



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la región carboxilo terminal de la proteína de
unión a caja TATA de *T. solium***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO MIRANDA BLANCAS



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Abraham Landa Piedra
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra. El trabajo de investigación fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN219711, bajo el nombre de “Estudio de la transcripción de genes de linfocitos y macrófagos de cepas de ratones susceptibles y resistentes, vacunados o no durante la infección causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*”

Asesor:

Dr. Abraham Landa Piedra

Sustentante:

Ricardo Miranda Blancas

Hoja de datos.

1. DATOS DEL ALUMNO

Miranda
Blancas
Ricardo
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología 306128109

2. DATOS DEL TUTOR

Dr.
Abraham
Landa
Piedra

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

4. DATOS DEL SINODAL 2

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

5. DATOS DEL SINODAL 3

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

6. DATOS DEL SINODAL 4

Dr.
Bernardo
Pérez
Zamorano

7. Estudio de la región carboxilo terminal de la proteína de unión a caja TATA de *T. solium* 53 paginas 2013

A mi madre ANA y mi padre EFREN...

Porque lo han sido todo en la vida.

Cada logro y
cada triunfo es para ustedes.

A RODOLFO; TEODORO Y EFREN.

Por llenar de alegría y diversión cada momento.

Y darle sentido a mi vida.

Agradecimientos.

Al Doctor Abraham Landa Piedra, por haberme aceptado para formar parte de su equipo de trabajo, por todas las enseñanzas, los consejos, la paciencia y el tiempo que dedico a este proyecto. Gracias por compartir sus conocimientos durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Alicia, Oscar y Richie por su tiempo y dedicación para enseñarme las técnicas del laboratorio, por esos consejos y observaciones que enriquecieron este trabajo. A Vera, Iván, Omar, Aramis y Lucia por todo el apoyo que me brindaron. Fue muy agradable trabajar con todos ustedes, Gracias por todo.

Agradezco el apoyo y las enseñanzas que obtuve en el Laboratorio de Autoinmunidad en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en donde realice mi taller durante 2 años y aprendí mucho de ustedes Dr. Erasmo Martínez Cordero y todos los integrantes del laboratorio Mariana, Juanita e Iván. Gracias por todo.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, por todos esos momentos que vivimos, porque ustedes le dieron sentido al estudio de la vida. Nash, Miriam, Nadia, Elsa, Maricruz, Mary, Artemisa, Gerardo, Jafet, Socia Ivonne, Lucia, Itzel, Isabel y Monica.

Ray y Hector. Gracias por todos los consejos y toda la ayuda y por estar siempre por allí para los buenos y los malos momentos..

Mitt que siempre estas allí para escucharme, leerme y entenderme, el apoyo incondicional y las inmensas conversaciones que comenzaron en primer semestre y siguen vigentes.

A mi pandilla Liz, Mars, José, Said y Desly por estar conmigo desde siempre y para siempre. Gracias por el apoyo incondicional y todos esos momentos únicos que empezaban con un: “vamos por algo, pero relax”, “pero regresamos temprano” y el famoso “va, pero yo no quiero tomar mucho”.

A mi familia y en especial a mis tíos Isaac y Josué, por todo el apoyo. Gracias.

...pero, inmortalizarla en una lectura es algo muy delicado, se debe tener la habilidad para poder hacer una abstracción de su esencia y poderla plasmar con letras y espacios... Pienso que existen sentimientos que sobrepasan el límite de la realidad y se vuelven parte de lo
inimaginable...

...pero acaso lo inimaginable no es alcanzable, se dice que en un momento todo sueño, pasión y meta es inalcanzable. Pero siempre hay una forma de plasmar en una realidad todo aquello que no podemos tocar, se dice que lleva el nombre de poesía...

Anónimo.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
– Clasificación taxonómica	12
– <i>Taenia solium</i>	12
– Ciclo de vida	15
– Teniasis	17
– Cisticercosis	17
– Diagnóstico de teniasis	18
– Diagnóstico cisticercosis	18
– Tratamientos	19
– Transcripción	20
– RNA polimerasas	20
– RNA polimerasa tipo II	20
– Características de la proteína de unión a caja TATA	22
ANTECEDENTES	24
– TsTBP	24
– Promotores de <i>Taenia solium</i>	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
– Objetivo general	28
– Objetivo particular	28

MATERIALES Y MÉTODOS	29
– Material biológico	29
– Reactivos	29
– Modelo <i>in silico</i>	29
– Alineamiento de secuencias proteicas	29
– Preparación de geles de acrilamida	30
– Preparación de amortiguador de cargado	30
– Solución bloqueadora para inmunoelectrotransferencia	30
– Amortiguador de Tris-Borato-EDTA	30
– Amortiguador de fosfatos	30
– Preparación de proteínas nucleares	30
– Formación de anticuerpos anti-RDNATBPTs	31
– Absorción de anti-TBPC-ter	31
– SDS-PAGE Inmunoelectrotransferencia	31
– Ensayo de retardamiento de movilidad electroforética.	32
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

Abreviaturas.

~	Aproximadamente
2X	Dos veces la concentración
5X	Cinco veces la concentración
50X	Cincuenta veces la concentración
100X	Cien veces la concentración
aa	Residuo aminoácido
A	Adenina
BRE	Elemento de reconocimiento del factor TFIIB
C-terminal	Carboxilo terminal
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico
DPE	Elemento promotor río abajo
G	Aceleración de la gravedad
GTF	Factor general de la transcripción
hr	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
INR	Elemento iniciador
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
µg	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PIC	Complejo de preinicio de la transcripción

Prot	Secuencia de aminoácidos de la proteína
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA _s	Ácido ribonucleico pequeño
T	Timina
TAF	Factor asociado a TBP
TBE	Amortiguador Tris-Borato-EDTA
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TFII	Factor de la transcripción de la RNA polimerasa tipo II
V	Volumen

RESUMEN.

Taenia solium es una especie parásita de cerdos y humanos. Infecta a su hospedero en diferentes estadios de su ciclo de vida, la teniosis es una enfermedad causada en humanos por el parásito en su estado adulto, y su forma larvaria produce cisticercosis en cerdo y humano. Este par de enfermedades son un gran problema de salud pública en países en vías de desarrollo. Actualmente hay líneas de investigación que buscan la manera de intervenir en el desarrollo del parásito, entre las cuales se encuentra la búsqueda de estrategias para modificar la expresión génica de dichos organismos.

La transcripción es un proceso mediante el cual se generan transcritos a partir de un DNA templado, este proceso lo llevan a cabo los tres tipos de polimerasas y un conjunto de factores de transcripción que regulan la expresión de los genes. La proteína de unión a caja TATA (TBP) es uno de los principales factores de transcripción, su función es reconocer las secuencias TATA en los promotores, para iniciar la formación del complejo de transcripción.

En este trabajo se analiza la estructura de la región carboxilo terminal de la TBP de *T. solium*, para determinar si existen cambios significativos respecto a otras TBPs reportadas. Se realizaron alineamientos múltiples para identificar cambios en sus secuencias de TBPs relacionadas y no relacionadas, así como análisis de estructura secundaria y terciaria para identificar estructuras características de la proteína; por último se realizó un ensayo de retardo de movilidad electroforética para caracterizar la unión de una TBP recombinante (RDNATBPTS) con diferentes secuencias de cajas TATA y se probaron anticuerpos anti-RDNATBPTS mediante inmunoelectrotransferencia.

INTRODUCCIÓN.

Clasificación taxonómica.

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: Taenia

Especie: *solium*.

Taenia Solium.

El phylum Platyelminthes incluye cerca de 20,000 especies de vida libre y parásita. La mayoría de los platelmintos son parásitos miembros de las clases Trematoda, Monogenea y Cestoda. El orden Cyclophyllidea incluye 15 familias, entre ellas la familia Taeniidae que se compone de dos géneros: Equinococcus con nueve especies y Taenia que se compone por cerca de 50 especies (Nakao, et al., 2013).

Taenia solium es un céstodo, que pasa por dos estadios antes de llegar a su forma adulta. El desarrollo del parásito comienza a partir de un huevo con un tamaño de ~45 μm (figura 1). La estructura más externa y protectora del huevo es el embrióforo formado por bloques proteicos de queratina unidos entre sí por un material cementante que le da su apariencia estriada. Dentro del mismo se encuentra la membrana oncosferal que rodea al embrión hexacanto.

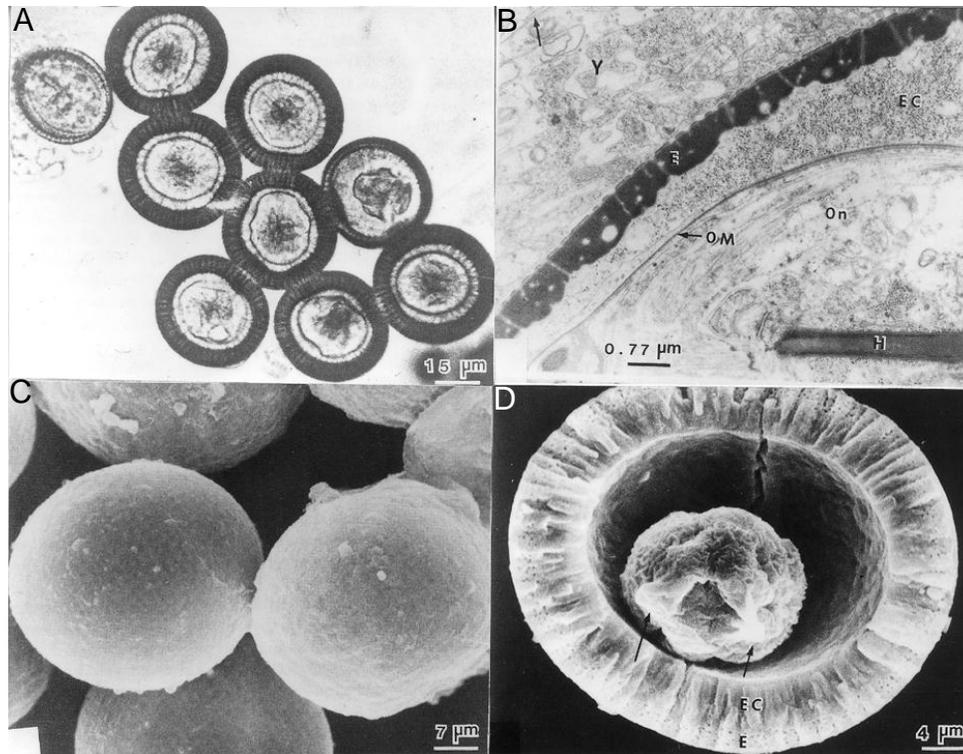


Figura 1. Huevo de *Taenia solium* (Sciutto et al.,2000). **A)** Micrografía óptica. Corte transversal de huevos en el que se observa la apariencia estriada del embrióforo y el embrión hexacanto. **B)** Micrografía de transmisión electrónica de un corte transversal de un huevo inmaduro que muestra las siguientes estructuras: Y yema; E, embrióforo; EC, células del embrióforo; OM, membrana de la oncosfera; On, oncosfera. Micrografías electrónicas de barrido mostrando **C)** huevos con su membrana embrionaria externa y **D)** un huevo roto en el que se observa la oncosfera con sus ganchos (flechas).

