el codón de inicio, mientras, que la parte 3' se encuentra incompleta (Figura 4).

La mayor información se obtiene de la región correspondiente a los nucleótidos 120 a 710. Dentro de esta región se encuentran 5 cambios nucleotídicos en la posición 166 hay un cambio de A por T, en el 202 de T por C, en el 220 de T por C, en el 347 de C por T y en la 524 de G por A sugiriendo la presencia de al menos 4 copias del gen (Ver Anexo 2). De este alineamiento se obtuvo una secuencia consenso del gen de actina de *T. foetus* con un tamaño de 942 pb (Figura 4).



3'

Concensus

Figura 4: Imagen representativa de la alineación de las 32 secuencias encontradas en la base de datos de EST's de *T. foetus* (NCBI), y el marco abierto de lectura de la actina de *T. vaginalis* (AF237734) y la secuencia consenso del gen de actina de *T. foetus*. ACT-TV. SEQ: Secuencia del marco abierto de lectura del gen de actina en *T. vaginalis*

Tabla 3: Alineamiento entre las secuencias del marco abierto de lectura del gen de actina de *T. vaginalis* (Actina) y la secuencia consenso de actina de *T. foetus* (Fragmento), obtenida en este trabajo.

El alineamiento se llevó a cabo con el programa ClustalW 2, *: Nucleótidos conservados, -: Espacios vacíos donde una de las secuencias carece de nucleótidos por alinear; los números indican la extensión del fragmento alineado.

2. FRAGMENTO *ActinaTf*

A partir de la región correspondiente a los nucleótidos 10 a 615 de las 32 secuencias de EST's obtenidas anteriormente, se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos para amplificar secuencias homólogas al gen de actina de *T. foetus* usando DNA genómico como templado. Las secuencias de estos oligonucleótidos se pueden apreciar en el Tabla

4.

KRF1	CGATAATGGTTCGGTATGTG
KRR2	GTGTAACCACGTTTCGTTGAGG
KRAF3	CCACGCTCCGTTTTCCATC
KRAR4	GATCTTTTGGAGCCAAGCTG

Tabla 4: Secuencias de los oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de EST's encontradas en la base de datos de *T. foetus*.

El diseño de amplificación contempló un PCR anidado donde un par de oligonucleótidos externos (KRF1 y KRR2) durante la primera corrida de PCR amplificará un fragmento de 526 pb (Figura 5, fragmento verde) y utilizando este amplicón como templado se realizó una segunda corrida de PCR con los oligonucleótidos anidados (KRAF3 y KRAR4), donde se amplificará un fragmento de 497 pb (Figura 5, fragmento rosa).

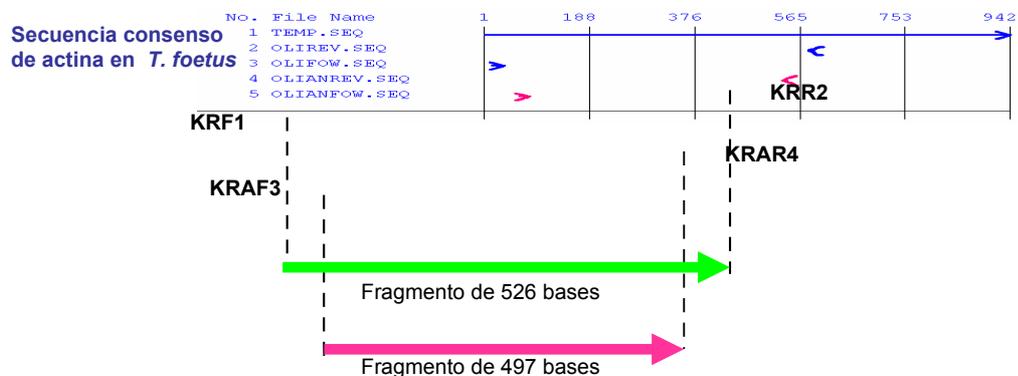


Figura 5: Ubicación de los oligonucleótidos diseñados para la técnica de PCR anidado, respecto a la secuencia consenso de actina en *T. foetus*. En verde y rosa, se muestran los tamaños esperados de los fragmentos en cada una de las dos amplificaciones de la técnica. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la tabla 4.

Utilizando DNA genómico como templado se realizó la primera ronda de PCR en la que aparentemente no hubo amplificación (Figura 7, carril 2, *); sin embargo, para el PCR anidado (Carril 3) se encontró la amplificación de un fragmento con un tamaño aproximado al deseado (497pb). Este fragmento fue clonado en pGEM, obteniendo así una construcción de 3,513 pb (ver figura 7, carril 4).

Para comprobar que la construcción contenía el fragmento buscado se realizaron digestiones con enzimas conocidas que tenían sitios de corte únicos en la secuencia del inserto, en la Figura 6, se observa un mapa lineal de las secuencias de corte encontradas para Actina *Tf*. En los carriles 5, 6 y 7, se observan los resultados de las digestiones de la construcción entre el fragmento ya mencionado y pGEM con *Bgl*III, *Hind* III y *Eco* RI, respectivamente. Con las dos primeras enzimas se linearizaba la construcción, obteniendo así un fragmento del tamaño esperado de 3,513 pb, mientras que con *Eco* RI, el fragmento resultado del PCR anidado fue liberado obteniendo así dos bandas: una de 3,016 pb y otra de 497 pb aproximadamente.

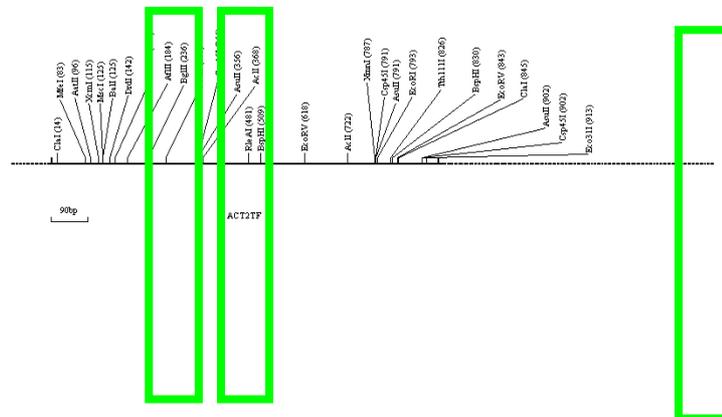


Figura 6: Mapa lineal de los sitios de corte encontrados para el fragmento Actina *Tf*, en cuadros verdes se señala la ubicación para las secuencias de corte de *Bgl*III, *Hind* III y *Eco* RI. Elaborado con DNA man 2.0

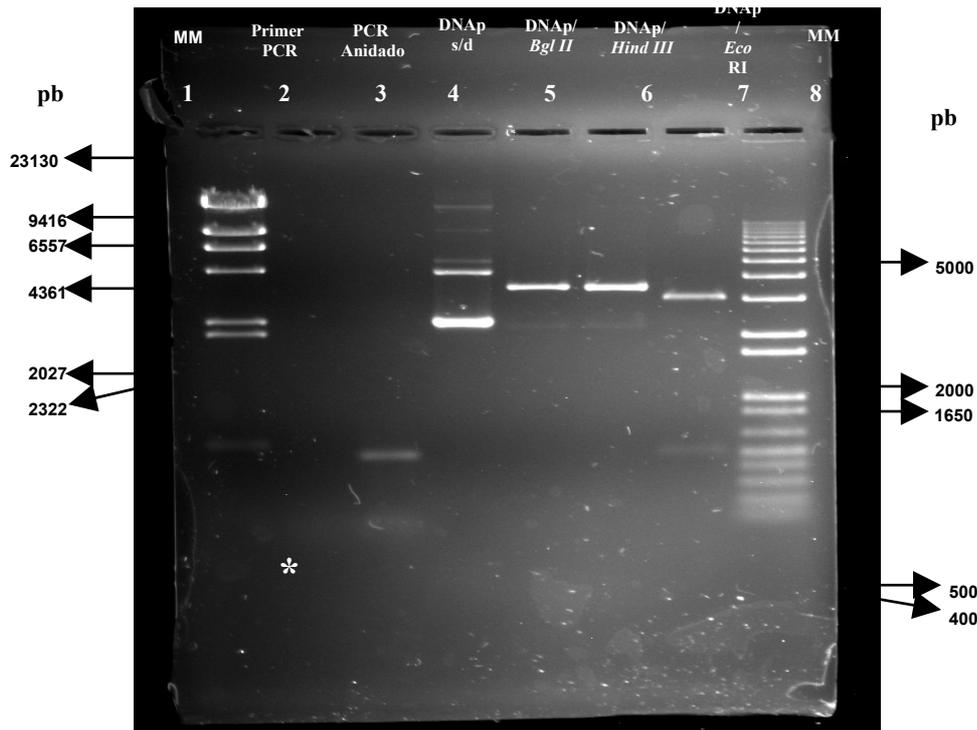


Figura 7: Fotografía del gel de agarosa de la electroforesis donde se muestran las diferentes etapas de la reacción de PCR anidado. MM (1 y 8): Marcadores moleculares ; Primer PCR (2): DNA amplificado por la primera ronda de PCR; *: Sitio esperado donde se encontraría el fragmento de 526 pb ; PCR anidado (3): Fragmento de 497 bases obtenido de la segunda ronda del PCR, DNAp s/d (4):DNA plasmídico obtenido de las bacterias transformantes; DNAp *Bgl* II (5): DNA plasmídico, digerido con *Bgl* II; DNAp *Hind* III (6): DNA plasmídico digerido con *Hind* III; DNAp *Eco* RI (7): DNA plasmídico digerido con *Eco* RI.

