

25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

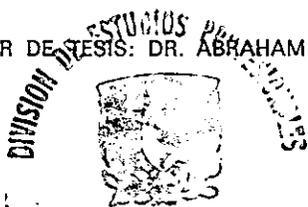
“CLONACION Y CARACTERIZACION DE UN cDNA QUE CODIFICA PARA LA SUBUNIDAD α DE UNA ATPasa TIPO P ($Na^+ \cdot K^+$) DE *Taenia solium*.”

297602

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARCIA BUSTAMANTE ZEPEDA



DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA



MEXICO, D. F.

1999

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Clonación y Caracterización de un cDNA que codifica para la subunidad alfa de una ATPasa tipo P (Na⁺-K⁺) de Taenia solium.

realizado por Bustamante Zepeda Marcia

con número de cuenta 8812961-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. Abraham Landa Piedra
Propietario

✓ Propietario M. en C. Víctor Manuel Valdés López

✓ Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

✓ Suplente Dra. Rosaura Mayén Estrada

✓ Suplente Dra. Virginia León Régagnon

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna Ma. Suarez Diaz

DRA. EDNA MA. SUAREZ DIAZ
Coordinadora de Licenciatura



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Abraham Landa Piedra.

Dedico esta tesis a mis padres, Georgina Zepeda Muñoz y Marcial Bustamante Reyes, por que dedicaron los mejores años de su vida a mi formación y por que gracias a ellos soy quien soy; a mi hermano Jorge por que a pesar de las típicas peleas de hermanos, siempre me regaló momentos divertidos y a mi mamá Rosa por cuidar de mi por muchos años. Gracias por todo.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr Abraham Landa Piedra, por todo el apoyo y la ayuda que me brindó durante mi estancia en su laboratorio, por aguantar mis horarios tan locos y por que pasamos momentos muy amenos gastando bromas mutuas.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Adelaida, Ana, Lucía y Alicia por enseñarme el sazón y los secretos de cocina necesarios en cualquier trabajo experimental.

Gracias al Flaco por su apoyo y compañía incondicional durante todo este tiempo y los momentos compartidos.

A mi queridísimo Atzin, por ser el amigo de toda una vida y formar parte de todas las etapas de mi existencia desde hace mucho tiempo.

Al Emilióforo, por sus consejos y por jalarme las orejas cuando fue necesario.

A la Rana, por ser un buen refugio como excelente amigo y por reprochar mi tardanza en este negocio.

A mi conciencia Chayo, por ser la sal y la pimienta de una gran amistad.

Y gracias especialmente a mi tío Armando, mi tía Rosa y a Lucas por enseñarme que hay que tener metas y sueños para cumplirlos.

INDICE GENERAL

PRESENTACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
1. Biología y Ciclo de Vida de <i>Taenia solium</i>	1
2. Prevalencia de la Cisticercosis	3
3. Síntomas de taeniosis y cisticercosis	4
4. Diagnóstico de taeniosis y cisticercosis	5
5. Tratamiento contra taeniosis y cisticercosis	7
ANTECEDENTES	9
1. Tipos de ATPasas	10
2. ATPasas tipo P	10
3. ATPasa Na ⁺ -K ⁺ , una ATPasa tipo P	13
4. Subunidad α	14
5. Subunidad β	16
6. Acoplamiento entre transporte iónico y transducción de energía	17
7. Inhibidores de la ATPasa Na ⁺ -K ⁺	18
8. Regulación de la actividad de la ATPasa Na ⁺ -K ⁺	19
9. Estructura de la ATPasa Na ⁺ -K ⁺	19
10. La ATPasa Na ⁺ -K ⁺ en Platelminotos	21

OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
1. Material biológico y reactivos	24
2. Geles SDS-PAGE e Inmunoelectrotransferencia	25
3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
4. Obtención y marcaje radioactivo de la sonda	27
5. Tamizaje y aislamiento de clonas positivas	27
6. Preparación de DNA de las clonas positivas	29
7. Digestión con enzimas de restricción	29
8. Ligación	30
9. Transformación	31
10. Preparación de templados	31
11. Secuenciación	33
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	38
ANEXO	42
REFERENCIAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
DAB	3,3'-diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
PBS	Amortiguador de Fosfato de Sodio
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
PMSF	p-Fenil metilsulfonilfluoruro
TLCK	N- α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona
SSC	Solución de Citratos Salina
SM	Amortiguador para preservar bacteriófagos
TAE	Amortiguador de tris-acetato de sodio
TE	Amortiguador de tris-EDTA
IgG	inmunoglobulina G
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	potencial de iones hidrógeno
NC	nitrocelulosa
Kb	kilobase
KDa	kilodaltones
M	molar
mM	milimolar
min	minutos
μ g	microgramos
ng	nanogramos
U	unidades
1X	una vez

RESUMEN

La cisticercosis es una de las enfermedades parasitarias que aún constituye un problema de salud pública en países del Tercer Mundo, incluyendo México. La caracterización de moléculas de parásitos, cuyo uso probable sea útil dentro de las áreas de diagnóstico y/o prevención contra enfermedades, cada vez es más relevante. En el presente trabajo, se ha logrado aislar, clonar y secuenciar un cDNA que codifica para una subunidad α de una ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de *T. solium* a partir de una biblioteca de cDNA construida en λ gt10. El cDNA codificó una proteína de 1014 aminoácidos con un peso de 111,989 Da, cuya secuencia de aminoácidos presentó una identidad de 82% con la secuencia de *S. Mansoni* y 72% con la de humano y otros organismos.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las enfermedades parasitarias siguen constituyendo un problema importante de salud pública en países del tercer mundo de África, Asia y América Latina, incluyendo a México. Dos de estas enfermedades son la cisticercosis y la teniosis, cuya prevalencia es de las más altas en nuestro país, sobre todo en comunidades rurales en donde las condiciones de vivienda e higiene son muy precarias y favorecen la transmisión e infección (Sarti, 1989). En Estados Unidos, se han registrado algunos casos, que han estado relacionados con los inmigrantes de áreas endémicas que laboran en casas habitación de ese país (Botero et al., 1993).

La cisticercosis es causada por el establecimiento de la forma larvaria (cisticerco) de *Taenia solium* en los diferentes tejidos de su huésped intermediario, el cerdo o en el huésped accidental que es el hombre, mientras que la teniosis es el establecimiento de la forma adulta de *T. solium* en el intestino del huésped definitivo, que es el hombre (Malagón, 1989).

BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*.

Taenia solium, es un helminto de cuerpo aplanado color blanquecino, que puede llegar a medir de 2 a 7 m de longitud; su cuerpo consta de un escólex, el cual porta un rostelo con 2 hileras de ganchos y 4 ventosas, que le sirven para fijarse a la pared intestinal; posterior al escólex, se encuentra el cuello del que se originan numerosos segmentos llamados proglótidos, los cuales constituyen la porción corporal última llamada estróbilo. Cada uno de los proglótidos, que pueden ser de 800 a 1000, conforma una unidad de reproducción; los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, por lo que no muestran órganos sexuales diferenciados, los proglótidos un poco más alejados son segmentos maduros, que albergan órganos sexuales masculinos y femeninos, y por último se encuentran los proglótidos grávidos, que son los que

contienen un útero ramificado con huevos en su interior.

El gusano adulto se establece en el intestino delgado, específicamente en el yeyuno, adhiriéndose por medio de sus ganchos y ventosas al epitelio. Este parásito carece de aparato digestivo y se alimenta de las moléculas orgánicas que se hallan en el intestino, las cuales transporta al interior por medio de difusión o transporte activo a través de su superficie tegumentaria, la cual en su parte externa presenta proyecciones digitiformes llamadas microtricas (Cox, 1989; Aluja et al., 1987). Los huevos de *T. solium* miden de 30 a 40µm de diámetro. La cubierta del huevo, el embrióforo, protege a la oncosfera o embrión. Los huevos salen del huésped definitivo dentro de los proglótidos y su desarrollo continúa cuando son ingeridos por el huésped intermediario. La eclosión de los huevos es ayudada por enzimas proteolíticas del huésped, mientras la activación del embrión se debe probablemente a la acción de la bilis (Cox, 1982). La oncosfera una vez libre es capaz de penetrar la pared intestinal, llegando a vasos sanguíneos o linfáticos, cuya corriente la transporta a cualquier tejido, en donde se desarrolla como larva o cisticerco. El cisticerco es un saco membranoso de color blanquecino transparente de unos 5×10mm, que está lleno de líquido y que alberga un escólex invaginado.

Cuando el hombre come carne de cerdo infectado con cisticercos, mal cocida o cruda, el cisticerco evagina gracias a la pepsina, tripsina y sales biliares del huésped y se convierte paulatinamente en una tenia adulta, la cual inicia la liberación de proglótidos con huevos al medio externo, en donde estos pueden ser ingeridos por cualquiera de los huéspedes, ya sea el intermediario o el accidental, cerdo y hombre respectivamente (Fig. 1).

Debido a la naturaleza del ciclo, esta enfermedad representa, tanto en México como en países en vía de desarrollo, un problema de salud pública ya que puede repercutir en la

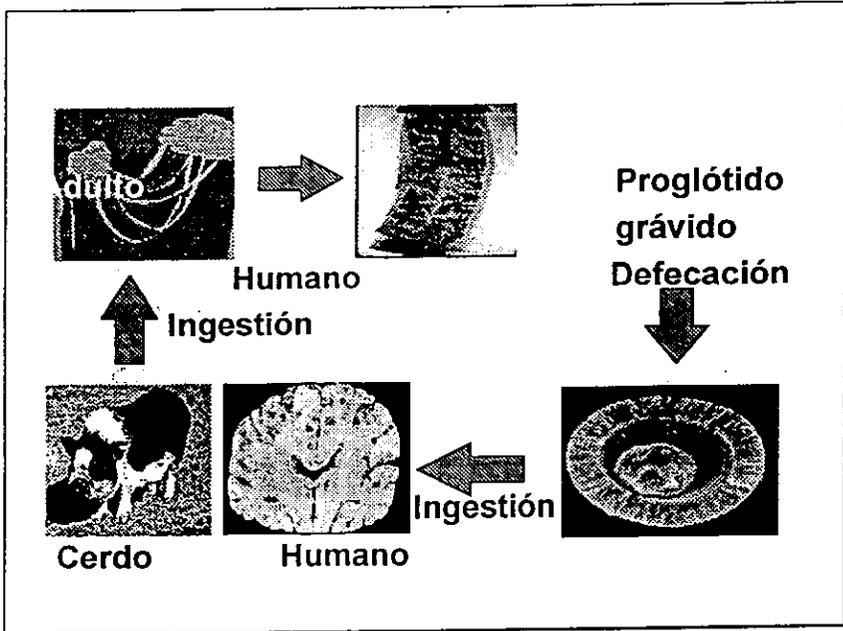


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

productividad y en la salud de personas económicamente activas cuando llega a verse afectado el sistema nervioso central. Asociado a esto, deben considerarse también las pérdidas económicas que causa por el decomiso de cerdos infectados y su posterior desecho como carne destinada al consumo (Infante et al., 1997). El hombre es el único responsable de la dispersión de los huevos del gusano y por lo tanto de la infección de cerdo y hombre, siendo este último el factor decisivo en la transmisión de esta parasitosis, por lo que las medidas de control deben estar dirigidas en primer lugar al diagnóstico y tratamiento de la población humana infectada con el estadio adulto de *T. solium* (Aluja et al., 1987, Díaz-Camacho et al., 1989; Sarti, 1992). Esta enfermedad se ve favorecida ante la exposición a ciertos factores de riesgo como lo pueden ser la convivencia con un portador del gusano adulto, la inadecuada higiene personal, falta de letrinas y agua potable, la coprofagia en cerdos, entre otros (Sarti, 1992; Díaz-Camacho et al., 1989), por lo que podría ser controlada y hasta erradicada dando solución a tales situaciones, de forma que las comunidades fueran provistas de drenajes e inodoros, que los cerdos fueran criados en lugares cerrados y con alimento apropiado, etc. Sin embargo, todas estas medidas implican cuantiosos gastos, no sólo en instalaciones, sino también en educación. Por todo lo anterior, se ha venido buscando otro tipo de solución, que comprende desde un diagnóstico específico para esta parasitosis, así como un tratamiento con drogas cestocidas o una vacuna para su eliminación, tanto en humanos como en cerdos.

PREVALENCIA DE LA CISTICERCOSIS.