La larva o cisticerco está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, con un tamaño de 0.5 a 2 cm, y un escólex invaginado. El cisticerco se desarrolla a su forma adulta en un gusano de forma aplanada que puede medir entre 2 y 8 metros de largo. Su cuerpo está formado por una cabeza o escólex que contiene una doble cadena de 22 a 32 ganchos y 4 ventosas, estas estructuras son utilizadas para fijarse a la mucosa intestinal, específicamente en el yeyuno (Sciutto et al.,2000).

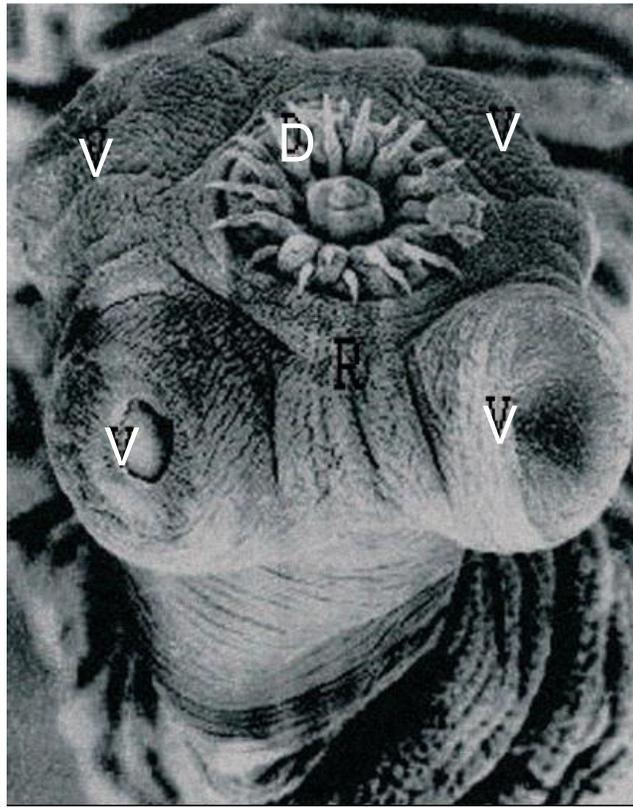


Figura 2. Micrografía electrónica del escólex de *Taenia solium*. Se observa el róstelo con su doble cadena de ganchos y sus cuatro ventosas (Flisser, A., 2006).

El escólex (figura 2) es seguido del cuello, estructura a partir de la cual se forma el estróbilo ó cuerpo de la tenia. El estróbilo está formado por varios cientos de segmentos llamados proglótidos, los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros y aquellos que se encuentran intermedios son los maduros y los más alejados son los proglótidos grávidos que se encuentran llenos de huevos. Cada proglótido es una unidad reproductiva, *T. solium* es un organismo hermafrodita, por lo tanto cada proglótido tiene en su interior órganos sexuales masculinos y femeninos, que llevan a cabo la autofecundación, formando hasta 60,000 huevos en cada proglótido grávido (Flisser et. al., 2011).

1.2 Ciclo de vida.

Un individuo puede adquirir teniasis al consumir carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida con cisticercos vivos, estos cisticercos pasan por el estómago, y al tener contacto con sales biliares y enzimas proteolíticas comienzan a evaginar, al pasar al intestino el cisticerco se adhiere con sus ganchos y sus cuatro ventosas en el primer tercio del intestino delgado. El cisticerco tarda de 3 a 4 meses en completar su desarrollo, llegando al estado adulto con un estróbilo que tiene de 700 a 1000 proglótidos, al terminar su desarrollo los proglótidos grávidos comienzan a ser expulsados en la materia fecal, liberándose hasta 5 proglótidos diariamente. El hospedero intermediario (cerdo) se infecta al ingerir accidentalmente las heces fecales con proglótidos grávidos, los huevos al pasar por su tracto digestivo, la bilis y enzimas proteolíticas disgregan el embrióforo y digieren la membrana de la oncosfera, una vez activado el embrión, cruza la pared intestinal llegando al torrente sanguíneo para ser distribuido por el cuerpo del hospedero (Flisser, 2013). A causa de malos hábitos higiénicos, los humanos pueden adquirir cisticercosis al ingerir accidentalmente huevos de *T. solium*. Cuando los huevos se desarrollan a cisticerco en el sistema nervioso central se produce neurocisticercosis (Del Brutto, et. al., 2013).

Taenia solium, afecta a cerca de 50 millones de personas y es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (Almeida, et. al., 2009). Existen otras especies de importancia médica dentro de este género como son: *T. saginata* y *T. crassiceps* (Flisser, et. al., 2006).

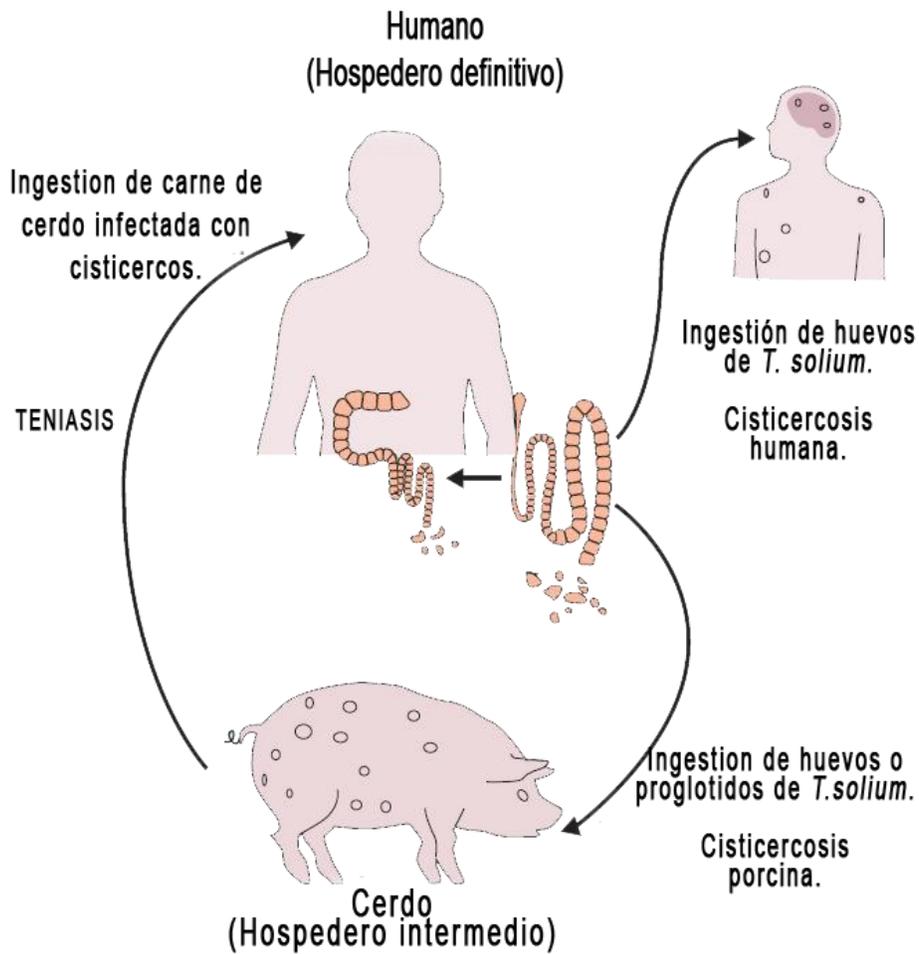


Figura 3. Muestra el ciclo de vida de *Taenia solium* (García, et. al., 2003). El cerdo es el hospedero intermediario que adquiere la cisticercosis al ingerir los huevos del parásito y el humano es el hospedero definitivo que desarrolla la taeniasis al ingerir cisticercos. Accidentalmente el hombre al ingerir huevos desarrolla la cisticercosis.

1.3 Teniasis.

Es una infección producida por los cestodos adultos de la familia *Taenidae*. Existen dos especies que afectan a los humanos: *T. solium* y *T. saginata*, mismas que requieren de dos hospederos intermediarios (cerdo y res, respectivamente) para completar su ciclo de vida. El hombre es el hospedero definitivo obligatorio para ambas tenias (Sarti, 1997). La teniasis por *T. solium* ocurre después de la ingestión de carne de puerco con cisticercos insuficientemente cocida (García, et. al., 2003). La teniasis suele ser asintomática, algunos de los síntomas pueden ser provocados por la producción de sustancias tóxicas por parte del cestodo, los más importantes son irritación de la mucosa intestinal y de síntomas derivados de la toxemia que origina la absorción de los productos metabólicos del parásito como dolor abdominal, diarrea, mareos y cefalea (Orta, et. al., 2000).

1.4 Cisticercosis.

En esta enfermedad los cisticercos suelen localizarse tanto en tejido muscular, esquelético y cardíaco, como en encéfalo e hígado del cerdo (Aluja, et. al., 2000). La cisticercosis porcina, se puede diagnosticar al observar los cisticercos en la superficie de la lengua del cerdo, estos pueden presentar cambios de conducta e hidrocefalia. En el humano infectado la larva puede localizarse en tejido subcutáneo, muscular y en ojo, teniendo predilección por el sistema nervioso, causando la neurocisticercosis (Lombardo, et. al., 1982). La neurocisticercosis es una infección causada por la larva del cestodo de *T. solium*, y es la enfermedad helmíntica más común del sistema nervioso central en humanos (Del Brutto, et. al., 2013). En ocasiones no produce ninguna manifestación clínica, pero en otros casos puede ser tan grave como para causar la muerte del paciente, generando crisis convulsivas en el 70% de los pacientes. La gravedad de la enfermedad depende del número y localización de las lesiones, así como de la respuesta inmune contra el parásito (Sinh, et. al., 2009).

Encuestas serológicas en México han establecido que la seropositividad en población humana abierta es de 1.2%. No está del todo aclarado si esta cifra se refiere únicamente a las personas afectadas por cisticercosis o si incluye los portadores de las tenias. El mayor impacto por infecciones por *T. solium* es por neurocisticercosis; en países endémicos la

proporción de neurocisticercosis en las personas con epilepsia ha demostrado ser más del 29% (People, 2009).

1.6 Diagnóstico de teniasis.

Dos problemas que dificultan el diagnóstico de la infección con *T. solium*: la escasa sensibilidad que tienen las pruebas realizadas, en particular los métodos de flotación para la detección de estructuras del parásito y la similitud morfológica entre los huevos de *T. solium* y *T. saginata* que no permiten la distinción de especie. La morfología de los proglótidos maduros permite la identificación de especies mediante la tinción de hematoxilina-eosina de sus ramas uterinas, *T. solium* presenta menos de 12 ramas uterinas y *T. saginata* contiene más de 15 (Flisser, 2011), el problema de esta técnica es que los proglótidos maduros rara vez están disponibles. La limpieza del intestino con una purga inmediatamente después del tratamiento mejora la recuperación de material como los proglótidos del parásito, incluido el escólex, que permite una identificación de la especie (García, et. al., 2003).