El fragmento de 497 pb fue secuenciado y una vez que se corroboró su identidad fue nombrado *Actina Tf*. Se alineó con la secuencia del gen de actina de *T. vaginalis*, encontrando un 85% de identidad entre ambas secuencias (Tabla 5). *Actina Tf* fue utilizada como sonda para los ensayos de Southern y northern blot subsecuentes.

Tabla 5: Alineamiento entre el fragmento *ActinaTf* y el marco abierto de lectura del gen de actina de *T. vaginalis*.

TV: Marco abierto de lectura del gen de actina de *T. vaginalis*. *ActinaTf*: Fragmento de actina de *T. foetus* con un tamaño aproximado de 497 pb. El alineamiento se llevó a cabo con el programa ClustalW 2. *: Nucleótidos conservados, -: Espacios donde una de las secuencias carece de nucleótidos por alinear, los números indican la extensión del fragmento alineado.

En la Figura 8 se presenta una comparación esquemática entre el tamaño del marco abierto de lectura del gen de actina de *T. vaginalis* (verde), la secuencia consenso del gen de actina de *T. foetus* y el fragmento Actina *Tf* que fue obtenido mediante un PCR anidado. La secuencia amplificada de actina de *T. foetus* abarca la mitad del marco de lectura abierto del gen de actina de *T. vaginalis*, no posee el codón de inicio, ni el codón de paro, y corresponde a los nucleótidos 81 al 578 de *T. vaginalis*.

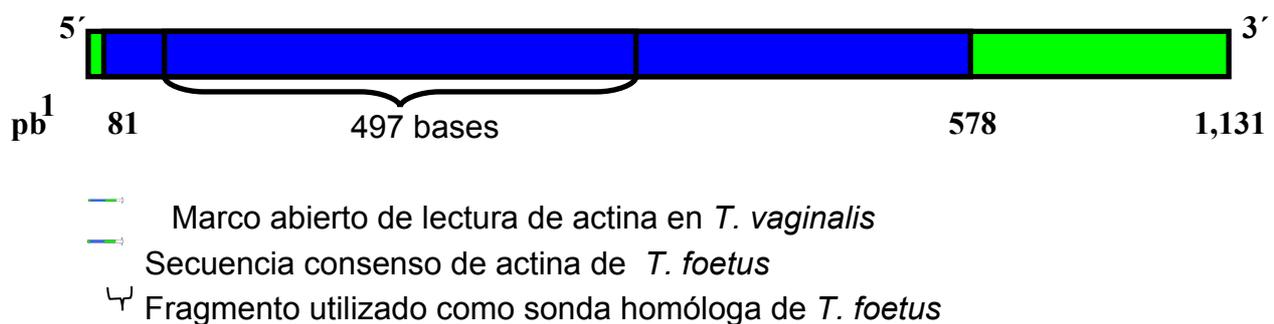


Figura 8: Esquema representativo de la ubicación de la secuencia consenso de actina en *T. foetus* y el fragmento utilizado como sonda homóloga de *T. foetus*, respecto a la secuencia del marco abierto de lectura del gen de actina de *T. vaginalis*

3. SOUTHERN BLOT CON Actina*Tf*

Para determinar si actina es codificada por una familia multigénica como se ha reportado para *T. vaginalis* se realizaron estudios de Southern blot (Figura 9) en los que se identificaron secuencias del fragmento de actina clonado (Actina *Tf*). Para *T. foetus* se encontraron 4 bandas de 9.3, 6.2, 5.4 y 3.7 kb en los carriles en que se corrió 5 y 10 μg de DNA. En el caso del carril donde se analizó 1 μg de DNA la señal fue menos aparente. Se realizó Southern blot también para *T. vaginalis* observando un patrón de al menos 8 bandas.

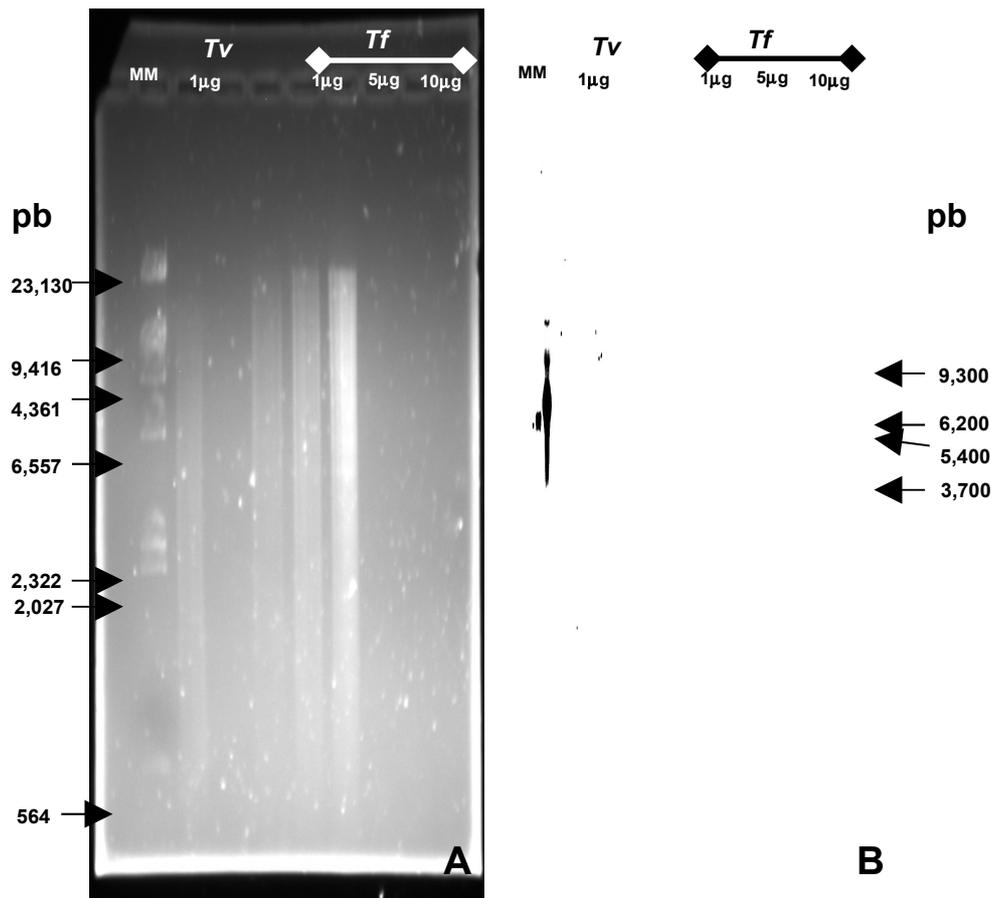


Figura 9: Fotografía del corrimiento electroforético (Panel A) e imagen del gel de la electroforesis teñido con bromuro de etidio (Panel B) del Southern elaborado con las muestras de DNA de *T. foetus* (*Tf*) y *T. vaginalis* (*Tv*) e hibridadas con la sonda Actina *Tf*. MM: Marcador molecular.

1. NORTHERN BLOT CON Actina*Tf*

Para confirmar que actina fuera transcrita en nuestro aislado se corrió un northern blot con RNA total de *T. foetus*. Se observaron 2 bandas de hibridación con tamaños de 1.8 y 1.5 kb, respectivamente (Figura 10, panel B) ambos transcritos son de tamaño suficiente para contener toda la región codificadora. Como control se usó RNA de *T. vaginalis*, en donde se observó un fragmento de un tamaño aproximado de 1.7 kb (Figura 10, panel B, asterisco).

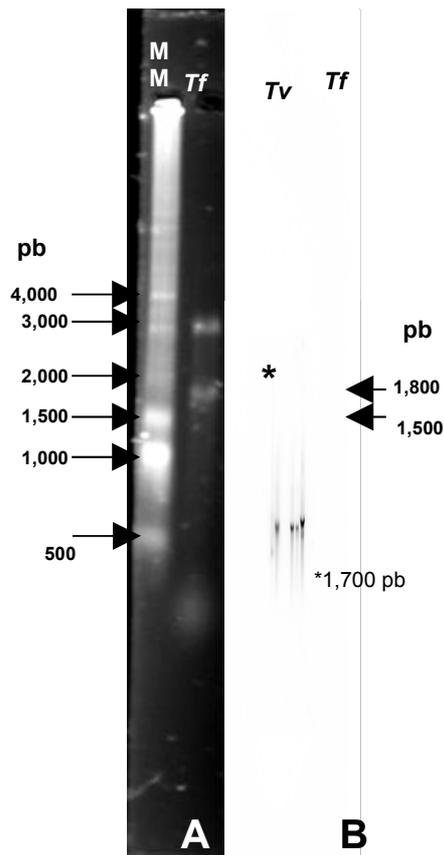


Figura 10: Fotografías de la electroforesis (A) y del revelado del northern blot (B), donde para *T. foetus* (*Tf*), se observan dos señales de hibridación encontradas, además se observa para *T. vaginalis* (*Tv*) una señal de hibridación (*). MM: marcador molecular.

2. WESTERN BLOT

En el laboratorio se cuenta con un suero anti-actina de *T. cruzi* al cual durante su caracterización se demostró que su reactividad no era específica para la actina de *T. cruzi* ya que también reconoce la actina de otros parásitos como *T. gondii* y *T. vaginalis* (Segura-Kato, 2008) por lo cual se decidió utilizar este suero en pruebas con *T. foetus*. Al realizar el ensayo western blot con lisados totales de *T. foetus* y cruzarlo con el anticuerpo anti-actina de *T. cruzi*, se observó la aparición de una señal de reactividad muy intensa de aproximadamente 43 kDa y una de menor intensidad con un peso de 37 kDa (Figura 11, panel C). Por su parte, para *T. cruzi* se encontró una señal de reactividad de 45 kDa y para *T. vaginalis* se localizaron dos señales, la mayor de 45 kDa y la menor de 39 kDa aproximadamente (Figura 11, panel B).