La prevalencia de estos parásitos es variable, y depende de: a) la naturaleza de la relación entre seres humanos y cerdos, b) las medidas gubernamentales y comunitarias del manejo y destino de las heces humanas, c) el control de la carne de cerdos parasitados, y d) los procedimientos para identificar y tratar al enfermo portador del parásito (Aluja et al., 1987).

La prevalencia de la cisticercosis humana en México, según dos estudios nacionales seroepidemiológicos fue del 1% (Larralde et al., 1992), encontrando como factores asociados a la prevalencia de esta enfermedad el analfabetismo, el fecalismo al aire libre, desórdenes neurológicos, viviendas en áreas rurales y la crianza rústica de cerdos (Larralde et al., 1992; Aranda-Álvarez et al., 1995). Los estados con mayor porcentaje de seroprevalencia de anticuerpos entre 1987 y 1988, fueron los de Guerrero (2.97%), Zacatecas (2.73%), Guanajuato (2.22%), Jalisco (2.10%), Michoacán (1.42%), Puebla (1.35%) y Estado de México (1.20%), (Larralde et al., 1992). Sin embargo en México, D.F., también hay una alta frecuencia en zonas urbanas, lo cual puede deberse a que los estudios realizados muchas veces se realizan en hospitales ubicados en zonas urbanas, y/o a que en zonas rurales el problema no se diagnostique o notifique (Sarti, 1989).

SINTOMAS DE TAENIOSIS Y CISTICERCOSIS

La mayoría de los individuos infectados con el adulto de *T. solium* suelen presentar síntomas ligeros, como dolor abdominal, pérdida de peso, anorexia o un gran apetito, vómito, diarrea y anemia (Monroy, et al., 1992).

En cuanto a los síntomas presentados por pacientes que padecen cisticercosis, tenemos una gran diversidad, ya que estos dependen básicamente del número, localización, viabilidad de las larvas y respuesta inmune del huésped. La localización más observada de los cisticercos en humanos es el tejido subcutáneo y cerebro, pero también pueden localizarse en ojo, corazón, músculo, hígado, pulmones y médula espinal (Malagón, 1989).

La neurocisticercosis (NCC), es la forma más importante de la cisticercosis, sin embargo existen otras manifestaciones clínicas que van a depender de los criterios ya mencionados

anteriormente. Los síntomas neurológicos en una NCC inactiva, pueden ser causados por la presencia de granulomas, calcificación y fibrosis residual. En una NCC activa, pueden encontrarse cisticercos solitarios o en racimos localizados en diversas regiones del SNC, causando edemas cerebrales con el consecuente aumento de la presión intracraneal, vasculitis, hidrocefalia, compresión de la médula espinal, etc. Tanto la NCC activa como inactiva, puede causar reacciones inflamatorias y lesiones cuya manifestación clínica más común es la epilepsia (Botero et al., 1993).

DIAGNÓSTICO

Hoy en día todavía no se cuenta con una prueba específica para el diagnóstico de enfermedades causadas por céstodos en animales y en el hombre; esto se debe a diversas complicaciones como lo son la reactividad cruzada de antígenos entre parásitos relacionados, intensidad de la respuesta inmune según la fase de infección en el huésped, así como los problemas de sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas tradicionales (Allan et al., 1990).

La mayoría de las veces no es posible hacer un diagnóstico correcto de la teniosis debido a que los métodos utilizados son poco confiables. Entre los métodos de diagnóstico para dicha enfermedad, se cuenta con los análisis coproparasitológicos, los cuales no son óptimos debido a que todos los huevos del género *Taenia* tienen morfología idéntica, y un ELISA para detección de coproantígenos, el cual, según un estudio, es un método diagnóstico confiable aún en el periodo prepatente, es decir, cuando no se expulsan proglótidos, ni se observan huevos por microscopía (Avila et al., 1994). Sin embargo, a pesar de tener una alta sensibilidad y no generar reacciones cruzadas con otros helmintos, no puede distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*. Recientemente también se ha desarrollado una prueba para la detección de huevos en

heces usando técnicas de hibridación de DNA, obteniendo resultados prometedores en cuanto a sensibilidad, y actualmente se está evaluando para distinguir entre huevos de *T. saginata* y *T. solium* (Flisser et al., 1990; Flisser et al., 1997).

Para el diagnóstico de la cisticercosis humana, se cuenta con técnicas físicas representadas por los métodos imageneológicos, como por ejemplo la tomografía computarizada (TC) (García et al., 1994), y la resonancia magnética nuclear (RMN) (Creasy et al., 1994), que son útiles no sólo para confirmar la etiología de la enfermedad, sino también para conocer el número, estadio y localización de los cisticercos, así como la extensión de las lesiones.

También se han implementado diversas técnicas inmunológicas complementarias en México para determinar la presencia de anticuerpos anti-cisticerco, ya sea en suero o líquido cefalorraquídeo: fijación del complemento, inmunoelectroforesis, hemaglutinación indirecta, ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunoelectrotransferencia (IET). El inmunodiagnóstico resulta ser un procedimiento de bajo costo en comparación con los estudios de TC y RMN. Además la presencia de anticuerpos específicos anti-cisticerco pueden confirmar la enfermedad (Flisser et al., 1997). En la década pasada se utilizó el ELISA de manera rutinaria para confirmar el diagnóstico clínico cuando no se cuenta con las técnicas de imagen o sus resultados no son concluyentes. Esta prueba tiene una sensibilidad de 75 a un 90%. Sin embargo, es muy común que esta prueba presente reacciones cruzadas con otros helmintos, ya que como antígeno se emplea un extracto crudo de cisticerco o su fluido vesicular, lo que dificulta un diagnóstico específico. La IET, resuelve el problema de las reacciones cruzadas, al emplear una fracción enriquecida de glucoproteínas purificadas de un extracto crudo de cisticerco, identificando a 7 antígenos específicos (GP 50, 42, 24, 21, 18, 14 y 13 kD). La prueba tiene un 98% de sensibilidad al emplear suero y 95% con LCR, mientras que la especificidad es de 100% en la

clínica cuando se utilizan grupos bien definidos de individuos con la enfermedad (Tsang et al., 1989). No obstante estas ventajas, el requerimiento de un equipo refinado, en comparación con el ELISA, resulta en una difícil aplicación de esta prueba en laboratorios no suficientemente equipados y en especial de zonas rurales (Aluja, et al., 1987).

Hasta ahora, las pruebas serológicas que han sido desarrolladas pueden ser confirmativas, si se encuentran antígenos circulantes del parásito, o presuntivas si se detectan anticuerpos, por lo cual hasta la fecha resulta muy difícil diagnosticar con un 100% de eficiencia la neurocisticercosis y/o teniosis en el hombre, por lo que el objetivo prioritario en este aspecto es desarrollar pruebas lo suficientemente sensibles y específicas para su detección (Monroy et al., 1992).

TRATAMIENTO

Hasta la fecha, el tratamiento de la cisticercosis puede ser sintomático, quirúrgico o farmacológico (Escobedo,1989). El primero está enfocado al control de crisis convulsivas, cefalea, hipertensión intracraneana y alteraciones de la conducta. El tratamiento quirúrgico, consiste en la extirpación de los cisticercos y varía según la localización y las características patológicas de la enfermedad. Sin embargo, no soluciona problemas como los de cisticercos inaccesibles, reacción inflamatoria, etc. Finalmente está el tratamiento farmacológico, tanto para cisticercosis como para teniosis, que ha logrado buenos resultados, empleando medicamentos en casos en los cuales se suponga la existencia de parásitos vivos sobre los cuales actúen (Escobedo,1989). En caso de infecciones intestinales con la fase adulta de *T. solium*, se ha empleado praziquantel y niclosamida (Escobedo,1989). También el praziquantel ha sido empleado en casos de neurocisticercosis, utilizándose en esta última dosis de 15-20mg/kg 3 veces al día por 3 días. Por otro lado, también han sido utilizados 2 fármacos, que

están incluidos dentro del grupo de los llamados benzimidazoles, que son el mebendazol y el albendazol, de los cuales este último ha tenido muy buenos efectos en la reducción del número y tamaño de los cisticercos, dándose dosis de 5mg/kg 3 veces al día por 8 a 30 días (Liu y Weller, 1996). A pesar de los resultados positivos que se han observado con estos medicamentos, se ha empezado a hablar del surgimiento de un nuevo problema que comprende la resistencia antihelmíntica que han desarrollado los parásitos de ciertos tipos de ganado, particularmente contra los benzimidazoles, aunque también contra el praziquantel. Entre los factores que se proponen como facilitadores de la resistencia antihelmíntica destacan: los tratamientos masivos con los fármacos en cuestión, su uso frecuente, el uso de la misma clase de anti-helmínticos por largos periodos y las dosis. Todos estos hallazgos sugieren que el problema de la resistencia antihelmíntica puede extenderse, produciéndose helmintos parásitos de humanos resistentes a través de los tratamientos masivos (Geerts et al., 1997).

Actualmente se está tratando de elaborar una vacuna contra helmintos parásitos, incluyendo una específica para *T. solium* (Pathak y Gaur., 1990; Manoutcharian et al., 1995; Sciutto et al., 1995; Valdés et al., 1994, Vibanco et al., 1999). El mayor reto para lograr una vacuna efectiva, así como para encontrar un mejor método de diagnóstico, es identificar los antígenos adecuados que provean un grado alto de protección o un diagnóstico sensible y específico. En algunos estudios se han utilizado como vacunas antígenos crudos obtenidos de oncosferas, cisticercos o parásitos adultos, obteniéndose diferentes grados de protección (Flisser et al., 1997). Uno de los principales obstáculos en años anteriores era la producción de cantidades suficientes del antígeno deseado a partir de extractos crudos del parásito en cuestión; sin embargo con el desarrollo de las técnicas de DNA recombinante, se ha logrado salvar este obstáculo (Lightowlers 1994). La posibilidad de proteger contra helmintos ya se ha logrado con éxito contra *T. ovis* en ovejas mediante el uso de una vacuna recombinante, usando una proteína

de fusión (To45), logrando 94% de protección (Johnson et al., 1989). Asimismo, se han llevado a cabo ensayos de vacunación usando antígenos de *T. crassiceps* en cerdos con cisticercosis por *T. solium* (Manoutcharian et al., 1996), obteniendo una protección de 96.8%. Estos datos apuntan hacia la posibilidad de producir una vacuna recombinante eficaz contra *T. solium*. Actualmente se busca el antígeno o la combinación de antígenos recombinantes, que reúna las características necesarias para su uso en diagnóstico, o para la elaboración de una vacuna que ofrezca el 100% de protección, y verificar su efectividad en población abierta, donde es importante considerar la heterogeneidad que implica un reto en condiciones naturales, en el que intervienen tanto las variaciones del hospedero (composición genética, nutrición), así como del parásito (variabilidad antigénica) (Manoutcharian et al., 1996; Valdez et al., 1994).

ANTECEDENTES.

Las células de todos los organismos, tanto procariontes como eucariontes, necesitan mantener un equilibrio iónico entre el interior del organismo y el medio externo, ya sea por simple difusión de moléculas no polares y/o moléculas polares pequeñas no cargadas (transporte pasivo), o por transporte de moléculas polares grandes y/o iones a través de proteínas de membrana acarreadoras o formadoras de canales (transporte activo). Este último requiere de energía en forma de adenosin trifosfato (ATP), para llevarse a cabo. Se ha demostrado que estos procesos, de transporte y energía, están íntimamente relacionados al descubrir reacciones de translocación de iones acopladas a la síntesis o hidrólisis de ATP; estos procesos de acoplamiento, son llevados a cabo por una diversidad de enzimas, entre las que se encuentran las ATPasas.

de fusión (To45), logrando 94% de protección (Johnson et al., 1989). Asimismo, se han llevado a cabo ensayos de vacunación usando antígenos de *T. crassiceps* en cerdos con cisticercosis por *T. solium* (Manoutcharian et al., 1996), obteniendo una protección de 96.8%. Estos datos apuntan hacia la posibilidad de producir una vacuna recombinante eficaz contra *T. solium*. Actualmente se busca el antígeno o la combinación de antígenos recombinantes, que reúna las características necesarias para su uso en diagnóstico, o para la elaboración de una vacuna que ofrezca el 100% de protección, y verificar su efectividad en población abierta, donde es importante considerar la heterogeneidad que implica un reto en condiciones naturales, en el que intervienen tanto las variaciones del hospedero (composición genética, nutrición), así como del parásito (variabilidad antigénica) (Manoutcharian et al., 1996; Valdez et al., 1994).

ANTECEDENTES.