Hasta la fecha, los 2 mejores métodos para la detección de la teniosis, se basan en la detección de coproantígenos utilizando anticuerpos anti-*T. solium* adulto por ELISA, esta prueba detecta moléculas de *T. solium* específicas en muestras fecales, con una sensibilidad de alrededor de 95% y una especificidad de 99% (Allan, et. al., 1996). Asimismo, existe un ensayo de inmunoelectrotransferencia usando antígenos de excreción-secreción de *T. solium* de la forma adulta, estos antígenos son utilizados para detectar anticuerpos en suero del portador de la tenia. Este ensayo tiene una sensibilidad del 95% con una especificidad del 100%, ya que no reconoce anticuerpos relacionados con otras enfermedades por cestodos como *T. saginata*, *Echinococcus granulosus* e *Hymenolepis nana* (Wilkins, et. al., 1999).

1.7 Diagnóstico de cisticercosis.

Actualmente existe un método basado en la detección de anticuerpos en suero, el ensayo se lleva a cabo por la técnica de inmunoelectrotransferencia, la cual utiliza una fracción de glicoproteínas purificadas por cromatografía de afinidad con la lectil-lectin, este método de detección tiene 100% de especificidad y 98% de sensibilidad y no tiene reacción cruzada

con antígenos de otros cestodos que provocan enfermedades en el ser humano (Tsang, et. al., 1989). Este ensayo ha sido utilizado en todo el mundo por más de 15 años para determinar la prevalencia y diagnóstico de cisticercosis (Hancock, et. al., 2004).

Las técnicas de neuroimagen como la Tomografía Axial Computarizada y la Resonancia Magnética Nuclear, son las mejores para el diagnóstico (Del Brutto, et. al., 2006), aunque su uso no es muy común, debido a los altos costos que conlleva hacer este tipo de pruebas.

1.8 Tratamientos.

El prazicuantel es una isoquinolina que fue utilizada por primera vez en 1979, su mecanismo de acción daña el retículo endoplásmico y el tegumento del parásito al modificar el flujo de iones Ca^{2+} y produciendo una parálisis espástica del escólex (Greenberg, 2005), es usado como tratamiento para teniasis y cisticercosis. Para la teniasis el tratamiento consiste en una dosis única de 10 mg/kg por vía oral, suficiente para eliminar a los adultos. En el caso de la cisticercosis, es necesario un tratamiento más largo, generalmente 50 mg/kg al día durante 15 días, para eliminar con éxito los cisticercos en el sistema nervioso debido a que el prazicuantel puede atravesar la barrera hematoencefálica (Montero, et. al., 1997).

El albendazol es un fármaco utilizado para la cisticercosis que interfiere con el mecanismo de absorción de glucosa por la membrana, esto provoca la depleción del glucógeno y finalmente la disminución energética del parásito (Ceballos, et. al., 2013). También inhibe la polimerización de los microtúbulos y la secreción de acetil colinesterasa. El tratamiento para cisticercosis consiste en 15mg/kg por día durante una semana (Sciutto, et. al., 2000).

El oxfendazol es un antihelmíntico de amplio espectro utilizado para tratar las infecciones por helmintos en estado larvario y parásitos gastrointestinales, el tratamiento consiste en una dosis de 30mg/kg. Este fármaco se acopla a la tubulina que forma los microtúbulos, los microtúbulos actúan en la secreción de la mayoría de las enzimas digestivas y los benzimidazoles impiden su funcionamiento normal. Como consecuencia se perturba el proceso digestivo de los helmintos (Mkupasi, et.al., 2013; Iburg, et. al., 2012).

2 Transcripción.

La transcripción es el proceso en el cual el DNA es copiado a RNA por las RNA Polimerasas, generando transcritos. Este proceso está íntimamente involucrado con todos los aspectos de la actividad celular y permite que las células respondan a una gran variedad de vías de señalización particulares que controlan la diferenciación y el desarrollo celular.

2.1 RNA polimerasas.

Existen tres RNA polimerasas que realizan la transcripción del genoma eucarionte y se clasifican como RNAPol I, II y III. Cada RNAPol sintetiza diferentes clases de RNA. La RNAPol I se compone por 14 subunidades, reside en el nucléolo y se encarga de la transcripción de genes que codifican precursores de RNA ribosomal (RNAr) 5.8S, 18S y 28S, y contribuye con la mayor parte de la síntesis de RNA celular. La RNAPol II está compuesta por 12 subunidades y se localiza en el nucleoplasma, sintetiza RNA mensajeros (RNAm) y pequeños RNAs de interferencia (RNAsi). La RNA la RNAPol III se compone de 17 subunidades y transcribe RNAs pequeños nucleares (RNAsH), RNAs de transferencia (RNAt) y RNA ribosomal 5S (RNAr) y cada una de las polimerasas tienen un conjunto de factores generales de transcripción asociados y promotores característicos (Vannini, et.al., 2012).

2.2 RNAPII.

Generalmente la transcripción por RNAPII comienza con la unión de factores regulatorios cerca del sitio de inicio de la transcripción. Estos factores pueden actuar indirectamente en la maquinaria de transcripción por el reclutamiento de factores que modifican la estructura de la cromatina, o directamente al interactuar con los componentes de la maquinaria de transcripción. En cualquiera de los dos mecanismos, directa o indirectamente, el resultado final es el reclutamiento de la maquinaria de transcripción en el núcleo del promotor. Existen elementos en los promotores de los genes como la caja TATA, elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), el iniciador (INR) y el elemento promotor río abajo (DPE). Los factores de transcripción que actúan a través de estos elementos son la proteína de unión a caja TATA (TBP) y sus factores asociados (TAF), así como los factores generales de la transcripción (GTF) (Zhou, et. al., 2009). Esta maquinaria sirve para

posicionar correctamente la RNAPII. Estos factores son necesarios para la iniciación de la transcripción porque se ensamblan en el promotor de los genes que codifican para proteínas y forman el complejo de inicio de la transcripción (PIC), que consiste de RNAPII y factores generales de transcripción (factor de la transcripción de la RNA polimerasa tipo II) TFIIA, TFIIB, TFIID, RFIIE, TFIIF y TFIIH (Tsai, et. al., 2000).

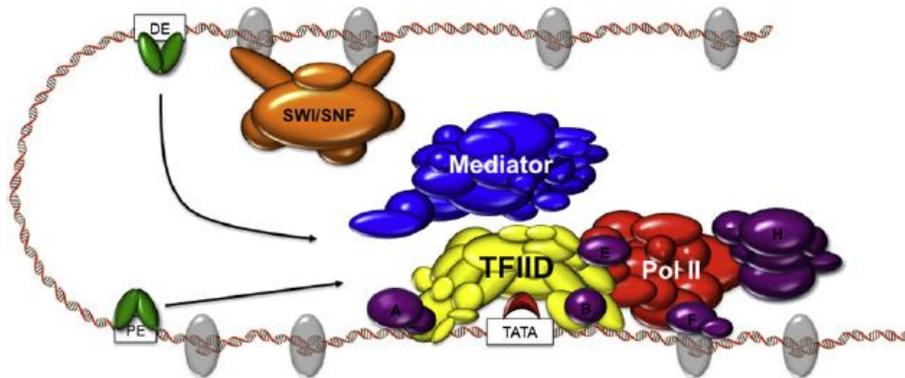


Figura 4. Modelo clásico del complejo de preiniciación de la transcripción. Se muestran secuencias específicas y elementos reguladores para la expresión de genes asimismo se observa el reclutamiento de TFIID (amarillo) en el núcleo del promotor que genera una modificación de la cromatina para que sea posible la unión de otros factores generales de la transcripción como TFIIE, TFIIF, TFIIH que permiten que la RNA polimerasa II comience el proceso de transcripción (D’Alessio, et. al., 2009).

El primer paso para la formación del PIC es el ensamblaje de TFIID, que es un complejo multiproteico que se conforma por TBP y un conjunto de TAFs (Maston, et. al., 2012). Primeramente se une TBP en la secuencia rica en A/T localizada aproximadamente de 25 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción, conocida como caja TATA y el factor TFIIA estabiliza la unión de TBP (Tsai, et. al., 2000). TBP en conjunto con TAFs forman el factor TFIID. Una vez que TFIID está formado, el factor TFIIB se une a la secuencia BRE^u río arriba de la caja TATA, y posteriormente otro factor TFIIB se une a la

secuencia BRE^d localizada río abajo, la unión de TFIIB orienta la dirección correcta para el inicio de la transcripción (Thomas, et. al., 2006). El proceso continúa con la unión de RNAPII, TFIIF, TFIIE y TFIIH respectivamente (Hahn, et. al., 2004). La iniciación de la transcripción comienza con la síntesis del primer enlace fosfodiéster catalizado por la RNA polimerasa (Papai, et. al., 2011; Akhtar, et. al., 2011).

2.3 Características de la proteína de unión a caja TATA.

La proteína TBP es el primer componente de los factores de iniciación de la transcripción clase II y el primero en ser identificado (TFIID específicamente). Participa en la transcripción por los tres tipos de RNAP, por eso es que TBP es conocida como el factor de transcripción universal (Burley, 1996), y ha sido conservado desde las archaeas hasta el hombre.

La estructura primaria de TBP consiste en dos dominios principales, el dominio C-terminal, que es altamente conservado (80% de identidad entre levaduras y mamíferos), que consiste en dos repeticiones que se pliegan formando una estructura con una superficie convexa y otra cóncava. La superficie convexa (C-terminal) se une al surco menor del DNA en la caja TATA e induce un ajuste en la estructura del DNA, mientras que el dominio N-terminal es muy variable, en secuencia y en tamaño (Akhtar, et. al., 2011). Los genes que codifican para la TBP han sido estudiados de organismos muy alejados filogenéticamente, y se sabe que comparten 180 residuos aminoácidos conservados en el segmento C-terminal, siendo este segmento de la proteína el que constituye la región que une al DNA. La proteína TBP se ha caracterizado a partir de la estructura cristalizada de la *Arabidopsis thaliana* y de levaduras. Se sabe que el dominio C-terminal forma una estructura con forma de silla de montar. La superficie inferior (cóncava) de la silla consiste en una estructura curva formada por 10 láminas β antiparalelas, que contienen todos los aminoácidos implicados en la unión a DNA (Kim, et. al., 1994).