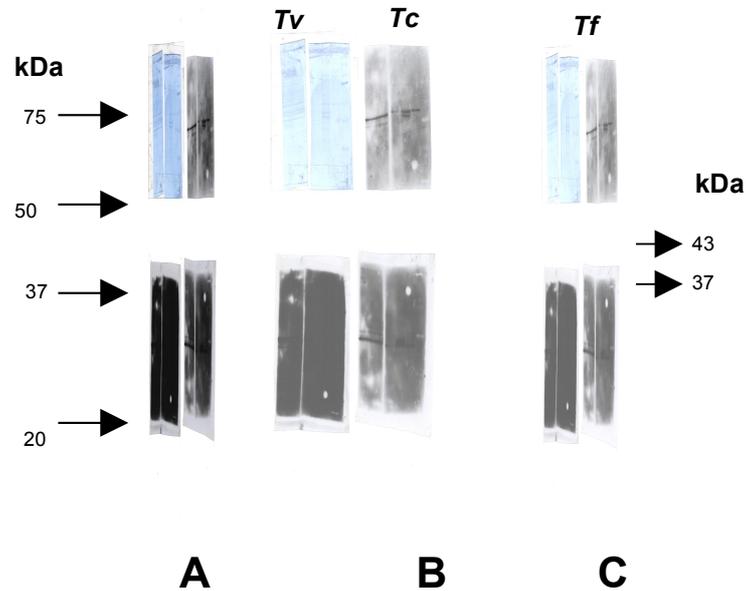


Figura 11: Imagen del western blot realizado con muestras de lisados totales de *T. foetus* (*Tf*). Como controles positivos se utilizaron muestras de *T. vaginalis* (*Tv*) y *T. cruzi* (*Tc*). El panel A muestra a los marcadores moleculares (MM) teñidos con el colorante azul de Coomassie y el panel B y C corresponde a la fotografía de los revelados del western blot por quimioluminiscencia.

6. INMUNOBLOTS DE DOBLE DIMENSIÓN

Se buscó la frecuencia de isoformas mediante inmunoblots de 2D, para lo cual se utilizó un protocolo para extracción de proteínas diferente al utilizado en el experimento anterior. Con el protocolo para la extracción de proteínas para el gel 2D en *T. foetus* se obtuvieron extractos con buena conservación de las proteínas (Figura 12, panel A, carril 3), ya que se observa poca degradación.

Debido a que luego de su cuantificación por la técnica de Lowry se obtuvimos una concentración de 3.03 μg de proteína por μL , se decidió utilizar en el western blot siguiente 30 μg de proteínas.

La exposición de la membrana que contenía las proteínas de *T. foetus* con los anticuerpos primario y secundario, solo se encontró reconocimiento de la banda de 43

kDa aproximadamente. También se obtuvo reactividad con la muestra de actina de músculo de pollo, observándose una señal de reacción de 43 kDa (Figura 12, panel B, C (+)). Sin embargo no fue posible la identificación de la banda de 37 kDa identificada con extractos totales.

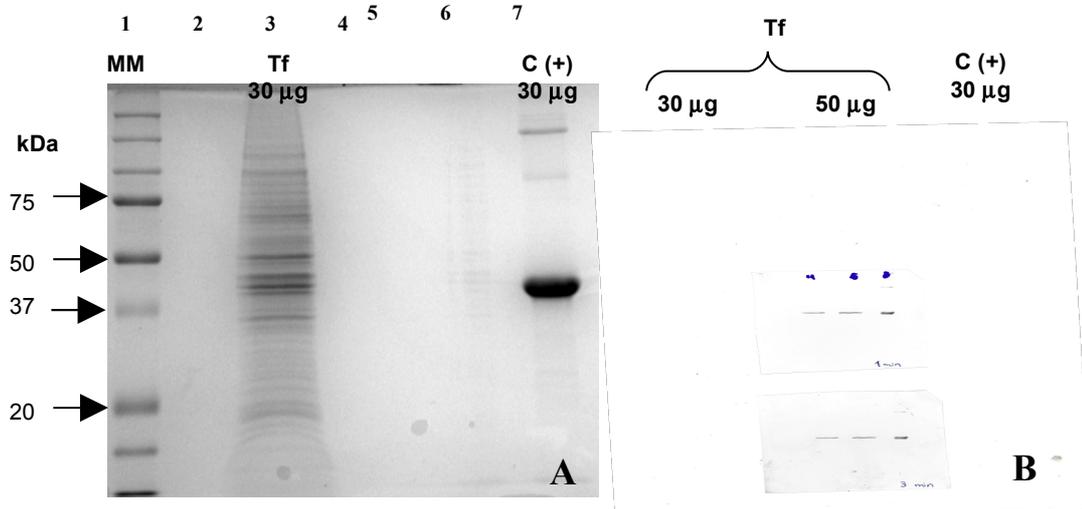


Figura 12: Resultados del SDS PAGE teñido con azul de Coomassie y el western blot donde se corrieron muestras obtenidas de *T. foetus* mediante el protocolo de muestras para gels 2D. Panel A: Fotografía del corrimiento de 30 µg de las muestras enriquecidas de *T. foetus* (Tf) en acrilamida al 12%, teniendo como control positivo (C(+)) 30 µg de actina de músculo de pollo. Panel B: Imagen del revelado del western blot mediante quimioluminiscencia, con el anticuerpo anti-actina de *T. cruzi*, realizado a dos diferentes concentraciones (30 y 50 µg) de la muestra de proteínas de *T. foetus*

El análisis por isoelectroenfoco en 3 tiras ensayadas mostró proteínas enfocadas en un rango de pH de 4 a 7, las cuales fueron utilizadas para correr la electroforesis 2D, en un tiempo de 5 h y 55 min.

Una vez realizada la electroforesis, la electroforesis 2D y el revelado de las placas, se encontraron 4 puntos con un peso molecular aproximado de 43 kDa, pero con diferente punto isoeléctrico (pI).

La más aparente posee un pI de 5.3 (Figura 12, punto 2), la menos aparente tiene un pI de 5.5 (Figura 13, punto 4) y las dos restantes de 5.2 y 5.4 respectivamente (Figura 13 puntos 1 y 3).

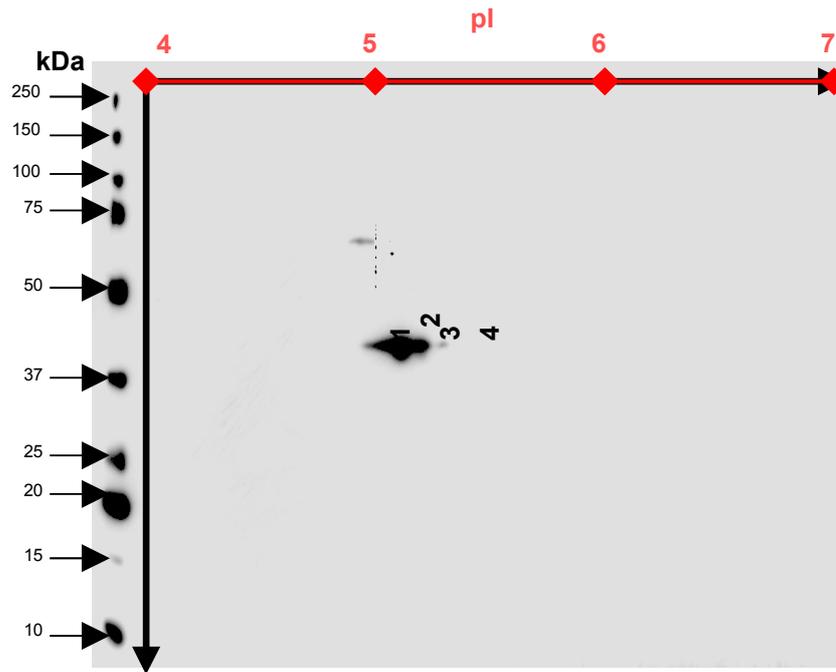


Figura 13: Isoformas obtenidas mediante inmunolectroforesis 2D de proteínas de *T. foetus*. Con la línea roja se ejemplifica el gradiente de pI existente en el gel y con la flecha negra el sentido de la migración de las proteínas en la electroforesis. El revelado de los puntos se hizo por quimioluminiscencia y corresponden a 1: 5.2, 2: 5.3, 3: 5.4 y 4: 5.5.

VIII. DISCUSIÓN

Debido a que la información que se tiene acerca de actina en *T. foetus* es escasa, (Benchimol y Souza, 1987 y Brugerolle y cols., 1996) y a que su genoma no se encuentra secuenciado, se optó por comenzar la caracterización del gen de actina de *T. foetus* con la utilización de un fragmento de DNA proveniente del gen de actina de *T. vaginalis* como sonda (Espinosa y cols., 2002); sin embargo, no se obtuvo hibridación entre el DNA y RNA de *T. foetus* con dicho fragmento (no se muestran los datos). Por esta razón se empleó otra metodología para poder obtener una herramienta que fuera específica para *T. foetus* y así poder continuar con su caracterización. Se hizo una búsqueda en la base de datos de EST's de *T. foetus* con el marco abierto de lectura de actina de *T. vaginalis* y se hallaron 32 secuencias parciales que corresponden a la región codificadora de actina en *T. foetus* las cuales presentan pocas diferencias entre ellas.