Las células de todos los organismos, tanto procariontes como eucariontes, necesitan mantener un equilibrio iónico entre el interior del organismo y el medio externo, ya sea por simple difusión de moléculas no polares y/o moléculas polares pequeñas no cargadas (transporte pasivo), o por transporte de moléculas polares grandes y/o iones a través de proteínas de membrana acarreadoras o formadoras de canales (transporte activo). Este último requiere de energía en forma de adenosin trifosfato (ATP), para llevarse a cabo. Se ha demostrado que estos procesos, de transporte y energía, están íntimamente relacionados al descubrir reacciones de translocación de iones acopladas a la síntesis o hidrólisis de ATP; estos procesos de acoplamiento, son llevados a cabo por una diversidad de enzimas, entre las que se encuentran las ATPasas.

TIPOS DE ATPasas.

Las ATPasas son proteínas transmembranales encargadas del transporte de iones a través de las membranas en contra de su gradiente de concentración mediante la utilización de energía en forma de ATP. Las ATPasas están clasificadas en 3 grandes categorías: ATPasas tipo P, debido a que forman un intermediario fosforilado (en inglés Phosphorilated), como parte de su ciclo de reacción; las tipo V, que fueron encontradas en vacuolas de *Neurospora* y levaduras (de ahí su símbolo), y las tipo F, encontradas en bacterias, cloroplastos y mitocondrias, constituidas por 2 unidades básicamente, F₀ y F₁, (Pedersen y Carafoli, 1987). Entre las características que permiten diferenciar a las distintas clases de ATPasas, se pueden mencionar su modo de acción, su localización en el interior celular, su estructura molecular y su sensibilidad a diferentes inhibidores, entre las más importantes (Tabla 1). En muchos tipos celulares, particularmente eucariontes superiores, las ATPasas tipo P, V y F, están acopladas, de tal manera que las ATPasas tipo F, localizadas en la membrana mitocondrial interna, intervienen en la síntesis de ATP, proporcionando este último a las ATPasas extramitocondriales (tipo V y P), las cuales lo hidrolizan para llevar a cabo su trabajo celular (Pedersen y Carafoli, 1987).

ATPasas TIPO P.

Existen diferentes tipos de ATPasas tipo P, que se caracterizan principalmente por el tipo de ion que transportan (Tabla 2); las clasificaciones de este tipo de ATPasas difieren en cuanto a los criterios que se toman en cuenta para realizar dichas agrupaciones. Basándose en análisis de hidrofobicidad, Lutsenko (1995), propone que las ATPasas tipo P pueden ser divididas en 2 grupos principalmente, según el tipo de iones que transportan; en un primer grupo quedarían, las ATPasas que transportan iones de metales pesados, y otras que transportan iones de metales no pesados, quedando en un grupo aparte la ATPasa KdpB de *E. coli*, que

comparte características estructurales con ambos grupos; por otro lado, el segundo grupo, puede subdividirse en heteroméricas, como por ejemplo las ATPasas $\text{Na}^{\text{-}}\text{-K}^{\text{-}}$ o $\text{H}^{\text{-}}\text{-K}^{\text{-}}$, y en monoméricas como las ATPasas de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Lutsenko y Kaplan, 1995).

Tabla 1. Características principales de las diferentes clases de ATPasas.

ATPasas	Tipo P	Tipo V	Tipo F
Localización celular	En membranas plasmáticas de células eucariontes y retículo endo y sarcoplásmico	En vacuolas, lisosomas, vesículas del Golgi, endosomas, gránulos almacenadores.	En bacterias, mitocondrias cloroplastos.
Unidades catalíticas	Constituidas por una unidad catalítica α y otra unidad β , cada una con diferente función	Constituidas por múltiples subunidades con distinta función cada cadena.	Formadas por una Unidad catalítica F_0 Transportadora de $\text{H}^{\text{-}}$ y Una unidad sintetizadora o degradadora de ATP.
Peso Molecular	De 70-100kDa	Aprox. > 400kDa	Aprox. > 450kDa
Función	Transporte de iones para mantener un gradiente entre el interior y exterior celular	Captura y almacenaje de catecolaminas, serotonina, acetilcolina. Promueven disociación ligando-receptor.	En organismos aeróbicos, participan en la síntesis de ATP ..
Sensibilidad a inhibidores	Inhibidas totalmente por vanadato, pero diferente sensibilidad a DCCD, DES y ouabaina.	Inhibidas por DCCD, DES, Tributiltin, KNO_3 .	Inhibidas por DCCD, DES, oligomicina, cadmio y agentes con mercurio
Homología (secuencias nt)	Significativa homología en cuanto a secuencia; posible ancestro común para todas.		Homología significativa de secuencia entre algunas subunidades de la unidad F_1 .

DCCD, N-Diciclohexilcarbodiimida.

DES, Dietilstilbestrol

Tabla 2. Clasificación de ATPasas tipo P.

Tipo de ATPasa	Localización
Ca ⁺	Retículo sarcoplásmico y membrana plasmática.
H ⁺ -K ⁺	Mucosa gástrica
H ⁺	Plantas y hongos
Cd ⁺ y K ⁺	Bacterias

Por su parte, Møller (1996), subdivide a las ATPasas tipo P en 2 categorías: las ATPasas tipo I, de procariontes, y las tipo II, de eucariontes, basándose en diferencias en cuanto a la organización y distribución de los segmentos transmembranales en la membrana celular (Møller et al., 1996).

Estructuralmente hablando, las ATPasas tipo P, constan de 2 o más subunidades catalíticas, por lo que los pesos moleculares difieren desde 72kDa (ATPasa bacteriana transportadora de Cadmio), hasta 200kDa (ATPasa ATP1 de *Plasmodium* spp.). En todas ellas se han descrito regiones de homología, tales como el sitio de fosforilación (DKTGS/T), el segmento TGDN, en el probable dominio de unión al ATP, y la secuencia MXGDGXNDXP, que conecta al dominio de unión al ATP con los segmentos transmembranales, que están relacionados con la unión a los iones y su translocación (Lutsenko y Kaplan, 1995).

Las características comunes a todas las ATPasas tipo P son un gran dominio hidrofílico inmerso en el citoplasma, el cual contiene los sitios de unión al ATP y de fosforilación, así como una región citosólica más pequeña localizada en la parte amino terminal de la cadena polipeptídica. Estas partes citosólicas están unidas a la membrana por un cierto número de segmentos transmembranales, los cuales difieren en su organización dependiendo de la ATPasa de que se trate (Møller et al., 1996).

La mayor parte del sitio de unión al ATP, está formado por residuos de aminoácidos localizados en el asa citoplásmica más grande (Pedemonte y Kaplan, 1990), mientras que la parte involucrada en la coordinación del transporte de iones está formada por segmentos transmembranales. Sin embargo, el número total de segmentos transmembranales en cada una de las ATPasas tipo P, varía según del tipo de ATPasa. Similitudes en estructura y mecanismos de reacción de las ATPasas tipo P, sugieren que estas enzimas han evolucionado de un ancestro común. De este tipo de ATPasas, sólo la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y la ATPasa de $\text{H}^+\text{-K}^+$, requieren una subunidad β para su actividad normal (Blanco et al., 1994).

ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, una ATPasa tipo P.

El intercambio de Na^+ (3) citoplasmático por K^+ (2) extracelular, es llevado a cabo por la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, una proteína integral de membrana con propiedades catalíticas, la cual mantiene un gradiente de Na^+ - K^+ dentro y fuera de la célula, respectivamente. Este es usado como una fuente de energía para la creación de un potencial de membrana, para la repolarización de tejidos excitables, así como para la regulación de la composición iónica citoplasmática, para mantener el volumen celular y para el transporte activo de glucosa y aminoácidos en contra de sus gradientes de concentración (Shull et al., 1986).

La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, es un heterodímero constituido por 2 subunidades polipeptídicas, la subunidad α de 112 kDa y la subunidad β , la cual es una glicoproteína de 55kD, cuya porción protéica tiene una masa de 35 kDa. Las propiedades catalíticas están asociadas a la subunidad α , la cual tiene el sitio de unión al ATP, el sitio de fosforilación y aminoácidos esenciales para la unión a los iones y a los glucósidos cardiacos (Shull et al., 1986; Lingrel y Kuntzweiler, 1994). Las diferentes isoformas que se han encontrado de cada una de las subunidades, exhiben un

patrón de expresión específico de tejido y del desarrollo, lo que puede ser importante en mantener y regular la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (Blanco et al., 1994).

SUBUNIDAD α .

La subunidad α tiene aproximadamente 1012 aminoácidos con una masa molecular relativa de 110 000, y sus secuencias nucleotídicas en diferentes especies y diferentes tejidos son casi idénticas (Shull et al., 1985) (Fig. 2). Se han identificado 3 isoformas de esta subunidad ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) en vertebrados, que se encuentran en proporciones diferentes en las células de distintos tejidos; tienen igual peso molecular, pero hay diferencias en su composición de aminoácidos y en sus secuencias nucleotídicas, existiendo en estas últimas una homología de hasta un 82%, presentándose las mayores diferencias en el extremo amino terminal.

La isoforma $\alpha 1$, se encuentra prácticamente en todas las células, principalmente en riñón y otros epitelios de transporte de Na^+ , la $\alpha 2$ predomina en músculo esquelético, corazón, neuronas y adipocitos, y la $\alpha 3$, se halla principalmente en tejido nervioso junto con las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, pero también en músculo liso y probablemente en tubos colectores renales (Takeyasu et al., 1990; Skou y Esmann, 1992; Møller et al., 1996). La localización de los aminoácidos del extremo amino de la subunidad α , se encuentra en el lado intracelular de la membrana, y estudios recientes de localización de epítomos para anticuerpos indican que el extremo carboxilo terminal de la proteína también se localiza en el lado citoplásmico de la membrana (Antolovic et al., 1991). Se deduce que el número de segmentos transmembranales son 8 (denominados H1 a H8), y se ha sugerido que tienen una estructura de tipo α -hélice, mientras que el asa intracelular principal, la cual contiene, entre otras cosas, el sitio de unión al ATP en el residuo Lys 501, tiene predominantemente una estructura de β -plegada (Skou et al.,

1992). La subunidad α , también tiene el sitio de fosforilación en la Asp 369, en el lado citoplasmático, pero los sitios de unión al catión no han sido identificados todavía, aunque se sugiere que estos sitios de transporte, tanto para K^+ como para Na^+ , son idénticos y que el transporte es un proceso secuencial (Skou et al., 1992). De este modo, la subunidad α es fosforilada por ATP y sufre cambios conformacionales acompañados por la unión, oclusión y translocación de iones (Blanco et al., 1994). Se ha concluido a partir de estudios de microscopía electrónica de cristales bidimensionales, que uno o más de los dominios hidrofóbicos del extremo carboxilo de la subunidad α , sean los que probablemente estén en contacto con la subunidad β (Shull et al., 1986).

La subunidad catalítica α puede existir al menos en 2 estados conformacionales, y es aparentemente durante la transición entre estos estados que el Na^+ y el K^+ atraviesan la membrana celular. Esta transición conformacional parece involucrar al menos 80 aminoácidos, los cuales sufren una transición entre α -hélice y β -plegada durante cada ciclo de fosforilación y defosforilación. Tanto la unión del Na^+ y el K^+ , los glicósidos cardíacos y el ATP, influyen en el estado conformacional de la enzima, por lo que parece haber una comunicación a través de la molécula, involucrando a los dominios citoplásmicos, transmembranales y extracelulares.

La región amino-terminal, que está en el lado citoplásmico de la membrana, es fuertemente hidrofílica y contiene muchos residuos aminoácidos cargados, incluyendo residuos de Lys altamente conservados, y se ha propuesto que esta región controle el paso de los iones de Na^+ y K^+ a los sitios de unión a cationes en el lado citoplásmico de la proteína. Asimismo, se ha sugerido que las secuencias transmembranales de los segmentos hidrofóbicos H1 y H2, forman parte de un canal iónico; la presencia de varios residuos ácidos entre estas regiones, que podrían servir como sitios de unión a cationes en la superficie extracelular, es consistente con esta

posibilidad. Una fisura extracelular relativamente hidrofóbica entre los segmentos H3 y H4 tienen las características que cabrían esperar en el sitio de unión a digitálicos y está conectado al sitio de fosforilación por una secuencia, la cual puede ser un importante componente del sistema de transducción de energía. La secuencia que se extiende desde el sitio de fosforilación hasta el dominio H4 puede ser una vía de transducción de energía en los dominios transmembranales involucrados en el transporte de cationes. La mayor parte de la proteína, incluyendo el dominio amino terminal, las secuencias entre los segmentos H2 y H3, aquellas entre los segmentos H4 y H5 y el extremo carboxilo terminal, están localizados en el lado citoplásmico de la membrana; muy pocas regiones de la proteína son extracelulares (Shull et al., 1985).