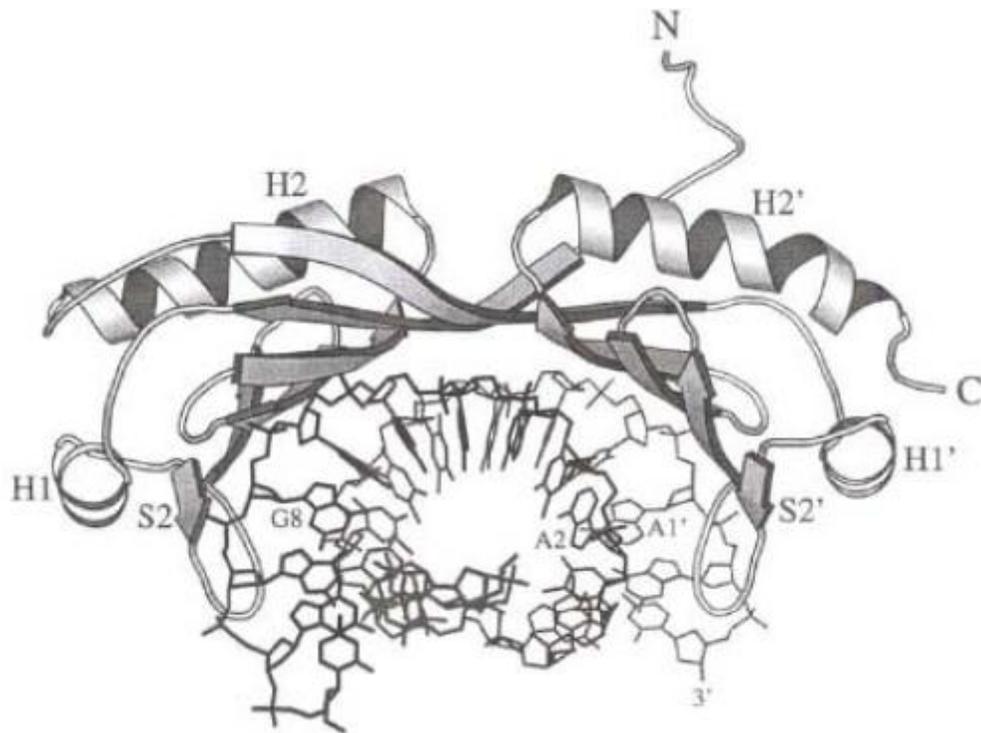


Figura 5. Complejo TBP-TATA Box (Nikolov, et. al., 1994). TBP se compone de un segmento altamente conservado, que comprende dos repeticiones simétricas (dominios TBP) y una extensión N-terminal. En la figura se muestra la unión de TBP-DNA en la superficie cóncava, que corresponde a la región conservada C-terminal. Asimismo en la superficie convexa se señala la región N-terminal (N), que tiene interacción con otros factores de transcripción.

La superficie superior convexa se compone de cuatro hélices α con péptidos básicos, y contiene 18 aa no conservados que corresponden a la región N-terminal, importantes para la interacción con otros factores de transcripción. La estructura secundaria está compuesta por 43% de láminas β (85 aa), 24% hélices α (48 aa), lo que da un 67% de los residuos aminoácidos de la proteína involucrados en la organización de elementos de la estructura secundaria ((Nikolov, et. al., 1994).

3 Antecedentes.

3.1 TsTBP.

Taenia solium posee un gene que codifica para una TBP con una de secuencia nucleotídica de 1461 pb, que presenta 4 intrones de tamaños 76, 208, 69 y 126 pb y 5 exones de tamaños de 421, 442, 105, 96 y 17 pb. Asimismo, un DNAc de cisticerco aislado de una biblioteca de DNAc presentó una secuencia de 919 pb, con un marco de lectura abierto en la base número 37, donde se encuentra el codón de inicio (metionina), y un codón de término en la base número 751 (TAA). La secuencia posee una región 5'UTR de 36 pb y una región 3'UTR de 168 pb con una cola de poliadenilación de 18 bases. La secuencia codifica para una proteína TsTBP de 238 aa, con una peso molecular teórico de 26.7 kDa y un pI teórico de 10.6, esta secuencia primaria coincide en 100% de identidad con la codificada por el gene. La secuencia de aminoácidos fue utilizada para realizar un modelo *in silico*. Dicho modelo muestra que la TsTBP presenta la estructura clásica de “silla de montar”. Análisis computacionales en el promotor proximal del gen para la TsTBP (figura 6) muestran regiones de posibles cajas TATA, asimismo existen posibles secuencias de inicio de la transcripción (Inr) y una posible interacción con el factor de transcripción NF1 (Rodríguez, 2011).

ADNg	AAAATGTTTTAATATCTGGTGTCTATTTCOAACACAGCATTAGCTTATTCTATTGGCATTACCA	120
ADNg	AACAAATGTCACA	240
ADNc	ATTA	10
ADNg	GCAACCCCTCCGGGTTCTGTGAGCAGATGCGACCAACCCCATCAATCAGCTCCTCAGTGTGTTGTCGGGAGCTATGACGCTCCTCCAGTACTCAGGCACATGACAGGCGCCGCTATATCTC	360
ADNc	GCAACCCCTCCGGGTTCTGTGAGCAG	130
Prot	M Q P T P I N Q L V S V V G S Y A A P S S T Q A H S R P P Y T	31
ADNg	CAAACCTCCTGGTACACCATTTCACGAACCGGATGGTGGATACCTCAGCCACAGCTACAgtaagcgtgattttgtccaccgctcactgttgctctcactg	480
ADNc	CAAACCTCCTGGTACACCATTTCACGAACCGGATGGTGGATACCTCAGCCACAGCTACA	191
Prot	P N T P G T P F H E R D G A I P Q P Q L Q	52
ADNg	gtctcttttacttttcagAAACATTGTGTGTACAGTAAATCTTGAGATAGATTGGACTTAAGACGGATAGCTCGGAGCGCCCGTAACGCTGAATACAATCCCAACCGATTGGCCGCGTG	600
ADNc	AAACATTGTGTGTACAGTAAATCTTGAGATAGATTGGACTTAAGACGGATAGCTCGGAGCGCCCGTAACGCTGAATACAATCCCAACCGATTGGCCGCGTG	294
Prot	N I V C T V N L E I R L D L R R I A R S A R N A E Y N P K R F A A V	86
ADNg	ATTATGCGTATTCCGGGAGCCACGAAACCACTGCACCTCATCTTCTCTCCGGCAAAATGGTATGCACCTGGCCCAAAGTGAAAACGAGGCGGCTTTGCTGCGCCGCAAGTACGCTGGAATA	720
ADNc	ATTATGCGTATTCCGGGAGCCACGAAACCACTGCACCTCATCTTCTCTCCGGCAAAATGGTATGCACCTGGCCCAAAGTGAAAACGAGGCGGCTTTGCTGCGCCGCAAGTACGCTGGAATA	414
Prot	I M R I R E P R T T A L I F S G K M V C T G A R K S E N E A R L A A R K Y G A R I	126
ADNg	ATTCAAAAGCTGGGGTTCGATgtaagattcacttttcttggcgctgatcatatatttttcagttacttcatgtgctcagactcactctgtatggttaattatctctgaatttttggc	840
ADNc	ATTCAAAAGCTGGGGTTCGAT	435
Prot	I Q K L G F D	133
ADNg	ctggaacaaaaaa	960
ADNc	ctggaacaaaaaa	446
Prot	A R F K	137
ADNg	AGGTTTTACAATTCAAACATGTTGGGATCCTGTGACCTGCGGTTCCATAATCCGCTCGGAGGCGCTAAACGCTGCACAAAAGAAATTTACCCACgtttcgatcctaagcgagataaagatg	1080
ADNc	AGGTTTTACAATTCAAACATGTTGGGATCCTGTGACCTGCGGTTCCATAATCCGCTCGGAGGCGCTAAACGCTGCACAAAAGAAATTTACCCACA	540
Prot	G F T I Q N H V G S C D V R F H I R L E G L N A A Q K K F T T	168
ADNg	tcttaagcgagacagcagtgtaaaaggagattttctctcttagTATGAACCCGAGTGTGTTCTGGTCTGTTTATGGATGCAAAAGCCCAAGATTGTCTTTTGATTTCGTTTCGG	1200
ADNc	TATGAACCCGAGTGTGTTCTGGTCTGTTTATGGATGCAAAAGCCCAAGATTGTCTTTTGATTTCGTTTCGG	616
Prot	Y E P E L F P G L V Y R M Q K P K I V L L I F V S	193
ADNg	GGAAAATGCTTTAACTGGTAgacactttccatacttgactatatttttggatgaaagcattcgtatgaaatg	1320
ADNc	GGAAAATGCTTTAACTGGT	636
Prot	G K I V L T G	200
ADNg	atctacttttccacttacaggtGCCAAAGTGGAGATGAGATCTATCAAGCCTTCAATAACATCTATCCGATACTGAAGAACCTTTATGAAATTGGATTGAGACAAATCGGGACTGCAT	1440
ADNc	GCCAAAGTGGAGATGAGATCTATCAAGCCTTCAATAACATCTATCCGATACTGAAGAACCTTTATGAAATTGGATTGAGACAAATCGGGACTGCAT	732
Prot	A K V R D E I Y Q A F N N I Y P I L K N F M K L D S D K S G L H	232
ADNg	CAGCCAGCCTTACTGGCTAA	1461
ADNc	CAGCCAGCCTTACTGGCTAA	852
Prot	Q P A L T G	238
ADNc	CAAAATGCTGCATATTCATCTCTGACAGTAGAATTTGTATTGATGTGAAAAA	919

Figura 6. Secuencia genómica de TsTBP. En rojo se muestran las posibles cajas TATA de la secuencia promotora; en verde se señalan los posibles sitios de inicio de transcripción; en azul el codón de inicio (ATG) y subrayado (TAA) el codón de término de la traducción. La línea con DNAg representa la secuencia genómica; DNAc muestra la secuencia codificante; la línea Prot muestra la secuencia de aminoácidos derivados de la TsTBP en letras mayúsculas. Del lado derecho se muestra el número de pares de bases y de aminoácidos. Las regiones vacías en la secuencia DNAc y con letra minúscula en la línea DNAg corresponden a la ubicación de los intrones (Rodríguez, 2011).

3.2 Promotores de *Taenia solium*.

Se han reportado algunos análisis de promotores proximales de genes de *T. solium*. Entre los genes secuenciados y reportados se encuentran dos actinas, pAT5 y pAT6 (Campos, et. al. 1990), una superóxido dismutasa Cu,Zn (Parra, et. al., 2012) y una 2-Cys Peroxiredoxina típica (Vaca, et. al., 2009) de *T. solium* y *T. crassiceps*.

El análisis del promotor proximal del gen de la 2-Cys Peroxiredoxina de *T. solium* contiene dos posibles secuencias de cajas TATA y una secuencia Iniciadora (Inr) localizada 20 pb río arriba del codón de inicio de la transcripción con la secuencia (TGAAATTCC). Este promotor cuenta con sitios putativos para la transcripción de factores NF1 y Sp1, se sabe que estos factores de transcripción pueden interactuar con miembros de la maquinaria de transcripción como TBP y TFIIB, facilitando su activación (Emili, et. al., 1994; Xian, et. al., 1994).



Figura 7. Secuencia promotora de los genes de las 2-CysPRX de *Taenia solium* (Ts) y *T. crassiceps* (Tc). En la secuencia se encuentran señalados los sitios del factor NF1, y la secuencias de caja TATA putativa para *T. solium*, localizada en la posición -30 y en la posición 1 la secuencia iniciadora (Vaca, 2009).