El análisis de secuencia de la región común entre ellas demuestra que son casi idénticas, sin embargo fue posible identificar algunos cambios puntuales (presentes en más de 4 secuencias de estas EST's) que sugieren la presencia de al menos tres tipos diferentes de secuencias (Ver anexo 2), lo que nos podría indicar que actina en *T. foetus* es codificada por una familia génica.

Basados en el alineamiento de estas secuencias se identificaron regiones totalmente conservadas en todos los transcritos para diseñar oligonucleótidos que permitieran la clonación de un fragmento de DNA genómico que contenga una región de 497 pb de un gen de actina. Este fragmento puede ser de gran utilidad para la caracterización del sistema de actina y su expresión a nivel de mensajero.

La sonda arriba mencionada se hibridó con DNA genómico de *T. foetus* y se obtuvieron 4 bandas, estos resultados y las diferencias encontradas en las secuencias de EST's nos

confirma que actina en este organismo está codificada por una familia multigénica, cuyo número de miembros puede ser de al menos 4. Esta familia es menos compleja que la reportada para *T. vaginalis*, la cual cuenta con 9 miembros (Bricheux y Brugerolle, 1997). Sin embargo el número de miembros que conforman a la familia de actina en *T. foetus* es similar a lo encontrado en otros protozoos parásitos como *P. falciparum* y *E. histolytica* (Wesseling y cols., 1989 y Edman y cols., 1987). Otro aspecto importante es que con esta sonda se encontraron 8 de las 10 bandas reportadas para actina de *T. vaginalis* (Espinosa y cols., 2002), lo que apoya el alto grado de similitud encontrado entre la secuencia reportada de actina para *T. vaginalis* y las secuencias parciales de actina de *T. foetus* accesadas en NCBI.

Para caracterizar la expresión del RNAm de actina en nuestro aislado de *T. foetus* se hibridó la sonda homóloga Actina *Tf* con RNA total, obteniendo así dos diferentes transcritos (1.8y 1.5 kb), ambos de tamaño suficiente para contener la región codificadora completa de actina en *T. foetus* que estimamos similar a la de *T. vaginalis*, que es de 1,128 pb (Bricheux y Brugerolle, 1997).

La aparición de dos mensajeros que son codificados probablemente a partir de 4 genes podrían ser el resultado de que uno de los mensajeros contenga transcritos provenientes de un gen ó más con regiones no traducidas de tamaños similares, mientras que el segundo mensajero podría provenir de un transcrito que codifique para una actina del mismo tamaño pero con regiones no traducidas de longitud diferente, para así poder observar transcritos de tamaños diferentes

Otra posibilidad es que alguno de los transcritos pertenezca a una actina atípica, que tenga una secuencia muy parecida a la reconocida por la sonda, pero cuya región codificadora sea de tamaño diferente al de la probable actina, lo que afectaría así mismo al tamaño del mensajero. La presencia de actinas atípicas ha sido reportada en

organismos pertenecientes al grupo de los volvocanes como *Chlamydomonas reinhardtii*, *C. moewusii* y *Volvox carteri* (Hirono y cols., 2003 y Kato y cols., 2003), sería necesario conocer las secuencias de las cuatro bandas encontradas en el Southern y de los dos mensajeros para así poder discernir entre cualquiera de las dos posibilidades. Uno de los objetivos de este trabajo era saber si había expresión de actina en *T. foetus*, para lo cual se efectuaron ensayos de western blot con un anticuerpo anti-actina de *T. cruzi*, que había demostrado tener reactividad con las actinas de protozoos (Segura, 2008). En los ensayos efectuados con dicho anticuerpo se encontraron dos señales de reactividad de 43 y 37 kDa para *T. foetus*. Para *T. vaginalis*, *Trichomonas batrachorum* e *Hypotrichomonas acosta* (Segura, 2008 y Brugerolle y cols., 1996) también se ha reportado la aparición de dos señales de reactividad en western blot con anticuerpos anti-actina, esto nos podría indicar que en trichomonadidos es común encontrar 2 posibles proteínas de actina.

Otra posibilidad es que ambas señales correspondan a la misma proteína, pero que la señal de mayor peso podría corresponder a la forma típica de esta proteína mientras que la de menor tamaño podría corresponder a la forma procesada, como lo reportado para *T. vaginalis* por Cuervo y colaboradores (2008) quienes identificaron seis isoformas, tres de ellas de mayor peso que las tres restantes, al realizar la secuenciación peptídica encontraron que las seis isoformas correspondían a la actina reportada por Brugerolle y colaboradores (1996) pero que las tres isoformas de menor peso habían sufrido oxidación perdiendo así probablemente parte de su extremo amino terminal. La posibilidad de que en *T. foetus* la actina sea procesada y se produzca un péptido de 37 kDa no puede ser descartada y debe ser estudiada experimentalmente.

También existe la posibilidad de que, como en el caso de *P. falciparum*, se expresen diferentes actinas con diferentes tamaños de mensajeros y diferentes pesos de proteínas

(2.5 y 1.9 kb) dependiendo del estadio en el que se encuentren (Wesseling y cols., 1989) aunque, en este caso *T. foetus* no presenta más que el estadio de trofozoíto (Yarlett, 2001) y una forma de pseudoquistes cuando las condiciones del medio no son favorables (Pereira-Neves y cols., 2003).

No obstante, la señal de reactividad mayor en *T. foetus* tiene un peso semejante al de actina de *T. gondii* de 44 kDa (Dobrowolsky y cols., 1997) y la señal de 37 kDa muestra un peso molecular poco común entre las actinas de otros protozoos parásitos (Vanderkerckhove y Weber, 1980 y Romans y cols., 1985), por lo cual existe la posibilidad de que el anticuerpo anti-actina de *T. cruzi* reconozca algunas secuencias compartidas por actina con otras proteínas relacionadas con ella como ARPs (Actin Related Proteins) ó proteínas tipo actin-like en *T. foetus*. Por lo anterior, es necesario realizar estudios de espectrofotometría de masas para comprobar la identidad de ambas proteínas.

La técnica utilizada para la extracción de proteínas para geles 2D ha sido estandarizada en el laboratorio del Dr. Ambrosio en extractos de *Taenia* (Ambrosio, 2003). Esta técnica muestra claras diferencias metodológicas con la técnica utilizada para la obtención de lisados totales (Segura, 2008), que podrían justificar la desaparición de la proteína de menor tamaño (37 kDa) en los geles 2D (ver Figura 11).

Al realizar los inmunoblots 2D con la muestra arriba mencionada se encontraron 4 isoformas para la proteína de 43 kDa; una de ellas presenta una intensidad mayor a las demás (5.2), patrón semejante al reportado por Cuervo y colaboradores (2008) en *T. vaginalis* donde se observaron 6 isoformas, siendo las isoformas con pIs intermedios las más abundantes para los dos tipos de actina: la completa y la procesada. Los pIs hipotéticos para estas isoformas oscilan entre 5.05 y 5.23, ligeramente menos ácidos a los presentados en este trabajo.

Estas isoformas pueden deberse a modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Furuhashi, 2002) y la glutionalización (Johansson y Lundberg, 2007). La posibilidad de que las diferentes isoformas participen en diferentes funciones es una hipótesis que deberá ser analizada experimentalmente.

En resumen, este trabajo demuestra que actina en *T. foetus* forma parte de un sistema molecular cuya complejidad debe ser estudiada más a fondo

IX. CONCLUSIONES

1. Se identificaron secuencias parciales del marco de lectura abierto para el gen de actina en *T. foetus*
2. Se obtuvo una sonda homóloga a actina en *T. foetus*.
3. La actina en *T. foetus* esta formada por una familia génica con pocos miembros.
4. Existen dos transcritos distinguibles por tamaño y aparentemente dos polipéptidos relacionados.
5. La proteína de 43 kDa representa una población heterogénea de al menos 4 isoformas con pIs ácidos reconocibles entre sí.

Los datos sugieren que actina en *T. foetus* forma parte de un sistema molecular complejo. Los resultados del presente trabajo han permitido conocer más acerca del sistema génico de actina en *T. foetus*, además proporcionan información preliminar sobre esta proteína, lo que pudo contribuir a conocer más acerca del papel que juega en la biología de *T. foetus*.