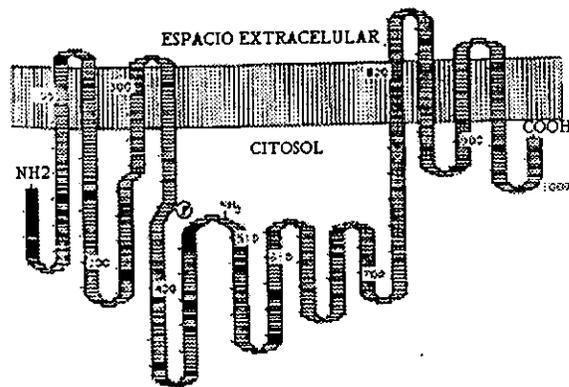


Figura 2. Estructura esquematizada de la subunidad α de una ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$.

SUBUNIDAD β .

La subunidad β consta aproximadamente de 300 aminoácidos con una masa molecular relativa de 55,000. Se han identificado 3 isoformas de esta subunidad (β_1 , β_2 y β_3), entre las cuales se ha encontrado una baja similitud en sus secuencias nucleotídicas. Tienen un sólo

segmento transmembranal cerca del extremo amino de la proteína, el cual está localizado en el lado citoplasmático de la membrana, mientras que el extremo carboxilo está localizado en el lado extracelular. Esta subunidad está considerablemente glicosilada en 3 residuos de Asn del lado extracelular de la membrana, con una masa de azúcares de alrededor de 10 kDa cada uno (Shull et al., 1986; McDonough et al., 1990). Estudios de microscopía electrónica sugieren que una gran parte de la subunidad β , un dominio de aproximadamente 45 kDa, está localizada en el lado extracelular de la membrana (Shull et al., 1986; Lutsenko y Kaplan, 1993). Ciertos trabajos sugieren que el papel que juega la subunidad β es estructural, ya que al parecer es importante para la inserción del complejo $\alpha\beta$ en la membrana (Shull et al., 1986); por su parte, McDonough et al., 1990 sugieren que la subunidad β podría regular, a través del ensamblaje $\alpha\beta$, el número de ATPasas transportadas a la membrana plasmática; otros autores sugieren que esta subunidad, apoya la conformación nativa de la subunidad catalítica α en su función de transporte (Møller et al., 1996). Por otro lado, también se sugiere que podría estar involucrada en la maduración de la enzima y estabilización de la proteína en su forma intermediaria unida a K^+ y que la estructura y conformación del dominio extracelular de esta subunidad, la cual es mantenida principalmente por puentes disulfuro, juega un papel importante en el proceso de unión a los cationes ocluidos (Kirley et al., 1990; Lutsenko et al., 1993).

ACOPLAMIENTO ENTRE TRANSPORTE IÓNICO Y TRANSDUCCIÓN DE ENERGIA

Uno de los modelos más útiles para entender el acoplamiento entre la reacción de hidrólisis y el transporte de cationes es el de Albers-Post (Albers, 1967; Post et al., 1969), en el que se proponen reacciones consecutivas, con una fosforilación dependiente de Na^+ seguida por

una defosforilación dependiente de K^+ . El principio más importante de este modelo son los cambios en las afinidades por los cationes, y la oclusión y declusión de estos mismos gobernadas por la degradación de ATP. La oclusión de K^+ disminuye la afinidad por el ATP, mientras que la unión de Na^+ a los sitios sin oclusión incrementa la afinidad por el ATP. La fosforilación lleva a la oclusión de Na^+ , mientras la defosforilación lleva a la oclusión de K^+ (Skou y Esmann, 1992). Resumiendo, 3 iones Na^+ , se unen a la enzima en el lado citoplásmico y la enzima es fosforilada por ATP, de una manera dependiente de Na^+ , posteriormente, ocurre un cambio conformacional y los sitios de unión al Na^+ son expuestos a la superficie extracelular, siendo liberados los iones e inmediatamente después se unen 2 iones K^+ a la enzima; se lleva a cabo la defosforilación y la unión del ATP acompañados otra vez de un cambio conformacional que permite que el K^+ sea liberado en el citoplasma (Lingrel y Kuntzweiler, 1994). Este proceso resulta en el transporte de 3 iones Na^+ hacia el exterior de la célula y 2 iones K^+ hacia el interior de la célula, por cada ATP hidrolizado.

INHIBIDORES DE LA ATPasa Na^+-K^+ .

Los glicósidos cardíacos (ej. ouabaina, digoxina) son inhibidores específicos de la ATPasa Na^+-K^+ , actuando desde el lado extracelular de la membrana. Estas sustancias difieren en su afinidad, debido a la presencia de las diferentes isoformas de la enzima. El vanadato es un estado de transición análogo del fosfato que se une al sitio de fosforilación en todas las ATPasas tipo P. El K^+ en los sitios citoplásmicos del sistema, promueve la unión del vanadato, mientras que el K^+ extracelular no tiene efecto. El Na^+ en los sitios extracelulares protege contra la unión del vanadato, pero el efecto puede ser revertido por el desplazamiento de los iones Na^+ por iones K^+ . El antibiótico oligomicina inhibe a la enzima por el lado extracelular, pero en contraste con los inhibidores anteriores, no inhibe completamente la actividad de la enzima,

sólo disminuye el nivel de hidrólisis y de transporte (Skou y Esmann, 1992).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa Na⁺-K⁺.

Debido al efecto combinado del Na⁺ citoplásmico y del K⁺ extracelular, y a la inhibición por K⁺ citoplásmico y Na⁺ extracelular, cualquier cambio en los flujos pasivos de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana celular, llevará a cambios compensatorios en el transporte activo de los 2 cationes. La actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺, bajo condiciones normales de concentración de Na⁺ y K⁺ citoplásmico y extracelular, es sólo una fracción de su capacidad máxima. El poder de reserva es importante durante situaciones extremas, por ejemplo durante el ejercicio, donde el músculo gana Na⁺ y pierde K⁺. Se ha observado un efecto estimulante de la actividad enzimática por insulina, epinefrina y la norepinefrina, las cuales pueden jugar un papel durante el ejercicio. Sin embargo, las sustancias antes mencionadas no tienen efecto directo en la ATPasa Na⁺-K⁺ aislada, y la mediación de su efecto en células intactas parece involucrar al AMP cíclico. Las hormonas tiroideas y los corticosteroides también incrementan la actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺, pero el efecto se desarrolla muy lentamente y parece deberse a la síntesis de novo de moléculas de enzima. No se conoce otro efecto de los glicósidos cardiacos aparte de su efecto inhibitor del sistema de transporte. Sin embargo, se ha planteado la posibilidad de la existencia de un factor endógeno parecido a estas sustancias en el plasma que regule la actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺ (Skou y Esmann, 1992).

ESTRUCTURA DE LA ATPasa Na⁺-K⁺.

Todas las actividades catalíticas de la ATPasa Na⁺-K⁺ han sido adjudicadas a la subunidad α , sin embargo, la actividad normal requiere la presencia de la subunidad β . Aunque

hay un acuerdo general sobre que la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ consiste de las subunidades α y β en cantidades equimolares, la estructura cuaternaria y su significado funcional es desconocido (Blanco et al., 1994). Experimentos recientes sugieren que para la actividad catalítica de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, se requiere del contacto estructural entre 2 unidades de $\alpha\beta$, es decir, una estructura $(\alpha\beta)_2$, aunque también se ha visto que una sola unidad $\alpha\beta$ tiene actividad normal, constituyendo la unidad funcional mínima (Hayashi et al., 1989; Skou y Esmann, 1992). Por otro lado, varios estudios han demostrado también que la enzima existe en la membrana plasmática como un oligómero de dímeros $\alpha\beta$. Sin embargo, debido a que el protómero $\alpha\beta$ parece ser catalíticamente competente, existe la posibilidad de que grandes oligómeros sean irrelevantes en cuanto a función (Blanco et al., 1994). La correcta oligomerización no sólo es esencial para la adecuada maduración funcional de la proteína, sino que también es necesaria como señal para salir del retículo endoplásmico (Rose et al., 1988), y esto podría ser un proceso importante para que la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ sea transportada desde el retículo endoplásmico hasta la superficie celular (McDonough et al., 1990).

La subunidad α , sin la subunidad β , tiene actividad catalítica, sin embargo en este caso la subunidad α se fosforila en presencia de Mg^{2+} (ATPasa Mg^{2+}), sin requerir Na^+ o K^+ , y no es afectada por la ouabaina, pero sí por EGTA. Estos estudios sugieren que la subunidad α de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ puede catalizar una actividad que no está normalmente asociada a la enzima y demuestra que la subunidad β juega un papel importante en conferir una actividad normal a la enzima (Blanco et al., 1994). Se ha probado la existencia de asociaciones estables y altamente específicas entre subunidades α que forman complejos oligoméricos ($\alpha\alpha$), esta misma asociación fue demostrada en la enzima nativa de cerebro de rata. Las interacciones $\alpha\alpha$ podrían deberse a colisiones no específicas de protómeros $\alpha\beta$ en las membranas, donde hay una alta

densidad de estos últimos. Aunque estos resultados no dejan claro el papel funcional de las asociaciones $\alpha\alpha$, se hace notar su naturaleza altamente específica y sugiere que la oligomerización de los protómeros $\alpha\beta$ pueden ser importantes para la estabilidad y regulación fisiológica de la enzima. La combinación de las diversas subunidades α y β en la enzima activa, puede dar propiedades funcionales específicas importantes para la regulación o modificación de la actividad enzimática (Blanco et al., 1994).

LA ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ EN PLATELMINTOS

Es evidente que la adaptación de los endoparásitos a diferentes microambientes, los cuales ofrecen distintos recursos metabólicos, requieren de la posesión por parte del parásito, de un sistema de transporte estrictamente regulado. La asimilación de nutrientes y otros metabolitos a partir del medio, se lleva a cabo a través del tegumento en algunos de estos parásitos (ejemplo: Céstodos), por lo que aquellos sistemas enzimáticos relacionados con el transporte de sustancias, pueden ser muy importantes para la supervivencia de los mismos (Sosa et al., 1978). Existen trabajos que dan evidencia de la presencia de actividad de ATPasa, tanto en la superficie expuesta de la membrana vesicular de cisticercos de *T. solium* (Sosa et al., 1978), así como en la superficie externa del tegumento del gusano adulto de esta misma especie (Lumsden et al., 1975). Esto puede ser indicativo de la dependencia enzimática del parásito para su nutrición, por lo que la inhibición de la actividad ATPasa, podría impedir la sobrevivencia del parásito (Sosa, et al., 1978).

Por otro lado, se ha comprobado la existencia de 2 clases independientes de sitios de unión a la ouabaina en *Schistosoma mansoni*, lo cual da una evidencia directa de la existencia de isoformas de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en platelmintos, ya que en mamíferos, la heterogeneidad de

sitios de unión a la ouabaina generalmente se asume que se debe a las diferentes isoformas de la subunidad α de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Esto a su vez sugiere que la duplicación del gen de la subunidad α surgió muy temprano en el proceso evolutivo y no hace 200 millones de años, cuando los mamíferos se separaron de las aves, y se retuvieron la mayoría de las diferencias estructurales específicas de cada isoforma a través de la subsecuente evolución (Souto y Noël, 1994; Takeyasu et al., 1990). Alternativamente, las isoformas de *S. mansoni* (y tal vez las de todos los platelmintos), pudieron evolucionar independientemente (Souto y Noël, 1994).

Sin embargo, a pesar de esta conservación de las isoformas de la subunidad α y en general de las ATPasas tipo P entre las diversas especies, deben existir diferencias específicas importantes, idea que es apoyada por la comparación entre la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de corazón humano y la de *S. mansoni*, en cuanto a la sensibilidad a ouabaina, (Noël y Soares de Moura, 1986), donde se demostró que la enzima del gusano fue más resistente a dicho inhibidor, concluyéndose que debe existir al menos una diferencia estructural entre estas 2 ATPasas $\text{Na}^+\text{-K}^+$. La contribución y el entendimiento del metabolismo del parásito, así como los estudios comparativos de inhibición enzimática en parásitos y hospederos, puede llevar a descubrir nuevos agentes quimioterapéuticos específicos (Cataldi de Flombaum et al., 1981).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Clonar y secuenciar el cDNA que codifica para la subunidad α de una ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ del metacéstodo de *Taenia solium*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

*Preparación de una sonda de DNA para tamizar una biblioteca de cDNA de metacéstodo de *T. solium* construída en λ gt10.