El estudiar a la proteína de unión a caja TATA de *T. solium* (TsTBP), así como su unión a los promotores nos permitirían entender cómo se lleva a cabo la regulación de la transcripción en los cestodos como la *T. solium*.

Hipótesis.

La proteína de unión a caja TATA de *Taenia solium*, se unirá mediante su región carboxilo a los promotores de genes que presenten una caja TATA en la posición adecuada.

Objetivo general:

Caracterización molecular parcial de la región carboxilo terminal de la proteína de unión a la caja TATA de genes de *Taenia solium* (RDNATBPTs).

Objetivos particulares:

- 1.- Modelo *in silico* de la región de la (RDNATBPTs) realizado con el programa Jigsaw 3D.
- 2.- Producción y especificidad de anticuerpos anti-RDNATBPTs hechos en conejos e inmunoelectrotransferencia.
- 3.- Ensayos de unión de la RDNATBPTs recombinante a la caja TATA mediante ensayos de retardamiento y superretardamiento de movilidad electroforética.

Materiales y métodos.

Material biológico.

Las cepas de bacterias utilizadas son de la especie *Escherichia coli*, cepas:

TG1 (*supE44 hsdΔ5 hi Δ(lac-proAB) F [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔm15]*)

BL21 (DE3) *hsdS gal (λcIts857ind1Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)*.

También se utilizaron conejos nueva Zelanda, cisticercos de *T. solium* obtenidos de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente y cisticercos de *T. crassiceps* (cepa WFU) obtenidos del peritoneo de ratones BALC/cAnN hembras inoculados con el parásito.

Reactivos.

El péptido sintético (VRDEIYQAFNNIYPILKNFMKLDSDKSGLHQPALTG) diseñado a partir de la secuencia de aminoácidos de la región C-ter de TBP de *Taenia solium* y sintetizados por la casa comercial Invitrogen.

Sondas utilizadas para el Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (Tabla 1), sintetizadas por Sigma-Aldrich.

Modelo *in silico*.

El modelo *in silico* fue diseñado con la secuencia de 190 aa de RDNATBPTs con el programa Jigsaw 3D de libre acceso en <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/> y anañizado en el programa PyMOL.

Alineamientos de secuencias proteicas.

Fueron realizados por el programa ClustalX2. Las secuencias primarias de las proteínas fueron obtenidas de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Preparación de geles de acrilamida.

- **Gel separador.**

Mezclar 4.2 mL de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 2.4 mL de H₂O, 200 µL de SDS 10%, 66 µL de persulfato de amonio 10%, 6.6 µL de TEMED y cargar en los vidrios de preparación y esperar hasta su polimerización.

- **Gel concentrador.** Mezclar perfectamente 1.3 mL de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 2.4 mL de H₂O, 60 µL de SDS 10%, 20µL de persulfato de amonio 10%, 3 µL de TEMED y cargar encima del gel separador polimerizado y colocar el peine.

Preparación de Amortiguador de cargado (proteínas).

Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% y glicerol 20%.

Solución bloqueadora para inmunoelectrotransferencia.

PBS, Tween 0.3% y leche descremada Svelty de Nestlé al 0.5%.

Amortiguador de Tris-Borato-EDTA (TBE).

1.1M Tris, 900mM Borato, 25mM EDTA, pH 8.3

Amortiguador de fosfatos (PBS).

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

Preparación de proteínas nucleares.

Cisticercos (10gr) de *T. solium* se homogenizaron en 3 volúmenes de amortiguador de lisis (HEPES) con un sonicador de la marca IKA modelo T8.10. El homogenado se filtró a través de gasa estéril y se centrifugo a 1500 x g a 4°C. El precipitado se lavó 3 veces con el mismo amortiguador mencionado y se resuspendió en 4 mL de amortiguador de lisis, se agregó a un tubo conteniendo 10 mL de Ficoll al 5.7% y se centrifugó a 1000 x g por min.

Para la visualización de los núcleos se tomaron 100 μ L de cada fase y se tiñeron con 80 mL de 4',6-diamino-2-fenilidol (DAPI, Sigma, 0.1 mg/mL) en la oscuridad por 15 min, las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon, HFX-DX). Las fases con mayor contenido de núcleos se sometieron a otra ronda de fraccionamiento en Ficoll para obtener un enriquecimiento de núcleos. La preparación se congeló a -70°C hasta su uso.

Formación de anticuerpos anti-RDNATBPTs.

Los anticuerpos policlonales contra la región carboxilo terminal fueron producidos con el péptido (VRDEIYQAFNNIYPILKNFMKLDSDKSGLHQPALTG) que fue inoculado al conejo cada dos semanas en 4 ocasiones, usando 100 μ g del péptido sintético mezclado con saponina 01:01 (v/v). El conejo se sangró 7 días después de la última inmunización, y el suero obtenido se congeló a -20°C . La fracción de inmunoglobulina G (IgG) se purificó a partir del suero de conejo por cromatografía de afinidad utilizando proteína G-agarosa (Sigma) y su especificidad probada por inmunoelectrotransferencia.

Adsorción de suero anti-TBPC-ter.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% para separar los componentes del extracto nuclear de *E. coli* BL21, se cargó el extracto crudo (10 μ g/mm) de gel, se realizó la electroforesis como ya se mencionó antes. Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia durante 1 hora a 100V de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa. Al finalizar la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con PBS. Se colocaron 50 mL de suero anti-TBPC-ter con las membranas de nitrocelulosa y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, las membranas se lavaron 3 veces en PBS y Tween 0.3% y los anticuerpos unidos a las membranas se eluyeron con solución de glicina ácida.

Inmunoelectrotransferencia.

Separaron los componentes (3 μ g/mm) del extracto nuclear de larva de *T. crassiceps* y de *E. coli sin* y con la RDNATBPTs en un SDS-PAGE al 12%. Previo al cargado, se diluyeron las proteínas (1:1) en amortiguador de corrida y se incubó a 100°C durante 5 minutos. El

proceso de electroforesis se llevó a cabo a 100mV, dando tiempo de que el amortiguador de corrida llegue a 1.0 cm antes del final del gel. Unos gel fueron teñidos con azul brillante de Coomassie para observar el patrón de bandeo y otros, geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 100V durante 1 hr. Las membranas de nitrocelulosa, fueron lavadas con PBS y cortadas en tiras. Las tiras se colocaron en charolas de 500 μ L con una solución bloqueadora por 30 minutos, se adicionó el primer anticuerpo anti-TsTBPC-ter en conejo y una γ normal de conejo como control negativo, a una dilución de 1:250 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Después de 1 hora se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agitación utilizando una solución de PBS y Tween 0.3%. Después se colocó el segundo anticuerpo (α peroxidasa de conejo) diluido 1:2000 en PBS y Tween 0.3% y se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 hora con agitación lenta. Después de 1 hora, las membranas se lavan nuevamente 3 veces con PBS y Tween 0.3% y un lavado final con PBS por 5 minutos. Al final los anticuerpos unidos a la membrana se revelaron con 1 mL de solución con 0.005% de diaminobencidina (DAB) y 1 μ L de H₂O₂ al 30% con agitación lenta hasta la aparición de la banda en las membranas (aproximadamente 5 min):

Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

Se realizó un (EMSA) para caracterizar la unión al DNA de la TsTBP utilizando un extracto de *E. coli* que expresa TsTBPC-ter. Este extracto se enfrentó con una sonda de 25 pb que contiene la caja TATA del promotor proximal del gen Ts2-CysPrx con la sonda TATA (TATATTT), asimismo se realizaron competencias con oligonucleótidos con la caja TATA mutada del gen Ts2-CysPrx (TGTGTT), la sonda con la caja TATA consenso del Adenovirus Major Late (TATAAA) y una sonda con la caja TATA mutada con la secuencia (TGTGAA). Las sondas fueron marcadas en el extremo 3' con biotina. Las secuencias completas de las sondas utilizadas se muestran en la Tabla 1. Para el ensayo de EMSA se prepararon geles de poliacrilamida al 5%. Los geles fueron precorrida durante 30 min. La preparación de las muestras se realizó con el estuche LightShift Chemiluminescent EMSA. Se cargaron 20 μ L de cada muestra, para la reacción del superretardamiento, se incubó por 30 min la sonda con el extracto proteico seguido de otra incubación de 30 min con el anticuerpo. Para las reacciones de competencia se agregaron 50 y 100 veces más de

sonda sin marcar. Se corrió el gel a 15 miliamperes durante 1 hora. Después se hace la transferencia a membranas de nylon durante 1 hora a 100V en TBE. Al final se reveló con el estuche detect Biotin-labeled DNA by Chemiluminescence, se calentó el amortiguador de bloqueo y el amortiguador de lavado hasta llegar a 50°C en un baño de agua, se añadieron 16 ml de amortiguador de bloqueo y se incubó con agitación suave durante 15 minutos, se descartó el amortiguador de bloqueo, y se le agregó un conjugado de 50µL de estabilizador de estreptoavidina-peroxidasa en 16 mL de amortiguador de bloqueo y se incubó por 15 minutos con agitación suave. Al terminar la incubación, se transfirió la membrana a un recipiente nuevo y la membrana se enjuagó con 20 mL de amortiguador de lavado durante 5 minutos, el lavado se repitió 5 veces. Se preparó la solución del sustrato quimioluminiscente, que contiene 6 mL de luminol y 6 mL de solución de peróxido. Se coloca la membrana durante 5 minutos en la solución de sustrato quimioluminiscente. Finalmente, se expuso la membrana durante 5 minutos a las placas de rayos X.

Resultados.

En un trabajo previo se obtuvo la secuencia nucleotídica y de aminoácidos del DNAC que codifica para la TBP de *Taenia solium* (TsTBP) (Rodríguez, 2011).

Utilizando la secuencia de la región que une al DNA de la proteína de unión a la caja TATA de *Taenia solium* (RDNATBPTs, 192 aa) se realizó un alineamiento múltiple tipo Clustal. El análisis de la comparación con las regiones carboxilo terminal de varias especies de TBPs con la TsTBP (Figura 8) mostró que estas poseen una alta identidad en esta región, el mayor grado de identidad se encontró con la TBP de *Schistosoma mansoni* y *Homo sapiens* con un 77% y 72% respectivamente. Dos especies no relacionada como *Arabidopsis thaliana* y *Entamoeba histolytica* presentaron una identidad del 68% y 49% respectivamente. En la misma Figura 8, se observa que los aminoácidos que interaccionan con el DNA para el reconocimiento de las secuencias TATA, están altamente conservados en estos organismos (Castañón, et. al., 2010).