X. LITERATURA CITADA

- Ambrosio, J. R. , O. Reynoso-Ducoing , H. Hernández-Sánchez , D. Correa-Piña , L. González-Malerva, M. Cruz-Rivera y A. Flisser . 2003. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biol Int.* **27**(9):727-33.
- Amos, W. B. y A. V. Grimstone, 1968. Intercisternal material in the Golgi body of *Trichomonas*. *J. Cell Biol.* **38**: 466-471.
- Benchimol, M. 2005. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* **97**: 408-416.
- Benchimol, M. y W. Souza. 1987. Structural analysis of the cytoskeleton of *Tritrichomonas foetus*. *J. Submicrosc. Cytol.* **19**(1): 139-147.
- Bricheux, G. y G. Brugerolle. 1997. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiology Letters.* **153**:205-213
- Brugerolle, G., G. Bricheux y G. Coffe. 1996. Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. *Biol. Cell.* **88**: 29-36.
- Cappuccinelli, P., C. Sellitto, D. Zicconi y C. Juliano. 1986. Structural and molecular organization of *Trichomonas vaginalis* cytoskeleton. *Acta Univ. Carol Biol.* **10**: 211-217.
- Cevallos, A. M., I. López-Villaseñor, N. Espinosa, J. Herrera y R. Hernández. 2003. *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Exp. Parasitol.* **103**: 27-34.
- Cuervo, P., E. Cupolillo, C. Britto, L. J. González, F. C. E Silva-Filho, L. C. Lopes, G. B. Domoni y J. B. De Jesus. 2008. Differential soluble protein

expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *J Proteomics*. 71(1):109-22

- Da Silva, N. S., B. P. Dias Filho y W. De Souza. 1996. Structural Changes at the Site of *Tritrichomonas foetus*-Erythrocyte Interaction. *Cell Struct Funct*. **21**:245-250.
- De Carli, G., Tasca, T. y F. Pires Borges. 2004. *Tritrichomonas foetus*: a scanning electron microscopy study of erythrocyte activity. *Vet. Res*. **35**: 123-130.
- Diamond, L. A. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol*. **43**: 488-490.
- Dobrowolski, J. M., I. R. Niesman y D. Sibley. 1997. Actin in the Parasite *Toxoplasma gondii* is Encoded by a Single Copy Gene, ACT1 and Exists Primarily in a Globular Form. *Cell Mot. Cytos*. **37**: 253-262.
- Drouin, G., M. Moniz de Sá y M. Zuker. 1995. The *Giardia lamblia* Actin Gene and Phylogeny of Eukaryotes. *J. Mol. Evol*. **41**(6):841-849.
- Edman, U., I. Meza y N. Agabian. 1987. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **84**: 3024-3028.
- Espinosa, N., R. Hernández, L. López-Griego, R. Arroyo y I. López-Villaseñor. 2001. Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model. *Acta Tropica*. **78**: 147-154.
- Espinosa, N., R. Hernández, L. López-Griego y I. López-Villaseñor. 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene*. **289**: 81-86.

- Felleisen, R. S. J. 1999. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes and Infection*. **1**:807-816.
- Furuhashi, K. 2002. Involvement of actin desphosphorylation in germination of *Physarum sclerotium*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**(2): 129-133.
- Hightower, R. y R. Meagher. 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics* **114**:315-332.
- Hofmann, W. A. y P. de Lanerolle. 2006. Nuclear actin: to polymerize or not to polymerize. *J Cell Biol.* **172**:495-6.
- Hirono, M., S. Uryu, A. Ohara, T. Kato y R. Kamiya. 2003. Expression of Conventional and Unconventional actins in *Chlamydomonas reinhardtii* upon Deflagellation and Sexual Adhesion. *Eukaryot. Cell.* **2** (3):486-493.
- Johansson, M. y M. Lundberg. 2007. Glutathionylation of beta-actin via cysteinyl sulfenic acid intermediary. *BMC Biochem.* **8**: 26.
- Kato, T., M. Okumura, M. Hirono y R. Kamiya. 2006. A Novel Family of Unconventional Actins in Volvocalean Algae. *J. Mol. Biol.* **57**:555-561.
- Kim, K. L. Gooze, C. Petersen, J. Gut and G. Nelson. Isolation, sequence and molecular karyotype analysis of the actin gene of *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Bioch. Parasitol.* **50**: 105-114.
- Kleina, P., J. Bettim-Bandinelli, S. L. Bonatto, M. Benchimol y M. Reis Bogo. 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8 S rRNA and ITS-2 sequences. *Int. J. Parasitol.* **34**:963-970.
- Larkin, M. A., G. Blackshields , N. P. Brown , R . Chenna , P. A. McGettigan , H. McWilliam , F. Valentin , I. M. Wallace , A. Wilm , R. Lopez , J. D. Thompson , T. J. Gibson y D. G. Higgins . 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **23**(21):2947-2948.

- Liston, D.R. y P. J. Johnson. 1999. Analysis of a Ubiquitous Promoter Element in a Primitive Eukaryote: Early Evolution of the Initiator Element. *Mol. Cell. Biol.* **3**(19):2380-2388.
- Lucas, J. J., G. R. Hayes, H. K. Kalsi, R. O. Gilbert, Y. Choe, C. S. Craik y B. N. Singh. 2008. Characterization of a cysteine protease from *Tritrichomonas foetus* that induces host-cell apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **477**:239-43.
- Lun, Z.R. y A. A. Gajadhar. 1999. A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**:471-474.
- Lun, Z. R., X. G. Chen, X. Q. Zhu, X. R. Li y M. Q. Xie. 2005. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends Parasitol.* **21**:122-125.
- Madeiro da Costa, R. F. y M. Benchimol. 2004. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* **92**: 159-170.
- Meyer- Mariante, R., L. Coutinho y M. Benchimol. 2004. *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cell in a contact-dependent manner. *Parasitol. Res.* **92**: 303-312.
- Pereira-Neves, A. y M. Benchimol. 2007. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol. Cell.* **99**: 87-101.
- Pollard, T.D. y G. G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* **4**:453-465.
- Rae, O. D. y J. E. Crews. 2006. *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin. Food Anim.* **22**:595-611.
- Reisler, E. 1993. Actin molecular structure and function. *Curr. Op. Cell Biol.* **5**: 41-47.

- Romans, P., R. A. Firtel and C. L. Saxe III. 1985. Gene-specific Expression of the Actin Multigene Family of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **186**: 337-355.
- Schwebke, J. R. y D. Burgess. 2004. Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 794-803.
- Segura-Kato, Y. X. 2008. Expresión y localización de la proteína actina en los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM. 122 Págs.
- Sehring, I. M., J. Mansfeld, C. Reiner, E. Wagner, H. Plattner and R. Kissmehl. 2007. The actin multigene family of *Paramecium tetraurelia*. *BMC Genomics.* **8**: 82-98
- Singh, B. N., J. J. Lucas, D. H. Beach, S. T. Shin y R. O. Gilbert. 1999. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to Bovine Vaginal Epithelial Cells. *Infection and Immunity.* **8**: 3847-3854.
- Tasca, T. y G. A. De Carli. 2003. Scanning electron microscopy study of *Trichomonas gallinae*. *Vet Parasitol.* **118**(1-2):37-42.
- Vanáčová, S., J. Tachezy, E. Ullu y C. Tschudi. 2001. Unusual diversity in alpha-amanitin sensitivity of RNA polymerases in trichomonads. *Mol Biochem Parasitol.* **115**:239-247.
- Vanáčová, S., D. R. Liston, J. Tachezy y P. J. Jonson. 2003. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* **33**:235-255.
- Vandekerckhove, J. y K. Weber. 1980. Vegetative *Dictyostelium* cells containing 17 actin genes express a single major actin. *Nature.* **284** (5755):475-7.

- Viera, P. B., F. P. Borges, B. Gottardi, C. Stuepp, A. B. Larré, T. Tasca y G. A. De Carli. 2008. Analysis of microtubule cytoskeleton distribution using a fluorescent taxoid in two trichomonadid protozoa: *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus*. *Exp. Parasitol.* **119**:186-191.
- Wang, A.L. y C. C. Wang. 1985. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**:323-335.
- Wesseling, J.G., P. J. Snijders, P. van Someren, J. Jansen, M. A. Smits y J. G. Schoenmakers. 1989. Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **35**:167-176.
- Xu WD, Lun ZR, Gajadhar A. 1998. Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. *Vet Parasitol.* **78**: 247-51
- Yarlett, N. 2001. Trichomonads. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley and sons. www.els.net

XI. ANEXOS

1. ANEXO 1: Soluciones utilizadas

1. Buffer de extracción

0.2 %	SDS
100 mM	Na Cl
10 mM	EDTa
10 mM	Tris-HCl pH 8

2. TE

10 mM	Tris
0.2 mM	EDTA

3. TBE (Tris Borato EDTA) 5X

54 g	Tris base
27.4 g	Ácido bórico
4.65 g	EDTA
Aforar a 1 L	

4. TBE 1X

Por cada parte de TBE 5X agregar 4 de agua desionizada

5. Medio LB (Luria- Bertani) sólido

10 g	Triptona
5 g	Extracto de levadura
5 g	Cloruro de sodio
0.3 mL	Hidróxido de sodio 10 M
10 mL	Tris 1M pH 8
15 g	Bacto Agar
Ajustar a pH 7 con HCl	
Aforar a 1L con agua deionizada	

6. TAE 50X (Tris, Ácido acético, EDTA)

24.2 g	Tris Base
5.71 mL	Ácido acético glacial
10 mL	EDTA 0.5 M pH 8
Ajustar a 100 mL	

1. TAE 1X

Por cada parte de TAE 50X, añadir 49 partes de agua desionizada

8. SSC 20X (Cloruro de Sodio / Citrato de Sodio)

175 g	Cloruro de sodio
88g	Citrato de sodio dihidratado
Aforar a 1 L y ajustar pH a 7 con HCl 1M	

9. SSC 2X

Por cada parte de SSC 20X añadir 19 partes de agua desionizada

10. SOLUCIÓN DE TRANSFERENCIA

57.5 mL	Ácido acético
140.8 mL	Hidróxido de amonio
2 mL	Hidróxido de sodio 10 N
Aforar a 1 L con agua desionizada	

11. SOLUCIÓN DESPURINIZANTE

Se disuelve en 500 mL de agua desionizada 10.4 mL de HCl fumante 37% de Merck

12. SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE

87.66 g	Cloruro de sodio 1.5 Mol
66.6 g	Tris
Ajustar con HCl y aforar a 1 L	

13. SOLUCIÓN DESNATURALIZANTE

87.66 g	Cloruro de sodio 1.5 mol
20 g	Hidróxido de sodio 0.5 mol
Aforar a 1 L con agua desionizada	

14. PBS 10 X (Buffer de fosfatos)

3 M	NaCl	87.66g
0.4 M	Na ₂ HPO ₄	20.44g
0.4 M	NaH ₂ PO ₄	7.72g
Aforar a 1L, no ajustar pH esterilizar y guardar a 4° C		

15. PBS 1X

Por cada parte de PBS 10X añadir 9 partes de agua desionizada

16. Agua DEPC (Dietil pirocarbonato)

Por cada litro de agua se agregar 150 μ L de dietil pirocarbonato dejar en agitación constante durante 15 h, esterilizar y guardar a 4° C.