*Clonación y secuenciación de un cDNA que codifique para la subunidad α de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ de metacéstodo de *T. solium*.

*Análisis de la clona aislada y comparación con otras secuencias previamente reportadas de otras especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) MATERIAL BIOLÓGICO

Los metacéstodos de *T. solium* fueron obtenidos por disección del músculo esquelético de cerdos infectados y los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF fueron recuperados de la cavidad peritoneal de ratones de la cepa Balb/c. Los gusanos adultos de *T. solium*, *T. taeniaeformis*, *T. saginata*, *Schistosoma mansoni* fueron donados por varios investigadores. Todos los helmintos fueron lavados con PBS y almacenados a -70° C hasta su uso. Se utilizó una biblioteca de cDNA de estadio larvario de *T. solium* construida en el vector λ gt10. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron la cepa C₆₀₀hfl⁻ (SupE44, thi¹, leuB6, lacY1, tonA21, L-(r_k,m_k⁺)mcrA⁻, hfl⁻) y la cepa XL1-Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB+ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (tet^r)]).

b) REACTIVOS

Las endonucleasas de restricción, ligasa y RNasa utilizadas fueron obtenidas comercialmente de las compañías New England Biolabs y Life Technologies, respectivamente. El vector M13 fue obtenido de New England Biolabs. El estuche para la amplificación del DNA para la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) fue Amplificasa de la casa BIOTECESA y el de TA clonig de la casa InVitrogen Corp. para la clonación. Las membranas de nitrocelulosa (NC), fueron de Millipore Corp. Los estuches de marcaje (Random Primer) y de secuencia (Sequenase V2.0), así como los isótopos utilizados $^{32}\alpha$ -P dCTP y $^{35}\alpha$ -S-dATP fueron de la casa Amersham, Co. Todos los demás reactivos fueron de la mejor calidad disponible

comercialmente. El suero de conejo anti-subunidad α -ATPasa H^+ de *Neurospora crassa* fueron donados por el Dr. Juan Pablo Pardo del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

MÉTODOS

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS.

Aproximadamente 10g de cada uno de los diferentes ténidos se descongelaron rápidamente con PBS-Tritón 1%, EDTA 0.5mM, pH 7.4 y se homogeneizaron en 50ml de amortiguador de extracción (PBS, pH 7.4 conteniendo Tritón X-100 1% y EDTA 0.5mM) en un polytrón (Brinkmann Instruments) a máxima velocidad durante un minuto por 3 veces en hielo. Se centrifugó el homogeneizado a 40000xg durante 15min en una ultracentrífuga TL-100 de Beckman, se colectó el sobrenadante, se dializó contra amortiguador PBS pH 7.4, se hicieron alícuotas y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para los extractos de metacéstodo, se descongelaron 10g con PBS-NaCl 0.35M, pH 7.4, y se homogeneizaron con un amortiguador de extracción de PBS conteniendo 0.35M NaCl, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 0.1mM de TLCK, 2.5mM de EDTA, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Leupeptina, 12mM de 2-mercaptoetanol y 0.006% de PMSE; igualmente el sobrenadante se dializó contra PBS pH 7.4, se hicieron alícuotas y se congelaron hasta su uso.

GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE Y ELECTROTRANSFERENCIA

Se corrieron 10 μg de extractos crudos de diferentes especies de tenias en un gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) al 7.5% para separar los componentes proteicos de cada extracto, los geles se corrieron a 80 mA. Algunos geles fueron teñidos con Coomassie y otros geles fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (NC) bajo las siguientes condiciones: 5 mA

por cm^2 durante 1hr. en una cámara de transferencia semi-seca (mod. Trans blot SD de Bio-Rad Laboratories). La NC con los extractos transferidos fue bloqueada con leche 5% en PBS 1X-Tween 20 al 0.3% durante 1hr. La NC fue cortada en tiras de 3 mm y las tiras se lavaron 3 veces por 5 min. con PBS 1X-Tween 20 al 0.3%. Entonces se procedió a incubar el primer anticuerpo, un suero α -ATPasa H^+ de *Neurospora crassa*, en PBS 1X-Tween 20 al 0.3% a una dilución 1:250 durante 1hr. Pasado este tiempo, se procedió a lavar como se hizo anteriormente y después se incubó con un segundo anticuerpo, α IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en PBS 1X-Tween 20 al 0.3% por 1hr. Después se lavó como ya se describió arriba y se hizo un lavado extra únicamente con PBS 1X durante 5 min. Finalmente, se procedió a revelar con 0.10 mg de diaminobenzidina (DAB) y $5\mu\text{l}$ de H_2O_2 en 50ml PBS 1X durante 5 min., la reacción fue terminada lavando las tiras con agua destilada fría (Towbin, 1979).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Para las reacciones de PCR, se utilizó 100 ng de DNA, 50pm de los iniciadores específicos, 10 μl de amortiguador de PCR 10X, 2 mM de nucleótidos (A, C, G, T), 2 mM de MgCl_2 y 5U de la enzima Taq Polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 100 μl . Las condiciones utilizadas para obtener el fragmento de ATPasa de Na^+ - K^+ que se utilizó como sonda, así como los fragmentos clonados en los vectores utilizados ($\lambda\text{gt}10$, M13 y 2.1pCR) fueron las siguientes: un ciclo de (3 min.-95°C, 1 min.-50°C, 2 min. 72°C), 30 ciclos (1 min.-95°C, 1 min.-50°C, 5min.-72°C), y un ciclo final (1 min.-95°C, 5 min.-50°C, 5min.-72°C). Los iniciadores empleados para la amplificación de los fragmentos contenidos en el vector $\lambda\text{gt}10$ y M13 fueron comprados a la casa (New England Biolabs), y corresponden a secuencias que se encuentran flanqueando los sitios de clonación de ambos vectores. Los

iniciadores específicos AP-1 (ATC-TGC-AGC-GAC-AAG-ACN-GGN-AC) y AP-2 (TGT-CGT-TAA-CAC-CGT-CNC-CNG-T) fueron diseñados a partir de dos regiones que presentan una alta conservación en la secuencia de aminoácidos de varias ATPasas de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$. Las secuencias de aminoácidos de los oligonucleótidos antes mencionados son mostradas en la figura 6.

OBTENCIÓN Y MARCAJE RADIOACTIVO DE LA SONDA.

El fragmento amplificado con los oligonucleótidos AP-1 y AP2 fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa 1% en Tris-acetato (TAE 1X, ver anexo 1), cortado y purificado por perlas de vidrio (Vogelstein y Gillespie, 1979). El marcaje del fragmento se llevó cabo por el método de Random Primer. Brevemente, el fragmento purificado (25 ng) se diluyó hasta un volumen de 20 μ l con agua y se desnaturalizó a 95°C durante 10 min. Después se enfrió en hielo y se le adicionó el amortiguador de marcaje incluido en el estuche, conteniendo 1mM de los desoxinucleótidos (A, G, T), 50 μ Ci del radioisótopo $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, oligonucleótidos al azar y 1U de enzima Klenow y fue incubado a 30°C por 30 min. El fragmento así marcado fue separado del radioisótopo no incorporado, pasándolo a través de una columna de Sefarosa-4B y eluida con amortiguador de TE. Se colectaron fracciones de 0.5ml, de las cuales la fracción 2 y 3, generalmente, contenía la sonda marcada. La actividad específica en las fracciones fue determinada con un contador Beckman, Modelo LS6000TA.

TAMIZAJE Y AISLAMIENTO DE CLONAS POSITIVAS.

Se utilizaron 200 μ l de un cultivo de *E. coli* de la cepa C600hfl⁻, crecido durante toda la noche para infectar con aproximadamente 45,000 fagos de la biblioteca de cDNA del metacéstodo de *T. solium*. La mezcla anterior después de ser incubada a 37°C durante 15 min., se mezcló con agar-SOBM fundido a 48°C y se sembró en 3 cajas Petri de 120 mm de diámetro

con medio SOB sólido. Posteriormente, las cajas se incubaron a 37°C hasta que se observaron placas de lisis (aproximadamente 8hrs.). Las cajas se cubrieron con membranas de nitrocelulosa por 5 min. y se marcaron asimétricamente con tinta china. Este proceso se repitió una vez más con el objetivo de obtener un filtro duplicado. El DNA del fago incorporado a las membranas fue desnaturalizado con una solución de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M, durante 5 min., y neutralizado con una solución de Tris-HCl 1 M y NaCl 1.5 M, pH8 durante otros 5min. Posteriormente, el DNA fue fijado a la membrana con luz ultravioleta en un UV Spectrolinker (Spectronics Corp.), utilizando las condiciones de 1200seg x 100µj x cm² (Sambrook et al.,1989).

Las membranas fueron prehibridadas a 50°C por 4 hrs. con una solución de citratosalina (SSC) 6X, Denhart's 5X, SDS 0.5% y 100µg/ml de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado a 100°C por 5 min. Después de las 4 hrs se cambió la solución por una similar, a excepción del DNA de salmón. Entonces se añadió la sonda marcada y las membranas fueron incubadas a 50°C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas fueron lavadas por tres ocasiones con una solución de SSC 2X y SDS 0.1% a 50°C por 10min. y lavadas una vez con la misma solución a 55°C por el mismo tiempo. Finalmente, las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron expuestas sobre películas radiográficas X-OMAT (Kodak), durante 24hrs.

Las clonas positivas del primer tamizaje, fueron aisladas del agar y resuspendidas en 1ml de medio SM. Después se realizó un segundo tamizaje en donde se sembraron 500-1000 fagos de cada una de las clonas positivas, bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente, un tercer tamizaje fue realizado sembrando alrededor de 100 fagos de cada una de las clonas con el objetivo de aislar cada una de ellas. Las diferentes clonas positivas aisladas

fueron diluidas en 1ml de medio SM.

PREPARACIÓN DE DNA DE LAS CLONAS POSITIVAS.

Se infectaron 200µl de bacterias crecidas toda la noche con cada uno de los fagos positivos de la misma forma como se mencionó anteriormente. Las células infectadas por los fagos fueron sembradas en SOBm-agarosa sólido hasta obtener una lisis total de la bacteria. Los fagos fueron recuperados de la caja adicionando 5 ml de medio SM con agitación lenta durante 1hr. La suspensión recuperada fue tratada con 100µl de cloroformo, mezclada y centrifugada a 6,125Xg en una centrifuga de mesa mod. GP8R de IEC, y el sobrenadante guardado a 4°C. Para la obtención del DNA de fago se tomaron 700µl de esta suspensión a la que se le adicionó un volumen igual de polietilenglicol (PEG) al 20% y se incubó a 4°C durante 1hr. La suspensión fue centrifugada a 16,000Xg por 15min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido fue resuspendido en 200µl de SM e incubado con 2µl de RNAsa A (1mg/ml) y 2µl de DNAsa-I (100µg/ml) durante 30 min. a 37°C. Después se adicionaron 2µl de SDS al 10% y 2µl de EDTA 0.5M de pH8 y se incubó durante 15 min. a 68°C. La mezcla anterior fue extraída con un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1), 2 veces con volumen igual de cloroformo y precipitado con isopropanol frío (1:1). Esto se centrifugó a 16 000Xg durante 10 min. a 4°C y el precipitado se lavó con 100µl de etanol frío al 70%. Finalmente, el precipitado fue secado y resuspendido en 30µl de TE.

DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

Alrededor de 500 ng de DNA (vectores o fragmentos de PCR) se mezclaron con 10µl de buffer 10X (especifico de la enzima de restricción), las reacciones se llevaron a un volumen total de 100µl con agua destilada. Finalmente, se adicionó 1U de cada enzima y se incubaron a

37°C por de 3-6 hrs. Pasado este periodo se precipitó con acetato de sodio 3M y etanol absoluto durante 30 min. a -70°C, después se centrifugó y se desechó el líquido remanente, para después secar la pastilla. La pastilla se resuspendió en 10µl de amortiguador 10X (de la segunda enzima), y se llevó a un volumen total de 100µl con agua destilada. Entonces, se añadió 1U de enzima y se siguió el procedimiento ya descrito arriba. Finalmente, los fragmentos de DNA digeridos se corrieron en un gel de agarosa al 1% y las bandas de interés fueron cortadas del gel y purificadas con perlas de vidrio (Vogelstein y Gillespie, 1979).

LIGACIÓN

a) Vector M13.