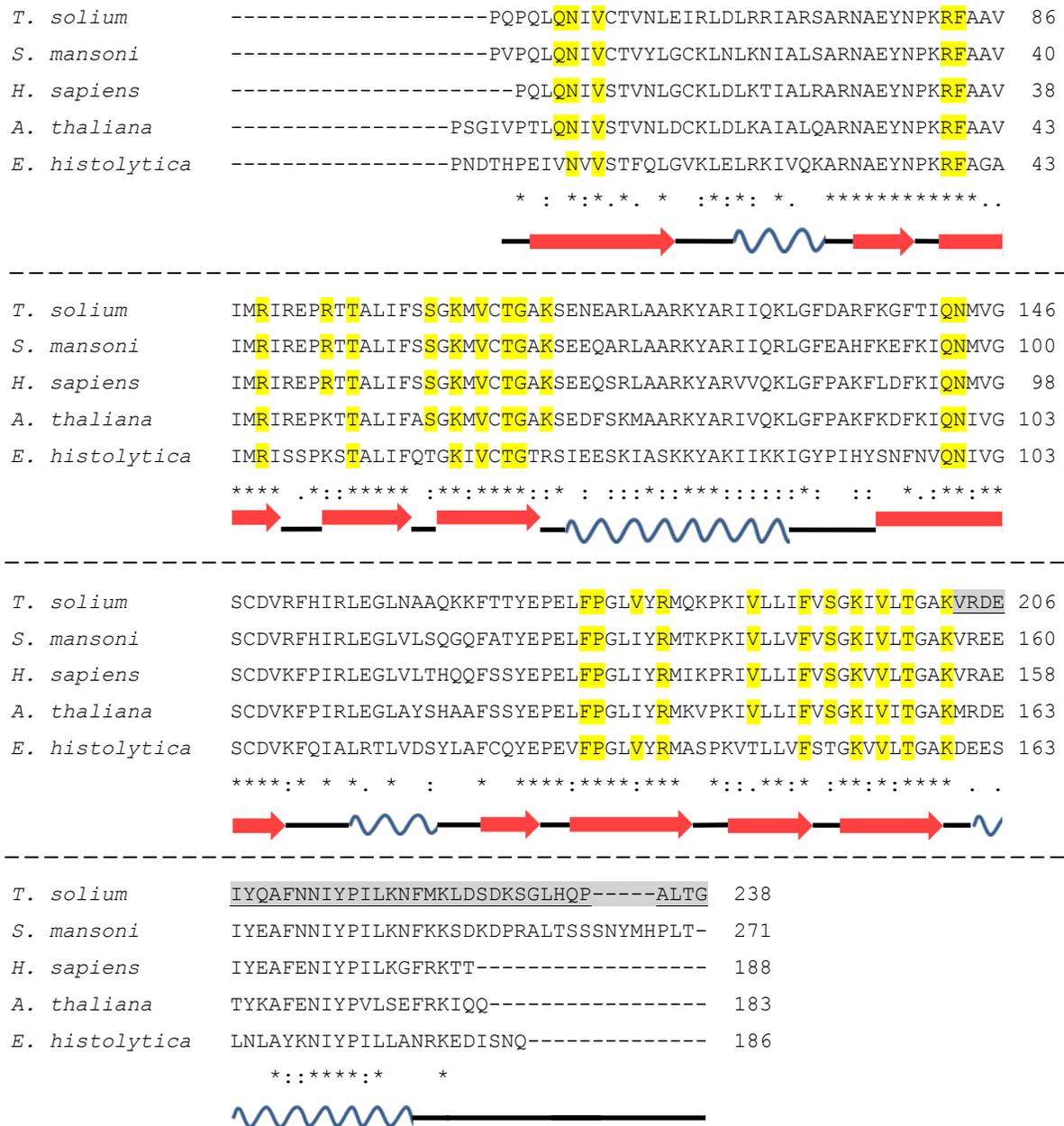


Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias carboxilo terminal de la proteína de unión a caja TATA (TBP) de: *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*, *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica* y *Taenia solium*. Se muestran en amarillo los residuos aminoácidos que interaccionan con DNA. La secuencia marcada en gris es el péptido utilizado para la formación de los anticuerpos anti-TBP de *T. solium*. En la parte inferior se muestra la estructura secundaria de la TBP de *A. thaliana*, las flechas rojas indican la posición de las láminas β dentro de la secuencia primaria y los espirales indican la posición de las hélices α .

Asimismo, la figura 8 muestra la estructura secundaria de las TBPs y se observa que el 94% de los aminoácidos de unión a DNA se encuentran localizados en láminas beta.

Utilizando la secuencia de RDNATBPTs, se construyó un modelo *in silico* que se muestra en la Figura 9. El modelo posee la estructura clásica de la silla de montar que presentan las TBPs, compuesta por 5 hélices α (H) y 8 láminas β antiparalelas (S). En la lámina beta S1 (azul) se localizan los aa (Q52, N53, V55) de unión al DNA conservados en todas las TBPs estudiadas, excepto una posición en la *E. histolytica* que cambia la Q52 por una V, a continuación está la H1 (amarillo), seguida de las láminas S3, S4 y S5 (magenta, rojo y gris) que contienen los aa R89, T96, K104, V106 T108 y G109 de unión a DNA. Las estructuras antes mencionadas junto con las H1 (amarillo) y H2 (morado) forman parte de uno de los dominios altamente básico que unen al DNA. Aquí cabe mencionar que el programa utilizado para realizar el modelo para la RDNATBPTs, no predice la S2. Las láminas S1', S3'-S5' con los aa Q142, N143 en S1' (cian); V178 y R180 en S3' (azul oscuro); V187 y F191 en S4' (verde); K195, V197 y T199 en S5' (amarilla); y H1' (rojo) y H2' (gris) forman el otro dominio básico que une a DNA. Cabe mencionar que en el modelo para la RDNATBPTs, tampoco predice la S2', ya que el programa no la marcó. Finalmente, el modelo predice una hélice extra la H3 (verde) que no se presenta en las otras TBP estudiadas.

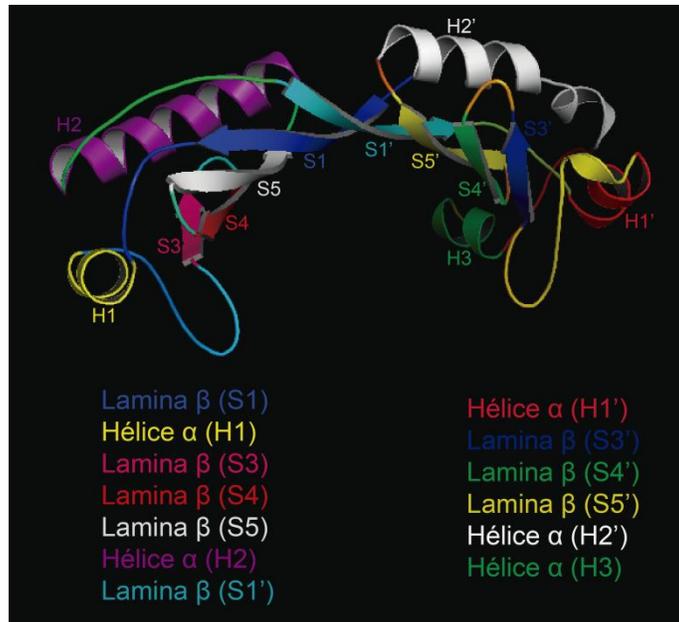


Figura 9. Modelo “*in silico*” de la región que une al DNA de la proteína de unión a la caja TATA de genes de *Taenia solium*. El modelo muestra la estructura de “silla de montar” característica de la región carboxilo de las TBPs. Las láminas β antiparalelas de S1, S3-S5 y S1', S3'-S5' se muestran en colores azul, magenta, rojo, gris, cian, azul oscuro, verde y amarillo respectivamente. Estas forman el dominio cóncavo que interacciona con el DNA. Las 5 hélices α se numeraron como H1, H2, H1', H2' y H3 (colores amarillo, morado, rojo, gris y verde respectivamente).

El péptido sintético (VRDEIYQAFNNIYPILKNFMKLDSDKSGLHQPALTG) ubicado en la RDNATBPTs, se utilizó para producir anticuerpos en conejo. Estos anticuerpos se enfrentaron por la técnica de inmunolectrotransferencia a un extracto crudo de *E. coli* BL21, extracto crudo de *E. coli* BL21 que expresan a la RDNATBPTs, así como a un extracto de proteínas nucleares de la larva de *Taenia crassiceps*. Los anticuerpos anti-RDNATPTs reconocen tres bandas de aproximadamente 25, 30 y 32 kDa en los extractos de *E. coli* (carril 3) y en los extractos nucleares una banda de 28 kDa.

Para hacer más específico el reconocimiento del anticuerpo RDNATBPTs, los anticuerpos del suero fueron adsorbidos con membranas de nitrocelulosa conteniendo un extracto de *E. coli* BL21. La figura 10 muestra que el suero anti-RDNATBPTs adsorbido contra la bacteria, sólo reconoce una banda de 25 kDa en el extracto crudo de *E. coli* BL21 que

expresa la RDNATBPTs (Carril 4), asimismo reconoce la banda de 28 kDa en los extractos nucleares de *T. crassiceps* (carril 6). El suero preinmune enfrentado contra el extracto de *E. coli* BL21 que expresa la RDNATBPTs (carril 2) y nucleares del *T. crassiceps* carriles (carril 5), no reconocieron ninguna banda.

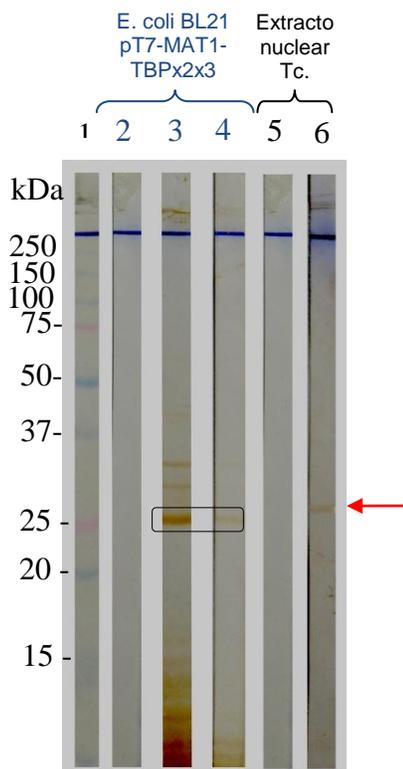


Figura 10. Inmunoelectrotransferencia mostrando la especificidad del suero anti-la región que une al DNA de la proteína de unión a la caja TATA de *Taenia solium* (anti-RDNATBPTs). 1: Marcadores de Peso molecular; 2: suero preinmune contra el extracto de *E. coli* BL21 que produce a la RDNATBPTs; 3: suero anti-RDNATBPTs contra el extracto crudo de *E. coli* BL21 que produce a la RDNATBPTs. 4: suero anti-RDNATBPTs adsorbido contra el extracto de *E. coli* BL21 que produce a la RDNATBPTs; 5: suero preinmune contra extractos nucleares de *T. crassiceps*; 6: suero anti-RDNATBPTs adsorbido contra el extracto de nuclear de *T. crassiceps*.