17. Etanol 75% en agua DEPC

Disolver 75 mL de etanol absoluto en 25 mL de agua DEPC

18. BUFFER MOPS 0.5 M/ EDTA 0.01 M pH 7 EN AGUA DEPC

20.927 g	MOPS
0.8324 g	EDTA
Ajustar a pH 7 y aforar a 200 mL con agua DEPC	

19. BUFFER DE ELECTROFORESIS MOPS/EDTA 1x

80 mL	MOPS/EDTA 10X
720 mL	Agua DEPC

20. BUFFER DE MUESTRA PARA PROTEÍNAS

Tris-HCl pH 6.8 1.25 M	0.4 mL
SDS 10%	1.6 mL
Glicerol 100%	0.8 mL
Agua desionizada	4.4 mL
Azul de bromofenol 0.1%	0.4 mL
Beta-mercaptoetanol	0.4 mL

21. SDS PAGE 10%

Gel de corrida

Agua desionizada	0.875 mL
Tris-HCl pH 8.8 1.5 M	0.935 mL
SDS 10%	0.0375 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	1.25 mL
TEMED 1%	0.375 mL
APS 1%	0.250 mL

Gel de separación

Agua desionizada	1.45 mL
Tris-HCl pH 6.8 1.25 M	0.250 mL
SDS 10%	0.025 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	0.325 mL
TEMED 1%	0.250 mL
APS 1%	0.175 mL

Se prepara primero el gel de corrida y se deja polimerizar por al menos 45 min, una vez transcurrido el tiempo, se prepara el gel de separación, se coloca sobre el gel de corrida, se instalan los peines con el número de carriles que se necesite y se deja polimerizar por otros 30 min.

22. BUFFER DE TRANSFERENCIA 10 X PARA PROTEÍNAS

Tris base	30.3 g
Glicina	144.2 g
Aforar a 1L de agua desionizada	

23. BUFFER DE TRANSFERENCIA 1X PARA PROTEÍNAS

Buffer de transferencia 10X	100 mL
Metanol	200 mL
Aforar a 1L con agua desionizada	

24. SOLUCIÓN A

- 40 mM KCl
- 1 mM MgCl₂
- Buffer de fosfatos pH 7.4
- Inhibidores de proteasas (Complete, Roche)

25. SOLUCIÓN PARA PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

- TCA 10%
- DTT 20 mM
- Acetona

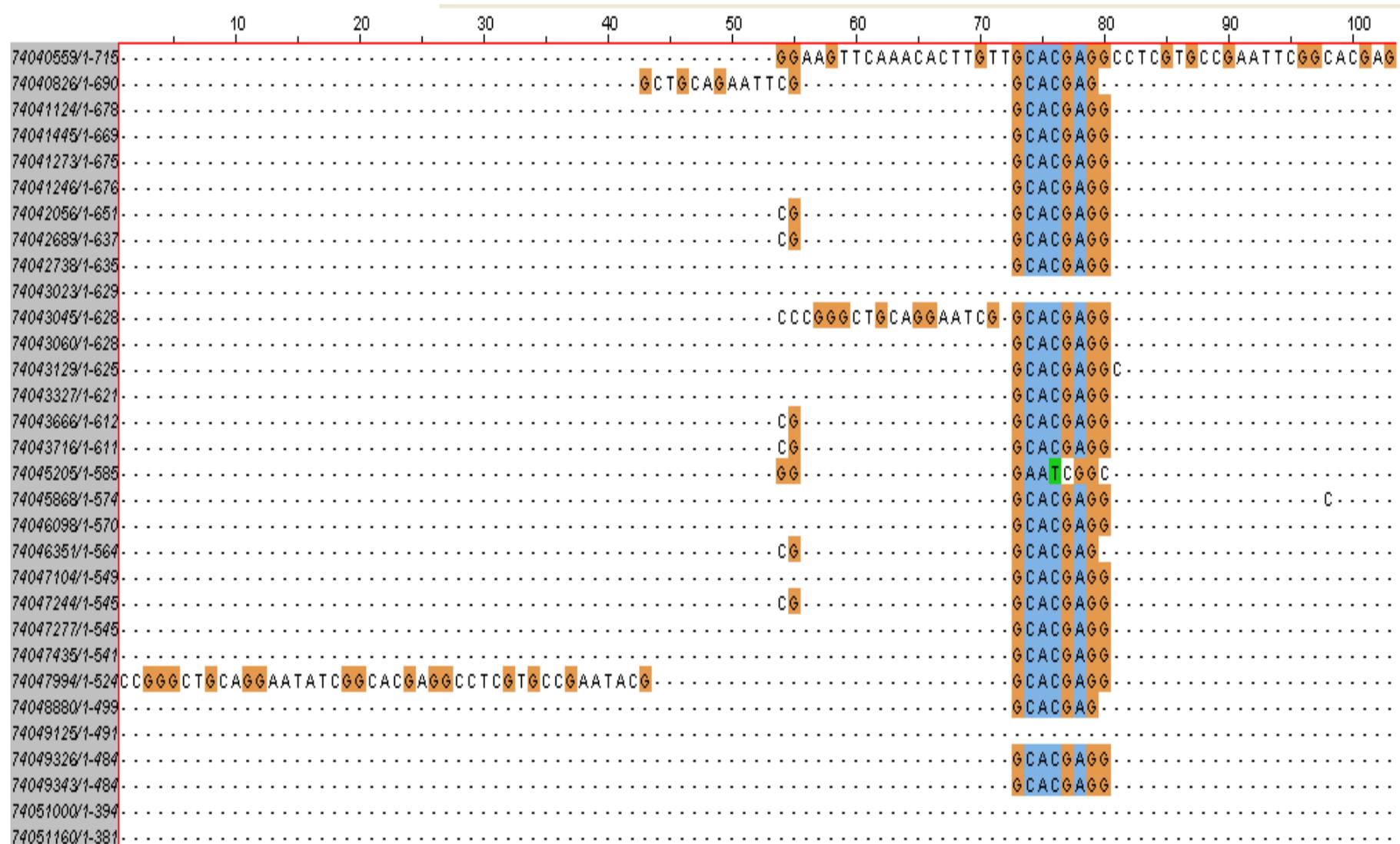
26. SOLUCIÓN DE REHIDRATACIÓN

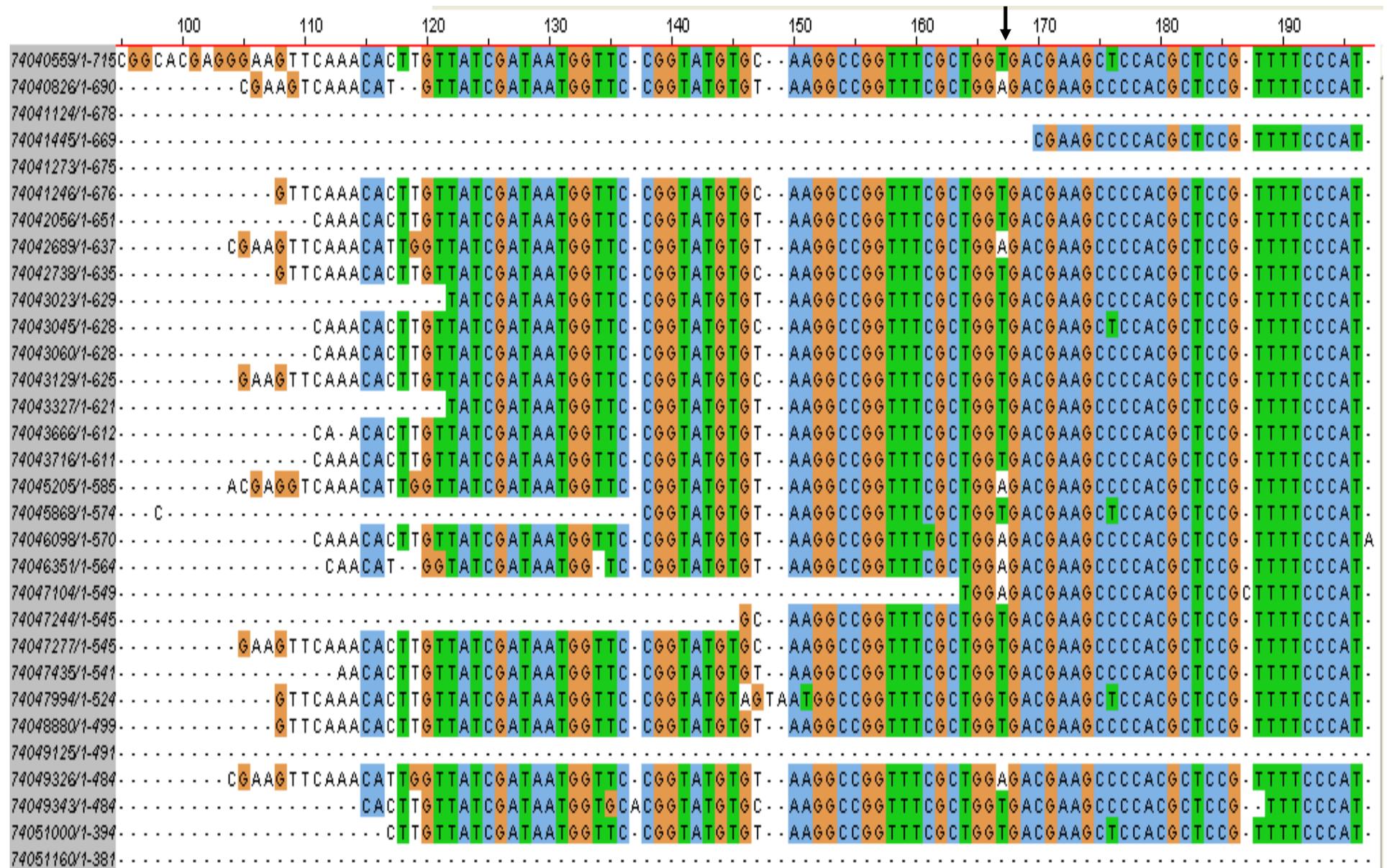
Urea	7M
Tiourea	2M
CHAPS	4%
DTT	60 mM
Buffer pH 4-7	2%
Azul de bromofenol	0.002%