Se mezclaron 10 ng del vector M13 y 100ng del fragmento a clonar, después se añadieron 2µl del amortiguador de ligación 10X y 1U de enzima T4 ligasa. Toda la reacción se llevó a un volumen total de 20µl, se incubó a 16°C durante toda la noche y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

b) Vector 2.1 pCR.

Para estas ligaciones se utilizó el estuche de TA cloning de la casa (InVitrogen Corp.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, 100 ng del producto de PCR fresco, se mezclaron con 10 ng del vector 2.1pCR, 1µl de amortiguador de ligación 10X, 1U de enzima T4 ligasa. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10µl, esta mezcla se incubó a 14°C durante toda la noche. Finalmente la reacción fue guardada a -20°C, hasta su empleo.

TRANSFORMACIÓN

a) Vector M13.

Se tomaron 5µl del volumen total de ligación y se mezclaron con 100µl de bacterias competentes XLI-Blue. Las bacterias se incubaron en hielo 30 min., para después someterlas a un choque térmico de 2 min. a 42°C y se mantuvieron en hielo por 2 min. Para la recuperación de las células se adicionaron 900µl de medio SOBМ líquido y se incubaron a 37°C por 30 min. Posteriormente, se sembraron el 10% y el 50% de las células. Las bacterias fueron sembradas utilizando 3ml de Top-SOBМ, conteniendo 75µl de X-gal al 2% en dimetilformamida y 15µl de IPTG 0.1 M, en cajas de medio SOBМ sólido e incubada a 37°C durante toda la noche.

b) Vector 2.1 pCR.

Se realizó como ya se describió para el vector M13, pero después de la recuperación de las bacterias, se procedió a sembrar 100µl del volumen total de bacterias transformadas con X-gal e IPTG en cajas de medio LB con ampicilina (100µg/ml); las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

PREPARACIÓN DE TEMPLADOS.

Vector M13

Para la preparación de templado se colocó una placa positiva en 5 ml de medio SOBМ líquido conteniendo 50µl de la bacteria XLI-Blue de un cultivo de toda la noche y se incubó durante 8 horas. Se centrifugaron 3ml del cultivo a 10,000 Xg durante un minuto y el precipitado bacteriano se desechó. Al sobrenadante obtenido se le adicionaron 600 µl de una solución de polietilenglicol al 20% y NaCl al 2.5%, se mezcló e incubó durante 30 min. a

temperatura ambiente. Al término se centrifugó a 10,000 Xg durante 10 min. a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 100µl de TE y fue extraído con fenol/cloroformo y precipitado como ya se describió anteriormente. Finalmente, el precipitado obtenido de la centrifugación a 4°C fue secado y resuspendido en 25µl de TE. El tamaño y la concentración del templado fueron determinados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El inserto dentro de los templados fue identificado por medio de la PCR empleando oligonucleótidos para la región que flanquea los sitios de clonación del vector M13.

Vector 2.1 pCR

Las clonas de bacterias conteniendo los plásmidos recombinantes fueron crecidas toda la noche en 50ml de LB-ampicilina (100µl/ml). El cultivo bacteriano fue centrifugado durante 10 min. a 6,125Xg por en una centrifuga de mesa mod. GP8R de IEC. El precipitado de bacterias se resuspendió en 200µl de una solución 50mM de glucosa, 10mM EDTA y 25mM de Tris, pH 8.0, se mezcló e incubó 10 min. a temperatura ambiente. Se adicionó 400µl de una solución alcalina de 0.2M de NaOH y 1% de SDS, se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo por 10 min., después se adicionaron 7.5ml de una solución 7.5M de hidróxido de amonio, se mezcló y se mantuvo en hielo 10 min., posteriormente se adicionaron 15 ml de isopropanol frío, se mezcló y se mantuvo en hielo por 10 min. La suspensión se centrifugó a 6,125Xg por 10 min. a 4°C en una centrifuga de mesa mod. GP8R de IEC. La pastilla se resuspendió en 200µl de TE y se le adicionó 2µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 min. La mezcla anterior fue extraída con un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1), 2 veces con volumen igual de cloroformo y aplicado a una columna de sefarosa CL4B con un volumen de cama de 10 ml. (1X6 cm)

equilibrada con TE. Fracciones de 0.5 ml fueron colectadas y la determinación de DNA fue realizada utilizando 5µl de cada fracción. Las fracciones conteniendo el DNA del plásmido fueron precipitadas con 1/10 acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol. La mezcla se centrifugó a 16 000Xg durante 10 min. a 4°C y el precipitado se lavó con 100µl de etanol frío al 70%. Finalmente, el precipitado fue secado y resuspendido en 30µl de TE (Sambrook et al., 1989).

SECUENCIACIÓN

Para obtener la secuencia nucleotídica de los fragmentos clonados, se realizaron purificaciones preparativas de DNA del Vector 2.1 pCR, así como la preparación de templado de cadena doble y sencilla, en el caso de M13 (ver anexo 1).

Para la secuencia se utilizó el método de Sanger, utilizando el estuche T7 Sequenase versión 2.0 (Amersham Co), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se hizo una mezcla con 1µl de DTT, 2µl de la mezcla de reacción, 0.5µl de α -S³⁵-dATP y 1µl de la enzima sequenasa. Esto se adicionó a 3µl (500 ng) del DNA plasmídico o DNA de cadena sencilla de fago M13, previamente mezclado con 1µl del iniciador específico (10pm/µl), y se incubó 5min. a temperatura ambiente. Después se tomaron 3.5µl de esta mezcla y se le adicionaron a 2.5 µl de cada dideoxinucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), por separado e inmediatamente se incubó a 45°C por 5 min. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo 4µl de solución de terminación y las reacciones se almacenaron a -20°C hasta su uso. La reacción de secuencia para el DNA plasmídico, se llevó a cabo en un volumen final de 4.5 µl, desnaturizando el DNA con 0.5 µl de una solución alcalina de NaOH 1 M 0.5. Se corrieron 3µl de cada una de las reacciones de secuencia en geles de acrilamida al 6%, con un grosor de

4mm, a 55watts, en una cámara de secuencia modelo S2 (Gibco BRL Sequencing System). Pasado el tiempo de corrida, se procedió a fijar el gel en una solución de ácido acético y metanol al 10% durante 15 min. y a secarlo. Finalmente se expuso en placas autoradiografía X-OMAT (Kodak), durante 24-36hrs (Sanger, 1977). Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas en el programa computacional Pcgene (Intelligenetic Corp.).

RESULTADOS.

La utilización de la técnica de inmoelectrotransferencia y el disponer de un suero en contra de la subunidad α -ATPasa H^+ de *N. crassa* que presenta reacciones cruzadas con las subunidades α de varias ATPasas tipo P, nos permitió identificar una banda de alrededor de 100kDa en los extractos de varios ténidos: *T. solium* (metacéstodo y adulto), *T. taeniaeformis* (metacéstodo y adulto), *T. crassiceps* (metacéstodo), y *T. saginata* (adulto) (Figura 3). En esta misma figura se muestra que el suero preinmune del mismo conejo utilizado como control negativo, no reconoció ninguna banda en los extractos ensayados. Este resultado sugiere que la banda de 100 kDa encontrada podría corresponder a una de las isoformas de la subunidad α que integran las ATPasas de tipo P en los ténidos antes mencionados, incluyendo *T. solium*. En un principio se pensó en utilizar los anticuerpos como sonda para aislar la subunidad α de la ATPasa Na^+-K^+ a partir de bibliotecas de expresión de *T. solium* clonadas en el vector λ gt10, sin embargo, esta idea se descartó debido al conocimiento de que los anticuerpos presentan reacción cruzada con varias ATPasas tipo P (Ca^{2+} , H^+), lo que dificultaría el aislamiento específico de la ATPasa de interés.

Por tal razón, se decidió utilizar otra estrategia que nos permitiera obtener una sonda específica para aislar un cDNA que codificara para la subunidad α -ATPasa Na^+-K^+ . Para este objetivo, se diseñaron dos oligonucleótidos específicos para la subunidad α de esta enzima a partir de regiones homólogas conservadas en varias subunidades α de diversas ATPasas Na^+-K^+ previamente reportadas.

Por medio de la PCR, utilizando como molde un DNA obtenido del metacéstodo y los oligonucleótidos específicos (ATP1 y ATP2), se logró obtener un fragmento de ≈ 1 Kb.

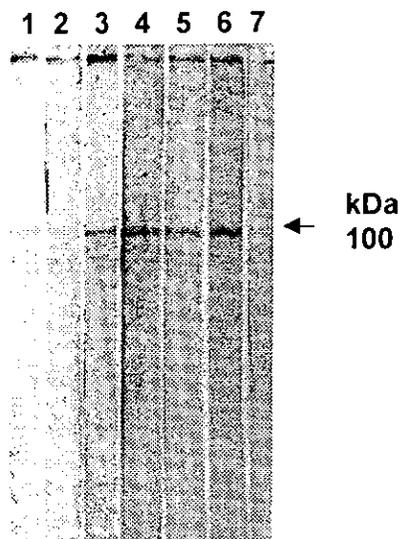


Figura 3. Identificación de la subunidad alfa en Tenidos. Inmunoelectrotransferencia con diversos extractos crudos de tenidos Extractos de 1) *T. saginata* adulto, 2) *T. crassiceps* larva 3) *T. taeniaeformis* adulto, 4) *T. taeniaeformis* larva, 5) *T. solium* adulto, 6) *T. solium* larva, 7) *T. solium* larva. Tiras 1-6 fueron incubadas con el suero de conejo en contra de la subunidad α de la ATPasa H^+ de *N. crassa*. La tira 7 fue incubada con el suero preinmune del mismo conejo.

La secuencia y sus análisis confirmaron que la secuencia codificaba para una región de la subunidad α -ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ de *T. solium*.

Este fragmento de DNA fue marcado con α -dCTP- P^{32} por la técnica de Random primer y utilizado como sonda para aislar 7 clonas por medio de un tamizaje de una biblioteca del metacéstodo de *T. solium* construida en $\lambda\text{gt}10$, dichas clonas fueron denominadas ATPEH-1 hasta ATPEH-7. El DNA de los fagos positivos fue obtenido y los tamaños de los insertos de cada uno de las clonas fueron obtenidos mediante la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos del fago $\lambda\text{gt}10$, que flanquean el sitio de clonación del fago y visualizados en un gel de agarosa al 1% (Figura 4). Cabe mencionar que la clona ATPEH-1, no presentó ninguna banda, aunque si se obtuvo el DNA del fago, probablemente se picó una clona errónea. Se escogió la clona ATP-EH5 por contener el inserto mayor de aproximadamente 4kb, en donde era probable que se encontrara completo el cDNA que codificaba para la enzima de interés.

El fragmento amplificado de la clona ATPEH-5 fue digerido por las enzimas de restricción XhoI, BglII, SacI y SphI, así como las enzimas de restricción Xba I, BamHI, Hind III y XhoI, cuyos cortes están incluidos en los oligonucleótidos que flanquean los sitios de clonación del vector $\lambda\text{gt}10$, lo que permitió construir un mapa de restricción del fragmento ATPEH-5 (Figura 5). Debido a que el fragmento de DNA resultó muy grande (≈ 3.4 Kb), se decidió realizar la clonación en 2 partes aprovechando un sitio BglII en el fragmento ATPEH-5 y los sitios XbaI y XhoI incluidos en los oligonucleótidos del vector $\lambda\text{gt}10$. La estrategia consistió en clonar 2 fragmentos obtenidos por PCR, un fragmento de 1.2 Kb y uno de 2.2 Kb.

El primer fragmento de 1.2Kb, obtenido digiriendo el fragmento completo de la clona ATPEH-5 con las enzimas Bg III y XbaI, fue purificado con perlas de vidrio y clonado en el

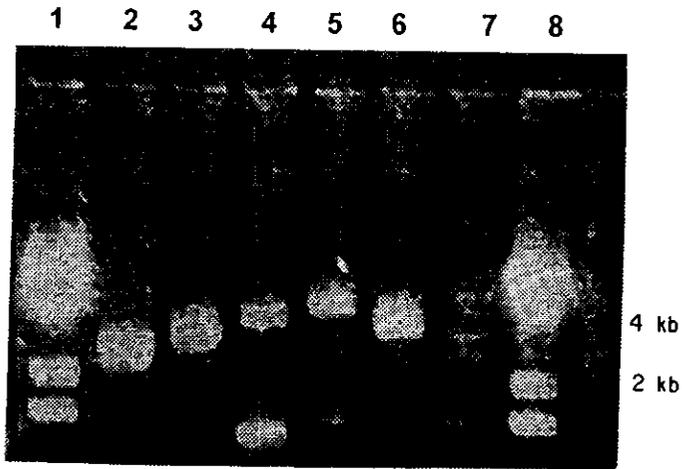


Figura 4. Fragmentos de PCR de las clonas aisladas del tamizaje de la biblioteca de cDNA de *T. solium*. 1 y 8) Marcadores de peso molecular (λ HindIII); 2) ATPEH-2; 3) ATPEH-3; 4) ATPEH-4; 5) ATPEH-5; 6) ATPEH-6; 7) ATPEH-7.