Para determinar la unión de la TsTBP a la caja TATA del promotor del gene que codifica para la 2-Cys-Prx, se realizaron los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). En este ensayo, la secuencia del promotor se sometió al programa ALGGEN PROMO:([http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi? dirDB=TF_8.3](http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)), que identificó dos posibles cajas TATA (TATATTT y AACATAAA). La posible caja AACATAAA fue descartada por su posición en el promotor del gen. Para identificar si la secuencia TATATTT es la caja TATA funcional, se diseñaron oligonucleótidos de esta posible caja TATA (sonda), de una caja TATA consenso del Adenovirus Mejor Late, así como mutaciones de la posible caja TATA (Tabla 1).

Tabla 1. Sondas utilizadas para el EMSA.

2-CysPRX .	5´ - GCGCTTCGCT TATATTT TGGCGGTAAG - 3´ 3´ - CGCGAAGCGATATA AA CCGCCATTC - 5´
2-CysPRX mutada.	5´ - GCGCTTCGCT TGTGTTT TGGCGGTAAG - 5´ 3´ - CGCGAAGCGACACA AA CCGCCATTC - 5´
Caja TATA consenso.	5´ - AAGGGGGGCT TATAAA AGGGGGTGGG - 3´ 3´ - TTCCCCCG ATATTT TCCCCCACCC - 5´
Caja TATA consenso mutada.	5´ - AAGGGGGGCT TGTGAA AGGGGGTGGG - 3´ 3´ - TTCCCCCG ACACTT TCCCCCACCC - 5´

En la figura 11 se muestran los resultados de un ensayo de EMSA, en el carril 1 se observa una banda de retardamiento debida a la interacción de la RDNATBPTs expresada en el extracto de *E. coli* BL21 con la sonda que contiene la caja TATA del promotor de la 2-CysPrx, en los carriles siguientes (2 y 3), se observa la desaparición de la banda de retardamiento usando las condiciones del carril 1 en presencia de un competidor homólogo (sonda de la 2-CysPrx sin marca) con exceso molar de 50 y 100 veces respectivamente, al final del carril se observa la banda que corresponde a la sonda libre. En el carril 4 se muestra una banda de retardamiento con el extracto de *E. coli* BL21 y una banda de súper retardamiento que se produce por la interacción de la RDNATBPTs, la sonda marcada (2-CysPrx) y el anticuerpo anti-RDNATBPTs. En el carril 6 se observa una banda de retardamiento que se genera con la interacción de la sonda marcada de la caja TATA consenso y el extracto de *E. coli* BL21 que produce la RDNATBPTs recombinante. En el carril 7 se observa la misma banda de retardamiento que se genera en el carril 1 por la interacción de la sonda 2-CysPrx y la RDNATBPTs contenida en el extracto de *E. coli* BL21. En los carriles 8 y 9 se observa que no existe ninguna banda de retardamiento, debido a que la RDNATBPTs no tiene interacción con las sondas de la caja TATA consenso y la 2-CysPrx mutadas.

Tabla 2. Muestra el orden en que se agregó cada uno de los componentes para la realización del EMSA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Extracto <i>E. coli</i> + RDNATBPTs	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Sonda (2-CysPrx A) marcada	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Competidor homólogo 50X	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Competidor homólogo 100 X	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Caja TATA Consenso	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Caja TATA consenso mutada	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sonda (2-CysPrx) mutada	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ab α RDNATBPTs	-	-	-	+	-	-	-	-	-

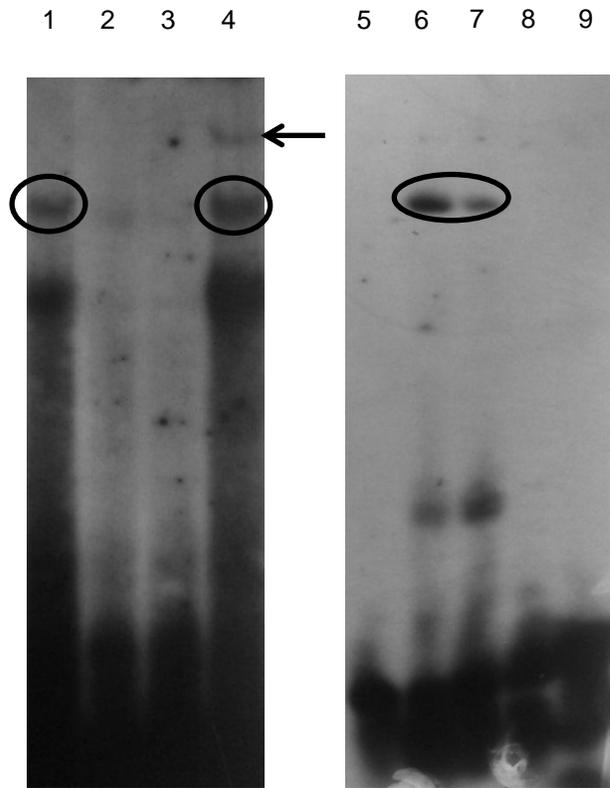


Figura 11. Determinación de la interacción DNA-proteína entre la región C-terminal de la TBP de *Taenia solium* (RDNATBPTs) y el promotor proximal para la 2-CysPrx de *T. solium* (Ts2-Cys-Prx). Los carriles fueron cargados como se muestra en la Tabla 2. Se muestran las bandas de retardamiento (círculos) y la banda de superretardamiento (flecha).

Discusión.

En esta tesis mostramos que la secuencia de 192 residuos aminoácidos que corresponden a la región carboxilo terminal de la proteína de unión a caja TATA de *T. solium* (RDNATBPTs) que une a un promotor con caja TATA de la 2-CysPrx. Esta importante función del reconocimiento de la caja TATA en promotores para poder llevar a cabo el proceso de la transcripción, ha mantenido a este dominio como uno de los más conservados a través de la evolución (Bondareva, et. al., 2003).

El alineamiento múltiple de las TBPs muestra que algunos residuos de aa involucrados en la unión al DNA pueden variar, un ejemplo, es la lisina (K) que se localiza en la posición 51 en *A. thaliana*, y *E. histolytica* y que es sustituida en *T. solium* por una arginina (R), lo que se denomina una sustitución conservada; otro cambio se localiza en la valina (V) de la posición 178 de la TsTBP que se sustituye por una isoleucina (I) en otras TBPs, este tipo de cambios no producen un cambio importante ni en estructura ni en la función de la proteína, debido a que ambos aa corresponden al grupo de aminoácidos básicos, por lo tanto conservan su carga y las estructuras de sus grupos R son muy similares (Nelson, et.al., 2005) . Por otro lado, se observó que los aa que se unen al DNA caen de manera preferente en las láminas beta, lo que coincide con lo reportado en la literatura (Bondareva, et. al., 2003). Esta similitud que existe entre los aa de las distintas TBPs es resultado de la función de unión al DNA que realizan para formar el complejo de inicio de la transcripción (Persengiev, et. al., 2003).

Debido al alto grado de conservación de la región carboxilo terminal en las TBPs, se generó un modelo para la RDNATBPTs tomando como molde a la TBP de *A. thaliana* con la que tiene el 68% de identidad, la cual ha sido cristalizada así como la TBP de *H. sapiens*, cuya estructura forma diez láminas beta antiparalelas y cuatro hélices alfa. El modelo mostró una estructura en forma de “silla de montar” clásica de las TBPs, que se mantuvo aun en ausencia de su secuencia amino terminal (Nikolov, et. al., 1994; Juo, et. al., 1996). Sin embargo, el modelo desarrollado para la RDNATBPTs generado por el programa 3D jigsaw mostró una estructura en forma de silla de montar formada con ocho láminas beta

antiparalelas y cinco hélices alfa, dicho modelo tiene una distribución de láminas beta antiparalelas que concuerda con la descripción de las TBP cristalizada de *A. thaliana* y *H. sapiens*, con la diferencia de que el modelo para la RDNATBPTs no contiene las láminas denominadas S2 y S2'. Para corroborar esto se utilizaron otros dos programas: el Phyre server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>), que muestra un modelo igual al antes mencionado, en contraste con el programa i-tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) si mostró un modelo con 10 láminas beta antiparalelas, que coinciden con el cristal de *A. thaliana* y *H. sapiens*. Para explicar esta desaparición de las láminas S2 y S2' se realizó un análisis de la secuencia de aa que mostró que en la zona que conforman las láminas beta S2 y S2' de la RDNATBPTs existen dos cambios en los aa que deben formar esas láminas, *A. thaliana* presenta la serina 142 e isoleucina 152 que forman los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura (Nikolov, et. al., 1994), en cambio en *T. solium* la serina es sustituida por una treonina y la isoleucina por una valina, estos aa presentan las mismas propiedades con tendencia a formar láminas beta (Fujiwara, et. al., 2012), por lo tanto la estructura no debe variar significativamente. Esto nos permite sugerir que es muy probable que estas secuencias formen láminas beta, de manera que la estructura de la TBP tendría diez láminas beta antiparalelas flanqueadas por 4 hélices alfa, que es la estructura esperada para las TBPs conocidas. Otra diferencia muy interesante observada en los modelos usados para la RDNATBPTs muestran una quinta hélice alfa (H5) que no está en las otras TBPs, lo que abre la puerta a nuevos estudios para esta proteína.

El péptido se diseñó en la región menos conservada del dominio carboxilo terminal de la RDNATBPTs (figura 8) para hacerlo específico para este organismo. Sin embargo, los anticuerpos en ensayos de inmunoelectrotransferencia reconocen, además de la RDNATBPTs expresada por *E. coli* a la TBP de *T. crassiceps*, pero no a la del Humano, lo que sugiere que la región donde se diseñó el péptido se conserva en las Tenias.

Este hallazgo, nos llevó a trabajar con el modelo de *T. crassiceps*, debido a la dificultad para obtener material biológico de *T. solium*. Esto no quiere decir que ya no existe la cisticercosis como algunos autores suponen (Flisser, 2006), sino que la obtención del parásito del cerdo se dificulta aun en lugares donde el organismo es endémico y en rastros, debido a que los cerdos infectados regularmente son escondidos para evitar la confiscación de

los animales, para luego ser vendidos de manera clandestina. En contraste la *T. crassiceps* es un organismo muy relacionado morfológica, bioquímica e inmunológicamente con *T. solium* (Larralde, et. al., 1989; Larralde, et. al., 1990). Esto nos llevó a experimentar con cisticercos de *T. crassiceps*, puesto que contamos con este modelo de cisticercosis en ratón, lo que nos facilitó obtener grandes cantidades de extractos nucleares para realizar los ensayos de inmunoelectrotransferencia para probar el anticuerpo anti- RDNATBPTs (Garcia, et. al., 1995).

Un elemento conservado en los promotores de algunos genes de eucariontes es una secuencia de DNA rica en A/T localizada cerca del inicio de la transcripción del gen, esta secuencia es llamada caja TATA y es reconocida por la TBP. En el caso del promotor de la 2-CysPrx, este gen contiene 2 secuencias tipo TATA que fueron localizados por el programa ALGGEN PROMO, dichas secuencias están localizadas a distancias de -30 y -60 pb a partir la secuencia Inr. La caja con la secuencia AACATAAA a una distancia de -60pb fue descartada como posible caja TATA debido a su localización en el promotor del gen, ya que se localiza a una distancia inusual en eucariontes (Butler, et. al., 2002).