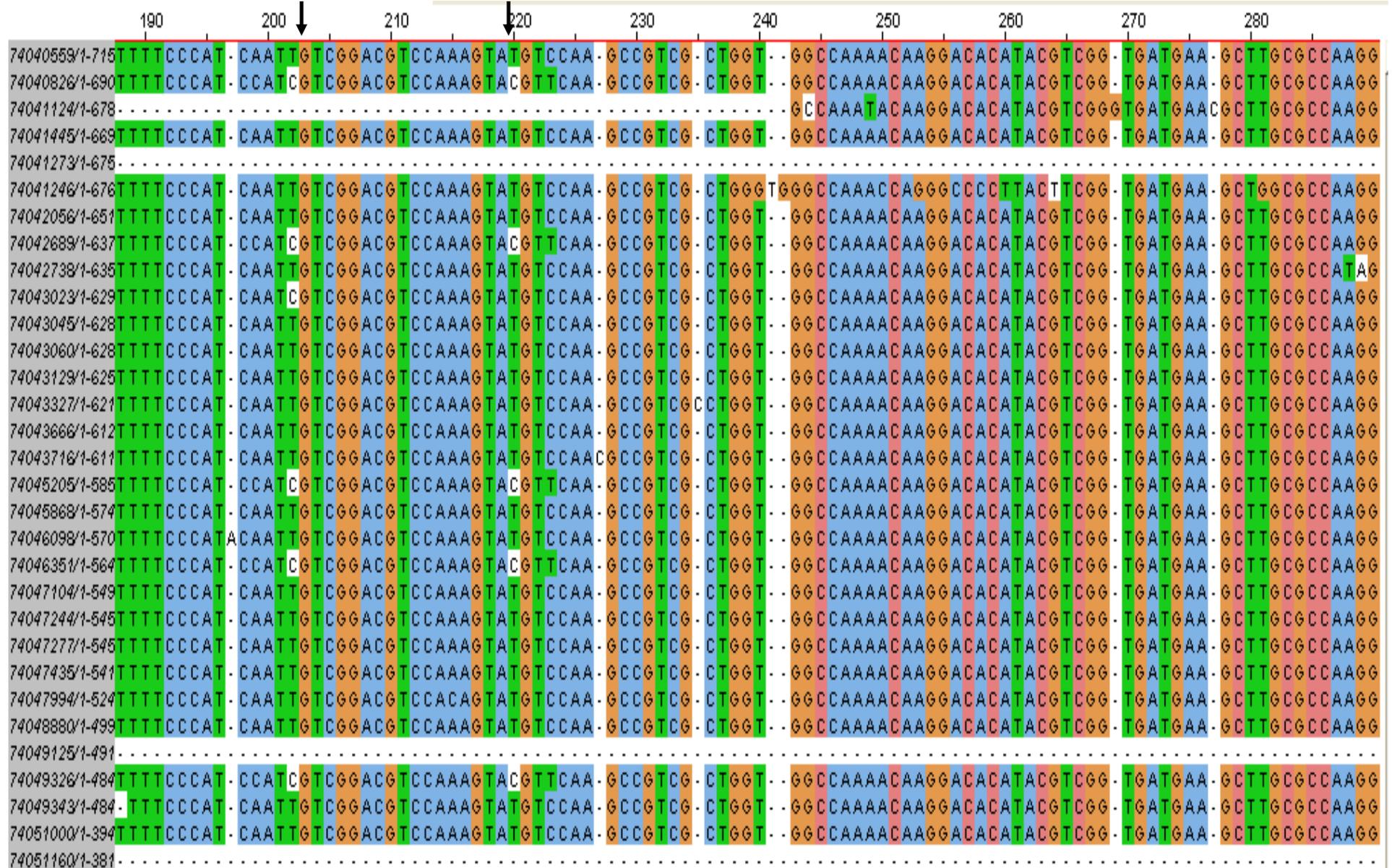
27. SOLUCIÓN DE EQUILIBRIO

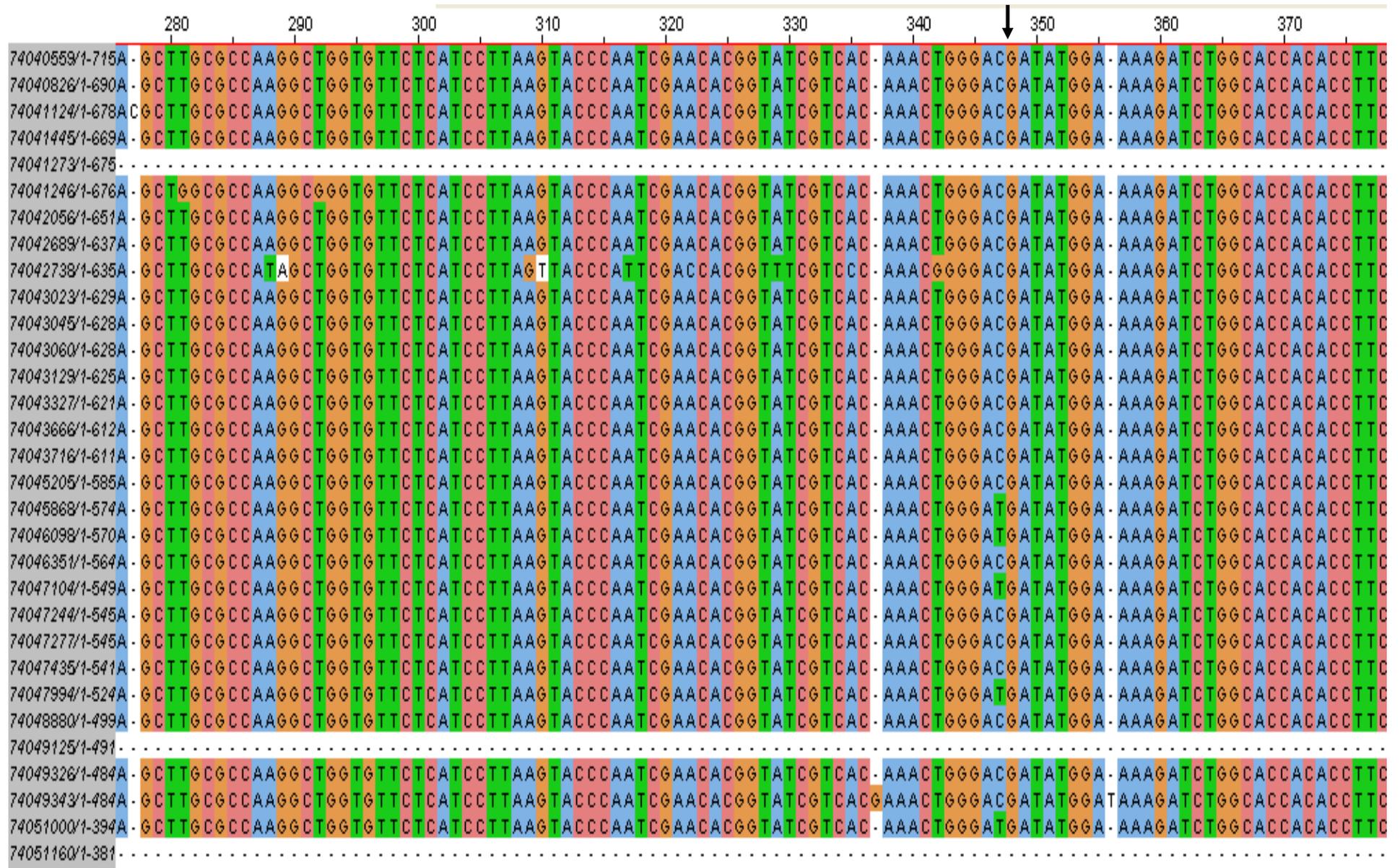
Glicerol	30%
Urea	8 M
SDS	2%
Tris-HCl pH 8.8	50mM
Azul de bromofenol	0.002%