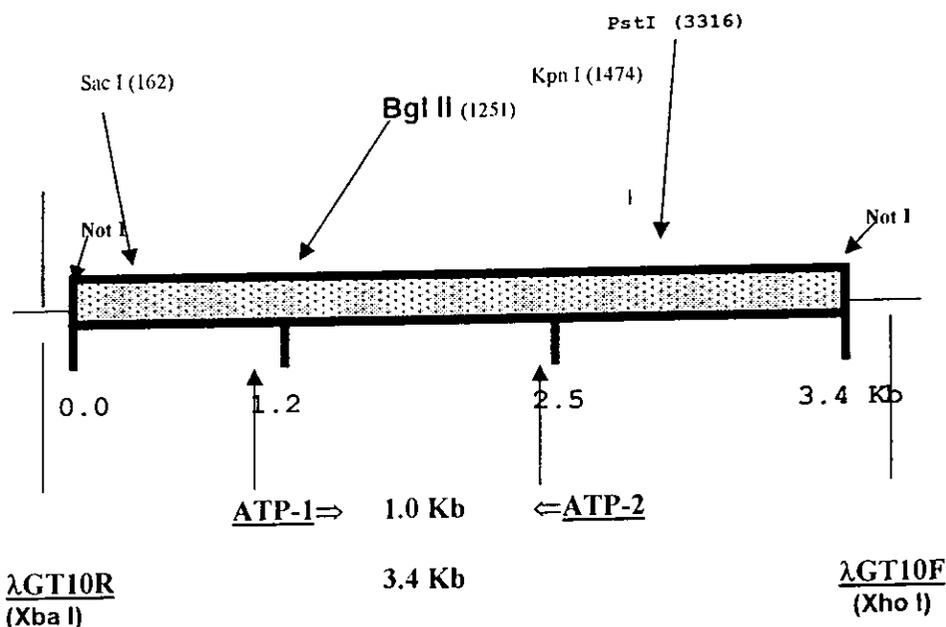


Figura 5. Mapa de restricción de la clona ATP-EH5. En el mapa se muestran algunas enzimas que cortan una vez el fragmento. Además de otras enzimas que no lo cortan. Los sitios de corte de las enzimas fueron corregidos con los análisis computacionales de la secuencia nucleotídica de la clona. Las enzimas, los oligonucleótidos ATP-1, ATP-2 y del vector λgt10, utilizados para clonar en los vectores de secuencia se muestran en letras oscuras. Los tamaños de los fragmentos generados por medio de la PCR se muestran entre los oligonucleótidos utilizados.

vector M13mp18 y 19. La secuencia nucleotídica de este fragmento fue obtenida por el método de Sanger, y un oligonucleótido ATP-7 fue diseñado a partir de esta secuencia antes del sitio BglII. Otra vez un fragmento de PCR fue obtenido utilizando el oligonucleótido antes mencionado y el oligonucleótido de λ gt10-3', obteniéndose un producto de alrededor de 2.2 Kb, el cual fue clonado directamente en el vector 2.1pCR del estuche TA cloning y finalmente fue secuenciado. Para la secuencia de ambos fragmentos se diseñaron oligonucleótidos internos en base a las secuencias nucleotídicas obtenidas.

La figura 6, muestra la secuencia nucleotídica y de aminoácidos, ya empalmada, de ambos fragmentos obtenidos a partir de la clona ATP-EH5. Mediante los análisis computacionales con el programa PCGENE, se encontró entre los marcos de lectura, un marco de lectura abierto que correspondió al de una ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, que comienza en el codón ATG y termina en el codón TAG, así mismo, se señalan en la figura los oligonucleótidos que se diseñaron a partir de las diversas ATPasas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ para obtener la sonda para la ATPasa de *T. solium* con la que se realizaron los tamizajes.

Finalmente, en la figura 7, se muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de subunidades α de varias ATPasas $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ incluyendo la de *T. solium*. En el alineamiento se muestran subrayados las secuencias características más importantes de las ATPasas $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ como el sitio de fosforilación DKTGS/T, el segmento TGDN localizado en el dominio de unión al ATP, el sitio mismo de unión a ATP, KGAPE, así como los dominios transmembranales (H1-H8). Por otro lado, los análisis de la secuencia de aminoácidos indicaron que esta subunidad α de la ATPasa de *T. solium* presenta una identidad del 72.7% con la secuencia del humano y de la mosca, mientras que tiene una identidad del 74.73% con la de camarón, 72.07% con la de sapo y un 82.8% con la secuencia de *S. mansoni* (ver tabla 3).

60 TCTAGAAGTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTAAAAAGCAAAGAATTTCGGGCGCCCGCTGT
120 TACGTGAGCTGTTGTTGTTGGGCTAGGAATGGGTAAATCACGTGGTGACAAGTATCGTGA
M G K S R G D K Y R D
180 TGCCACGGATGGCAAGAAAGATGCAAAGAAGGATCTTAATGAGCTCAAGCAGGAGCTTGC
A T D G K K D A K K D L N E L K Q E L A
240 AATGGACGAACATCAGATTTCTTGGACGAACTCTATGCTCGTCTTGGGACCAATCCTGA
M D E H Q I S L D E L Y A R L G T N P D
300 TACTGGTCTCACCAAGTGAACAGGCAAAGACACGCTTAGATCGAGATGGACCTAACGCACT
T G L T S E Q A K T R L D R D G P N A L
360 TACCCCTCAAAGACGACCCAGAGTGGGTAAAGTTTTCGAAGAATATGTTTGGTGGCTT
T P P K T T P E W V K F C K N M F G G F
420 TTCATTGCTTTTGTGGATCGGGCGCGTTCTCTGTTTCATCGCTCATGGTATTCTTGTCTG
S L L L W I G A V L C F Y A H G I P C W
480 GTGTGCAGGAGAACCCTACTTATATGATAACTTGTACCTCGGTATCGTCTGGCTGCTGT
C A G E P Y L Y D N L Y L G I V L A A V
540 TGTCGTTATTACGGGCTGTTTCTCGTACTACCAAGAGTCCAAGTTCATCGAAGATCATGGA
V V I T G C F S Y Y Q E S K S S K Y M E
600 GTCATTGCTAAGCTTGTCCCTCAATATGCCGTTGTAATTCGTGGAGGTCAGAGAATCGA
S F A K L V P Q Y A V V I R G G Q R I D
660 CGCTCCTGCTGAAGCTCTGGTCGTTGGTGACATCATCGATGTTAAATTCGGTGACCGCGT
A P A E A L V V G D I I D V K F G D R V
720 CCCC GCCGACATTCGTGTCATCAAAGCCAGCTCTTTCAAGGTGGACAACCTCGGCATTGAC
P A D I R V I K A S S F K V D N S A L T
780 GGGAGAGTCGGAGCCCGCAGACTCGCACGGCGGAGTACACTAATGAGAATCCGTTAGAGAC
G E S E P Q T R T A E Y T N E N P L E T
840 AAAGAATCTCGCCTTCTTCTACTAACGCCGTGGAGGGACATGCCGCGGTGTAGTCGT
K N L A F F S T N A V E G T C R G V V V
900 AGCTACCGGTGACCGAACCGTCATGGGTGCGATTGCCAATTCGCTCGGCTCGGGTCTCGAGAT
A T G D R T V M G R I A N L A S G L E M
960 GGGCGTACTCCAATTCGCGCGAGATTGCTCACTTCATTCATATTACTGTTGGTGGC
G A T P I A R E I A H F I H I I T G V A
1020 TGTTTTCTCGGCGTTACTTTCTTTATTATCGCCTTTATCTCGGCTACTACTGGCTTGA
V F L G V T F F I I A F I L G Y Y W L D
1080 TGCGGTTCATCTTCTTATCGGTATCATCGTGGCCAACGTGCCGGAGGGCCTCTTAGCTAC
A V I F L I G I I V A N V P E G L L A T
1140 CGTCACCGTCTGTCTCACTCTCACAGCCAAGCGTATGGCGAGCAAGAATGCTCTGGTGAA
V T V C L T L T A K R M A S K N C L V K
1200 GAATCTCGAGGCTGTGCGAGACTCTTGGCTCCACTCCACCATCTGTTCCGATAAGACCGG
N L E A V E T L G S T S T I C S D K T G