Los ensayos EMSA mostraron que la caja localizada a -30pb del promotor para la 2-CysPrx (TATATTT) resultó ser la correcta. Por otro lado, la RDNTBPTs se unió con mayor afinidad a la caja TATA consenso(Whittington, et. al., 2008) que a la caja TATA del promotor de la 2-Cys-Prx, se podría pensar que la RDNTBPTs tendría una mayor afinidad por el promotor de un gen de *T. solium*, sin embargo, este experimento nos da una idea de cómo es que modificaciones en secuencias reguladoras como el caso de las cajas TATA pueden tener un impacto en la expresión genética, ya que pequeños cambios en la secuencias pueden modificar la formación de los complejos de preinicio de la transcripción

El dominio carboxilo terminal de las TBPs tiene la función de unirse al DNA. Está parte de la proteína ha conservado una estructura en forma cóncava compuesta por láminas beta antiparalelas que al unirse al DNA generan un cambio conformacional, haciéndolo girar en un ángulo de 90°, lo que le permite reclutar otros factores necesarios para la transcripción.

El disponer de los conocimientos de cómo este proceso de la transcripción se regula en las Tenias redundará en el benéfico de poder desarrollar estrategias para combatir y controlar las infecciones por este tipo de parásitos.

Conclusión.

- Los aa del dominio de unión a DNA de la TsTBP se encuentran conservados.
- La RDNATBPTs conserva la estructura clásica de una silla de montar.
- Los anticuerpos anti-RDNATBPTs reconocen a las TBPs de Tenias.
- La RDNATBPTs se une a la caja TATA del promotor de la 2-CysPrx.
- La RDNATBPTs presenta una hélice alfa (H5) adicional con respecto a otras reportadas.
- La caja TATA de 2-CysPrx es la primera descrita para el género Taenia.

Referencias bibliográficas.

- Akhtar W, Veenstra GJ. TBP-related factors: a paradigm of diversity in transcription initiation. *Cell Biosci.* 2011 Jun 27;1(1):23. doi: 10.1186/2045-3701-1-23
- Allan JC, Velasquez-Tohom M, Torres-Alvarez R, Yurrita P, Garcia-Noval J. Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Apr;54(4):352-6.
- Almeida CR, Stoco PH, Wagner G, Sincero TC, Rotava G, Bayer-Santos E, Rodrigues JB, Sperandio MM, Maia AA, Ojopi EP, Zaha A, Ferreira HB, Tyler KM, Dávila AM, Grisard EC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of *Taenia solium* cysticerci using Open Reading Frame ESTs (ORESTES). *Parasit Vectors.* 2009 Jul 31;2(1):35.
- Aluja, A. de, & Villalobos, A. (2000). Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. *Vet. Méx.* Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2000/vm003j.pdf>
- Bondareva AA, Schmidt EE. Early vertebrate evolution of the TATA-binding protein, TBP. *Mol Biol Evol.* 2003 Nov;20(11):1932-9. Epub 2003 Jul 28.
- Burley SK. X-ray crystallographic studies of eukaryotic transcription initiation factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Apr 29;351(1339):483-9.
- Butler JE, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 2002 Oct 15;16(20):2583-92.
- Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gómez E, Hernández R, Willms K, Laclette JP. Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Apr;40(1):87-93.

-Castañon-Sanchez CA, Luna-Arias JP, de Dios-Bravo MG, Herrera-Aguirre ME, Olivares-Trejo JJ, Orozco E, Hernandez JM. Entamoeba histolytica: a unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. Protein Expr Purif. 2010 Mar;70(1):48-59.

-Ceballos L, Virkel G, Elissondo C, Canton C, Canevari J, Murno G, Denegri G, Lanusse C, Alvarez L. A pharmacology-based comparison of the activity of albendazole and flubendazole against Echinococcus granulosus metacestode in sheep. Acta Trop. 2013 Sep;127(3):216-25.

-D'Alessio JA, Wright KJ, Tjian R. Shifting players and paradigms in cell-specific transcription. Mol Cell. 2009 Dec 25;36(6):924-31. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.011. Review.

-Del Brutto OH, Garcia HH. Neurocysticercosis. Handb Clin Neurol. 2013;114:313-25.

-Del Brutto OH, Wadia NH, Dumas M, Cruz M, Tsang VC, Schantz PM. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. J Neurol Sci. 1996 Oct;142(1-2):1-6. Review.

-Del Brutto OH. Neurocysticercosis in infants and toddlers: report of seven cases and review of published patients. Pediatr Neurol. 2013 Jun;48(6):432-5.

-Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. Mol Cell Biol. 1994 Mar;14(3):1582-93.

-Flisser A, Vargas-Parada L y Laclette P, Taenia solium:Un parásito cosmopolita. Investigación y ciencias. P.24-33. 2006.

- Flisser A. State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. Korean J Parasitol. 2013 Feb;51(1):43-9. doi: 10.3347/kjp.2013.51.1.43. Epub 2013 Feb 18.
- Flisser, A. (2006). Where are the tapeworms? Parasitology international, 55 Suppl, S117–20. doi:10.1016/j.parint.2005.11.018
- Flisser, Ana. Cisticercosis: enfermedad desatendida. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.[online]. 2011, vol.68, n.2, pp. 138-145. ISSN 1665-1146.
- Fujiwara K, Toda H, Ikeguchi M. Dependence of α -helical and β -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. BMC Struct Biol. 2012 Aug 2;12:18. doi: 10.1186/1472-6807-12-18.
- García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH; Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. Lancet. 2003 Aug 16;362(9383):547-56. Review.
- Garcia, E., Ordoñez, G., & Sotelo, J. (1995). Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. Journal of clinical microbiology, 33(12), 3324–5.
- Greenberg RM. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? Int J Parasitol. 2005 Jan;35(1):1-9. Epub 2004 Oct 21. Review.
- Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. Nat Struct Mol Biol. 2004 May;11(5):394-403.
- Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, Priest JW, Levine MZ, Tsang VC. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. Mol Biochem Parasitol. 2004

-Iburg TM, Karlsson M, Spång F, Sikasunge CS, Johansen MV. The effect of oxfendazole treatment on muscle pathology in pigs infected with *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2012 Dec 21;190(3-4):442-6.

-Juo ZS, Chiu TK, Leiberman PM, Baikalov I, Berk AJ, Dickerson RE. How proteins recognize the TATA box. *J Mol Biol.* 1996 Aug 16;261(2):239-54.

-Kim JL, Burley SK. 1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. *Nat Struct Biol.* 1994 Sep;1(9):638-53.

-Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *hinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Mar;40(3):282-90.

-Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med.* 1990 Sep;114(9):926-8.

-Lombardo L, Mateos H, Estañol B. La cisticercosis cerebral en México. Memorias del simposio de la Academia Nacional de Medicina. *Gac Méd Mex* 1982;118:1-16

-Maston GA, Landt SG, Snyder M, Green MR. Characterization of enhancer function from genome-wide analyses. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:29-57. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163723. Epub 2012 Jun 11. Review.

-Mkupasi EM, Sikasunge CS, Ngowi HA, Johansen MV. Efficacy and safety of anthelmintics tested against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jul 25;7(7):e2200. doi: 10.1371/journal.pntd.0002200. Print 2013 Jul.

-Montero R, Ostrosky P. Genotoxic activity of praziquantel. *Mutat Res.* 1997 Dec;387(3):123-39. Review

-Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, Haukisalmi V, Konyaev S, Oku Y, Okamoto M, Ito A. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *Int J Parasitol.* 2013 May;43(6):427-37. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.11.014. Epub 2013 Feb 18.

-Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2005). *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4ª edición. Ed. Omega.

-Nikolov DB, Burley SK. 2.1 A resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP). *Nat Struct Biol.* 1994 Sep;1(9):621-37.

-Orta, N.,M., Perez, J.L. y Gimeno, C. “Diagnóstico de las teniasis intestinales”, Programa de Control de Calidad de SEIMC, Hospital San Dureta, Palma de Mallorca, España,2000, pp. 1-9.

-Papai G, Weil PA, Schultz P. New insights into the function of transcription factor TFIID from recent structural studies. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Apr;21(2):219-24. doi: 10.1016/j.gde.2011.01.009. Epub 2011 Mar 21.

-Parra-Unda R, Vaca-Paniagua F, Jiménez L, Landa A. Cu,Zn superoxide dismutase: cloning and analysis of the *Taenia solium* gene and *Taenia crassiceps* cDNA. *Exp Parasitol.* 2012 Jan;130(1):32-8.

-People, L. (2009). Report of the WHO Expert Consultation on Foodborne Trematode Infections and Taeniasis / Cysticercosis, (October).

-Persengiev SP, Zhu X, Dixit BL, Maston GA, Kittler EL, Green MR. TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 9;100(25):14887-91. Epub 2003 Nov 21.

-Rodríguez Lima Oscar, (2011). Tesis de Maestría. Aislamiento y caracterización del gen que codifica para la proteína de unión a caja tata (TBP) de *Taenia solium*. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud pública Méx* [online]. 1997, vol.39, n.3, pp. 225-231. ISSN 0036-3634.

-Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*. 2000 Dec;2(15):1875-90. Review.

-Sinha S, Sharma BS. Neurocysticercosis: a review of current status and management. *J Clin Neurosci*. 2009 Jul;16(7):867-76.

-Thomas MC, Chiang CM. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2006 May-Jun;41(3):105-78. Review.

-Tsai FT, Sigler PB. Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J*. 2000 Jan 4;19(1):25-36.

-Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989 Jan;159(1):50-9.

-Vaca-Paniagua Felipe (2009). Tesis de Doctoral. Estructura del gen de la peroxiredoxina 2-CYS (PRX 2-CYS) de *Taenia solium* y análisis de su región promotora Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Vaca-Paniagua, F., Parra-Unda, R., & Landa, A. (2009). Characterization of one typical 2-Cys peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitology research*, 105(3), 781–7

-Vannini A, Cramer P. Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell*. 2012 Feb 24;45(4):439-46. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.023. Review.

-Whittington JE, Delgadillo RF, Attebury TJ, Parkhurst LK, Daugherty MA, Parkhurst LJ. TATA-binding protein recognition and bending of a consensus promoter are protein species dependent. *Biochemistry*. 2008 Jul 8;47(27):7264-73.

-Wilkins, P. P., Allan, J. C., Verastegui, M., Acosta, M., Eason, a G., Garcia, H. H., Tsang, V. C. (1999). Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(2), 199–204.

-Xiao H, Lis JT, Xiao H, Greenblatt J, Friesen JD. The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res*. 1994 Jun 11;22(11):1966-73.

-Zhou Z, Lin IJ, Darst RP, Bungert J. Maneuver at the transcription start site: Mot1p and NC2 navigate TFIID/TBP to specific core promoter elements. *Epigenetics*. 2009 Jan;4(1):1-4. Epub 2009 Jan 27.