2. ANEXO 2: Alineamiento de las EST's. Con flechas se resaltan los cambios de bases en las secuencias.

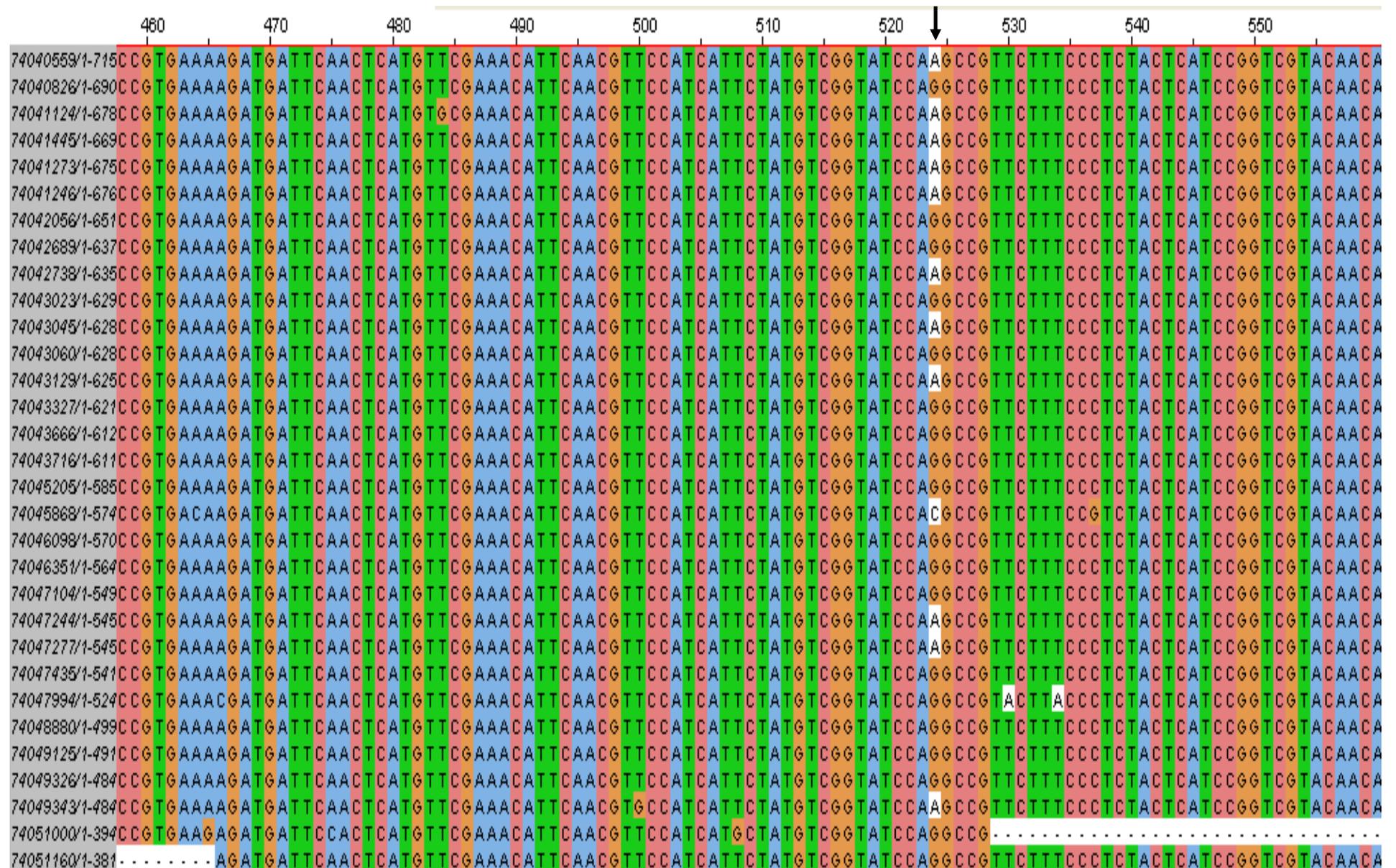








	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460									
74040559/1-715C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTTT	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74040826/1-690C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCAC	CAAT	GAACCC	GAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74041124/1-678C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74041445/1-669C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74041273/1-675	CCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74041246/1-676C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74042056/1-651C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74042689/1-637C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCAC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74042738/1-635C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAT	CACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043023/1-629C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043045/1-628C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTTT	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043060/1-628C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043129/1-625C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043327/1-621C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAGG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTACC	CAGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043666/1-612C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74043716/1-611C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74045205/1-585C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCAC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74045868/1-574C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GACAAG	AT
74046098/1-570C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74046351/1-564C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCAC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74047104/1-549C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74047244/1-545C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74047277/1-545C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74047435/1-541C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74047994/1-524C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAACG	AT
74048880/1-499C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74049125/1-491	CCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT		
74049326/1-484C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCAC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74049343/1-484C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAAG	AT
74051000/1-394C	ACCACACC	TTCTAC	AACGAAC	TTCTG	TGTTG	ACCCAG	CTGAAC	ACCCAG	TTCTCC	TTAC	AGAA	GCCC	CAAT	GAACCC	AAAGGC	TACC	GT	GAAAG	AGAT
74051160/1-381	AGAT



	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	
74040559/1-715	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTTACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74040826/1-690	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74041124/1-678	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74041445/1-669	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74041273/1-675	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74041246/1-676	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74042056/1-651	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTA										
74042689/1-637	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74042738/1-635	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCACGACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74043023/1-629	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74043045/1-628	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTTACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAA.....										
74043060/1-628	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGAAAAGGACATCGTT										
74043129/1-625	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCG..										
74043327/1-621	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74043666/1-612	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGAAAAG.....										
74043716/1-611	CATGACACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGA.....										
74045205/1-585	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACG.....										
74045868/1-574	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACA.....										
74046098/1-570	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATC.....										
74046351/1-564	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGA.....										
74047104/1-549	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAAC.....										
74047244/1-545	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGA.....										
74047277/1-545	CATGAGACTCAACCTTGCCGGA.....										
74047435/1-541	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTG.....										
74047994/1-524										
74048880/1-499										
74049125/1-491	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACCTTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										
74049326/1-484										
74049343/1-484										
74051000/1-394										
74051160/1-381	CATGAGACTCAACCTTGCCGGACGTGATCTCACAGCTTGGCTCCAAAAGATCCTCAACGAACGTGGTTACACATTCADAACATCCGCCGAAAAGGAAATCGTT										

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820

74040559/1-715AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCACGCCCTATGTTGCCCTCGACTATGATG.....

74040826/1-690AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCACGCCCTATGTTGCCCTCGACTATGATG...CCGAACTC.....

74041124/1-678AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCA.....

74041445/1-669AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCACG.....CCTATGTTGCCCTCGACTATGATGCCGAACTCCA

74041273/1-675AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCA.....

74041246/1-676AAGGAAATCGTTCGTGATATCAACGAGAAAGCACGCCCTATGTTGCCCTCGACTATGATGCCGAA.....

74042056/1-651AAGGAAATCGTACGTGATATCAAGGAGAAAGCACGCCCTATGT.....

74042689/1-637AAGGAAATCGTTCGTGATAT.....

74042738/1-635AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAG.....

74043023/1-629AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCACGCCCTATG.....

74043045/1-628AA.....

74043060/1-628AAGGACATCGTTCGTGATAT.....

74043129/1-625AAGGAAATCG.....

74043327/1-621AAGGAAATCGTTCGTGATAT.....

74043666/1-612AAG.....

74043716/1-611.....

74045205/1-585.....

74045868/1-574.....

74046098/1-570.....

74046351/1-564.....

74047104/1-549.....

74047244/1-545.....

74047277/1-545.....

74047435/1-541.....

74047994/1-524.....

74048880/1-499.....

74049125/1-491AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCA.....

74049326/1-484.....

74049343/1-484.....

74051000/1-394.....

74051160/1-381AAGGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAGAAAGCA.....

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

74040559/1-715
74040826/1-690
74041124/1-678 GAACTCCAAA GGCCAAG TCCTCATCC GAATGTGATG TCTCATA CACTCCCA GACGG TAACG TTATCACAATC CTGACGAGCG TTTCCGCTGCCCA GAAC
74041445/1-669
74041273/1-675 GAACTCCAAA GGCCAAG TCCTCATCC GAATGTGATG TTTCATA CACTCCCA GACGG TAACG TTATCACAATC CTGACGAGCG TTTCCGCTGCCCA GAAC
74041246/1-676
74042056/1-651
74042689/1-637
74042738/1-635
74043023/1-629
74043045/1-628
74043060/1-628
74043129/1-625
74043327/1-621
74043666/1-612
74043716/1-611
74045205/1-585
74045868/1-574
74046098/1-570
74046351/1-564
74047104/1-549
74047244/1-545
74047277/1-545
74047435/1-541
74047994/1-524
74048880/1-499
74049125/1-491 GAACTCCAAA GGCCAAG TCCTCATCC GAATGTGATG TTTCATA CACTCCCA GATGG CAACG TTATCACAATC CTGACGAGCG TTTCCGCTGACCA GAAC
74049326/1-484
74049343/1-484
74051000/1-394
74051160/1-381 GAACTCCAAA GGCCAAG TCCTCATCC GAATGTGATG TTTCATA CACTCCCA GATG

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

74040559/1-715
74040826/1-690
74041124/1-678 C G C T G C C C A G A A C T C C T C T T C A A G C C A C A C A T G A A C G G T T T
74041445/1-669
74041273/1-675 C G C T G C C C A G A A C T C C T C T T C A A G C C A C A C A T G A A C G G T T T C G A A T T C G A C G G T A T C G A C C A A A C A C T C T T C G A C T C A G T C A T G A A G T G C G A T A T C G A T G T C C
74041246/1-676
74042056/1-651
74042689/1-637
74042738/1-635
74043023/1-629
74043045/1-628
74043060/1-628
74043129/1-625
74043327/1-621
74043666/1-612
74043716/1-611
74045205/1-585
74045868/1-574
74046098/1-570
74046351/1-564
74047104/1-549
74047244/1-545
74047277/1-545
74047435/1-541
74047994/1-524
74048880/1-499
74049125/1-491 C G C T G A C C A G A A C T C C T C T T C A A G C C A C
74049326/1-484
74049343/1-484
74051000/1-394
74051160/1-381