1260 TACTCTCACCCAAAACCGTATGACTGTCGCCACATGTGGTTCGACAACAAGATCTTCGA
T L T Q N R M T V A H M W F D N K I F E

1320 GGCTGACACTTCCGACGACCAATCCACTGCGAATTATAGCCGGGCATCTTCCACGTGGAT
A D T S D D Q S T A N Y S R A S S T W M

1380 GGCCCTCTCGCGTATCGCCATGTTATGTAACCGTGCGGAGTTCAGCCGGGGGAGGAAC
A L S R I A M L C N R A E F K P G E E T

1440 GAACCTGTGCTCAAACGGGAGTGCAACGGTGACGCTTCAGAGTCAGCTCTGCTTAAGTG
N P V L K R E C N G D A S E S A L L K C

1500 CGTCGGACTGTCAATCGGTGGAGTGACCGGTACCGCACGGACAAGCCGAAGGTGGCGGA
V G L S I G G V T G Y R T D K P K V A E

1560 AATCCATTCAACTCAACTAATAAGTATCAGGTGAGTGTGCATCAGACCAGCATGGGGA
I P F N S T N K Y Q V S V H Q T D D G D

1620 TGAGCGCTACCTCGTAGTGATGAAGGTGCGCCCGAGCGCATCCTTGATCGCTGTTCCAC
E R Y L V V M K G A P E R I L D R C S T

1680 CGTCTTGATGGAGGTCAGGAACCTCCACATGGACGATCAGTGGCGTGAGAGCTTCAACAA
V L M E G Q E L H M D D Q W R E S F N N

1740 CGCTTACCTCGAACTCGGTGGCATTGGGGAGCGTGTCTTGGCTTCTGTGACCTTCGTCT
A Y L E L G G I G E R V L G F C D L R L

1800 CCCTGCTGACAAGTCCCTCGCGGCTTTAAGTTCGACATAGATGAACCTAACTTCCCTAT
P A D K F P R G F K F D I D E P N F P I

1860 CGAGGGAATGCCCTTTGTGGGTCTCATGTCAATGATTGATCCACCTCGTCTGCCGTGCC
E G M P F V G L M S M I D P P R A A V P

1920 CGATGCTGTCTCCAAGTGTGATCCGCCGGTATCAAGGTGGTATGGTAACGGGCGACCA
D A V S K C R S A G I K V V M V T G D H

1980 TCCTATCACCGCCAAGGCCATTGCCAAGGGTGTGGGCATCATCTCTGACGGGAATAAGAC
P I T A K A I A K G V G I I S D G N K T

2040 TGTAGAAGACATTGCGGCGGAACGTGGAGTCCCCGTGAGTCAAGTGAACCCCTCGTGAGGC
V E D I A A E R G V P V S Q V N P R E A

2100 TAGCGCATGTGTCGTTACGGCTCCGATCTCGGTGATATGACACCTGCTCAGATCGATGA
S A C V V H G S D L R D M T P A Q Y D E

2160 GATACTCGAGAACCCTCTGAGATTGTCTTCGCTCGTACCTACCACAGCAGAACTCAT
I L E N H S E I V F A R T S P Q Q K L I

2220 CATTGTTGAAGGCATCCAGCGTATGGGTGCCATTGTTGCTGTTACTGGGGATGGTGTCAA
I V E G I Q R M G A I V A V T G D G V N

2280 CGACTCACCTGCCTTGAAGAAGGCTGATATCGGTGTTGCCATGGGTATCACGGGTAGTGA
D S P A L K K A D I G V A M G I T G S D

2340 TGTGAGTAAGCAGGCAGCTGACATGATCCTCCTTGACGACAATTTTGCCCTCCATCGTAC
V S K Q A A D M I L L D D N F A S I V T

2400 GGGTGTGGAGGAGGGGCGTATAATCTTCGACAACCTGAAGAAATCCATCGCCTATAACCT
 G V E E G R I I F D N L K K S I A Y T L

2460 CACCTCTAACATCCCTGAGATCACGCCCTTCCTTATCTTCATTCTGGCCGACGTGCCTCT
 T S N I P E I T P F L I F I L A D V P L

2520 GCCCCTGGGCACCATCACAATTCTGTGCATCGATTGGGCACGGACATGGTGCCGGCCAT
 P L G T I T I L C I D L G T D M V P A I

2580 TTCCTGGCCTACGAGGAGGCCGAAGACATTATGAAGCGCATGCCACGGACCCTTTCCG
 S L A Y E E A E D I M K R M P R D P F R

2640 CGATAAATTGGTGAACGAACGTCTCATCTCCATGGCCTACGGTCAGATTGGCATGATCCA
 D K L V N E R L I S M A Y G Q I G M I Q

2700 GGCCTCCGGCGGTTTCTTCGTTTACTTTGTTCATCATGGCAGAAAACGGTTTCTGGCCGAG
 A S G G F F V Y F V I M A E N G F W P S

2760 CCGCCTACTGGGTCTGCGTAAACAGTGGGACTCCCAGCCATCAATGATGTCGCCGACTC
 R L L G L R K Q W D S P A I N D V A D S

2820 CTACGGCCAAGAGTGGACGTACACACAACGTAAGCGTCTCGAGTACACCTGTCACACGGC
 Y G Q E W T Y T Q R K R L E Y T C H T A

2880 CTTTTCGCCTCCATCGTCATTGTCCAGTGGACGGATCTACTCATATGCAAGACCCGAAA
 F F A S I V I V Q W T D L L I C K T R K

2940 GAACTCTATCTATCAGCAGGGCATGTGGAACCACCACCTCACTTTGGTCTCTTCTTCGA
 N S I Y Q Q G M W N H H L T F G L F F E

3000 GACTACACTGGCCATCTTCCTCTCTTACTGTCCGGGTCTTGAGCACGGTCTGAGAATGAT
 T T L A I F L S Y C P G L E H G L R M M

3060 GCCTCTTCGATGGACGTGGTGGTTGCCGGTTTGGCCCTTCAGTGTGTCAATCTTCATTT
 P L R W T W W L P V L P F S V S I F I F

3120 CGATGAGGTGCGAAAGAAGTTCCTTCGAACCTCCCTCCGGGCAATTGGGTGGAACGAGA
 D E V R K K F L R T L P P G N W V E R E

3180 GACTAACTATTAGTAGATGTCTGCGATCGACAATAAACAAAATCACAAATCCCCTTCCG
 T N Y -

3240 TCCCCTCCACTCTCTCCCTGCTCTCTTACCACCTCCTCCCTTAGTGTCTCACCTCTTTC

3300 CAAAGCAAATATTAATATCGTTATGATGTAGCCTTCAACAATGATGAGTTTGAATTC

3360 GAAGCGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGG

3420 GCCCAATTCGCC

FIGURA 6. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la clona ATP-EH5 correspondiente a un cDNA que codifica para la subunidad α de una ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de *T. solium*. En letras negras y subrayadas se muestran las secuencias de aminoácidos utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos ATP-1 y ATP-2, respectivamente.

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LA SUBUNIDAD α DE LA ATPasa DE Na⁺-K⁺

HUMANO	HRRGVGRDKYEFAAVSEQGDKKGGKKKDRIMDELKKEVSMDD
SAFO	MRYGAGRDKYEFPAATSEHGKGGKGGKDRIMEELKKEVTHMED
MOSCA	HIALRSDEYHGKADSYRVATVIATDDNRTADGQYKSRKKMFAKVNKKENLDLQELQELDI DF
ARTEMIA	MAKGRKGGKDLNELKKELDI DF
MANSONI	MATEKKSKKNPKKDDLNELKQELQELMDE
SOLIUM	MGRSRGDKYRDATDQKKDAKKDLNELKQELQELMDE
HUMANO	HKLSLDELHRKYGTDLGRGLTSARAAEI LARDGLENALTFPETTPEWIKFCRQLFGGFSMLL
SAFO	HKMTLEELHRKYGTDLTRGLTTARAAEI LARDGLENALTFPETTPEWVKFCRQLFGGFSMLL
MOSCA	HKISPEEMYQRQTHBENGLSHARAKENLERDGEN-LTFPKQTPEWVKFCEDLFG-VAMLL
ARTEMIA	HKIPIEECYORLGSNPEGTLTNAQARSNI ERDGENCLTPEKTTPEWIKFCRQLFGGFSMLL
MANSONI	HRI SLDELYSRLSTDFQGLTAEQARTLERDGENALTFPKTTPEWVKFCRQLFGGFSMLL
SOLIUM	HQISLDELRYARLGTNPEGTLTSEQARTLERDGRGNALTFPKTTPEWVKFCRQNMFGGFSMLL
	H1 H2
HUMANO	WIGAILLFLAYSIQAATEEPEQ-NENLYLGVVLSAVVIITGCFESYYQEAKSSKIMESFKNM
SAFO	WIGAILLFLAYGIRKASDLEED-NHLYLGVVLSAVVIITGCFESYYQEAKSSRIMESFKNM
MOSCA	WIGAILLFCVAVYIQAATSEEPAD-DNLYLGVVLSAVVIITGVGFSYYQEAKSSKIMESFKNM
ARTEMIA	WTGAILLFLAYGIEASSGHEMDLKNLYLGVVLSAVVIITGVISYYQENKSSRIMESFKNL
MANSONI	WIGAVLFCIAFSIEGGTHEDEF-KDLYLGVVLSAVVIITGCFESYYQEAKSSRIMESFKNM
SOLIUM	WIGAVLFCIAHGIPOWAGEPYLYDNLYLGVVLSAVVIITGCFESYYQEAKSSKIMESFAKL
HUMANO	VPOQALVIRNGEKMSINAEVSVVGDVVEKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEF
SAFO	VPOQALVIRNGEKLINAEVSVVGDVVEKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEF
MOSCA	VPOEATVIREGKPSLRADDLVGLVLEFGDLIPVYRIIEARDFKVDNSSLTGESEF
ARTEMIA	VPOYALALREGQRVTLKAEELTMGDIVVEKGGDRVPADRLVLEARSKVDNSSLTGESEF
MANSONI	IPQALVIRNGGVKIEAPAEALVVGDLIDVKKGGDRVPADIRIISASSKVDNSSLTGESEF
SOLIUM	VPOYAVVIRGGQRIIDAPAEALVVGDLIDVKKGGDRVPADIRIVIKASSKVDNSSLTGESEF
HUMANO	QTRSPDFTNENPLETRNIAFFSTNCEVGTARGIVVYTGDRVTMGR IATLASGLEGGQPIA
SAFO	QTRSPDFTNENPLETRNIAFFSTNCEVGTARGIVVYTGDRVTMGR IATLASGLEGGQPIA
MOSCA	QSRGAEETHENPLETKNLAFESTNAVEALFKGVVITGGDRTVMGR IAAALASGLDTG-TPIA
ARTEMIA	QARSPEFTNDNPLETKNLAFESTNAVEGTMRGIVIGIGINDVTMGR IAGLASGLDTGPTPIA
MANSONI	QRTSEYTNENPLETKNLAFESTNAVDTGCRGIVVYTGDRVTMGR IANLASHLQIGQPIIN
SOLIUM	QTRTAEYTNENPLETKNLAFESTNAVEGTCRGGVVVATGDRVTMGR IANLASGLEMGATPIA
	H3 H4
HUMANO	AEIEHFHIIITGVAVFLGVSFFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCULT
SAFO	VEIGHFHIIITGVAVFLGVSFFILSLILHYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCULT
MOSCA	KEIHAHFHIIITGVAVFLGVTFFVIAFILGYHHLDAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCULT
ARTEMIA	KEIAHFHIIITGVAVFLGVTFFIIAIFVLGYHHLDAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCULT
MANSONI	KEINHFHIIITGVAVFLGVSFFVIAFILGYHHLDAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCULT
SOLIUM	REIAHFHIIITGVAVFLGVTFFIIAIFLGYHHLDAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCULT
	F
HUMANO	LTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTE
SAFO	LTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTE
MOSCA	LTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTE
ARTEMIA	LTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTE
MANSONI	LTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTE
SOLIUM	LTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTE
HUMANO	QSGVSEDKTSATNLALSRIAGLCNRVFPQAGQENFELKRDVVDGASESALLKCIELCCG
SAFO	QSGGASEDKSPETWTALAR IAGLCNRVFPAGQENFELKRDVVDGASESALLKCIELCCG
MOSCA	QSGVQYDRTPGFKALSR IATLONRAEFKGGQDGVPI LKKEVSGDASEAALKCMELALG
ARTEMIA	QSGAQFDKSSAGWKALVKIAALCSRAEFKPNQSTPI LKKEVTDGASEAALKCVELTTG
MANSONI	QSVATYDKNSPTWIALARIGMLCNRAEFKVGDEKPVLLKKEVCGDASESALLKCVELSGF
SOLIUM	QSTANYSRSTWMLASRIAMLCNRAEFKPGTEENFVLLKKEVCGDASESALLKCVGLSIG
	ATP
HUMANO	SVKEMREYAKIVEI PFNSTNKYQLSIHKNPNTSEFQHLVLMKGAPERILDRCSILLHG
SAFO	SVKDMREKQKVAEIPFNSTNKYQLSVHKNPNTSESRYLVMKGAPERILDRCSILLQG
MOSCA	DMVNI RKRKNKIIAEVFNSTNKYQVSIHETEOTNDFRYLVMKGAPERILERCSTIFMG
ARTEMIA	ETEAL RKRKNKICEI PFNSANKQVSIHENEKSDGRYLVMKGAPERILERCSTIFMG
MANSONI	GVTEYRRKNPKVAEIPFNSTNKYQLSIHETNGSDE-RYLLVMKGAPERILDRCSITLING
SOLIUM	GVTYRTRDKPKVAEIPFNSTNKYQVSVHETDGDDE-RYLLVMKGAPERILDRCSITLMG
HUMANO	KEQPLDEELKDAFQNAVLELGGGLGERVLFCHLFLPDEQFPEGGFQFDTDVNFPIIDLNLCF
SAFO	KEQPLDEELKDAFQNAVLELGGGLGERVLFCHLFLDDEQFPEGGFSDTEEDVNFPEGLFCF
MOSCA	KEKVLDEEMKEAFNNAYMELGGGLGERVLFCHLFLPDSQYFNGFKPNTODINFPIDLNRF
ARTEMIA	KEIDMTEELKEAFNNAYMELGGGLGERVLFCHLFLPDKYFHGFANADANFPLTLGLRF
MANSONI	KEEVMDESMRENFNAYLELGGMGERVLFCHLFLPDTYKGYFNFVDEPNFPLTLNLRFF
SOLIUM	QELHMDQWRESFNAYLELGGGLGERVLFCHLFLPDKKFFRFGKEDI DEPNFPEIGMFF

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

VFLI^{H1}SMIDFPRAAVFDAAVAKR^{H1}SAGIKVIMVTDGHHPTAKAI^{H1}AKGVGII^{H1}SE^{H1}NETVEI^{H1}IA
VFLI^{H1}SMIDFPRAAVFDAAVAKR^{H1}SAGIKVIMVTDGHHPTAKAI^{H1}AKGVGII^{H1}SE^{H1}NETVEI^{H1}IA
VFLM^{H1}SMIDFPRAAVFDAAVAKR^{H1}SAGIKVIMVTDGHHPTAKAI^{H1}AKSVGII^{H1}SE^{H1}NETVEI^{H1}IA
VFLM^{H1}SMIDFPRAAVFDAAVAKR^{H1}SAGIKVIMVTDGHHPTAKAI^{H1}AKSVGII^{H1}SE^{H1}NETVEI^{H1}IA
VFLM^{H1}SMIDFPRAAVFDAAVAKR^{H1}SAGIKVIMVTDGHHPTAKAI^{H1}AKGVGII^{H1}SE^{H1}NETVEI^{H1}IA
VFLM^{H1}SMIDFPRAAVFDAAVAKR^{H1}SAGIKVIMVTDGHHPTAKAI^{H1}AKGVGII^{H1}SE^{H1}NETVEI^{H1}IA

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

ARLNI^{H1}FVSGVNI^{H1}RDAAKAVVHGS^{H1}DLKDM^{H1}TSRE^{H1}QLDDI^{H1}LKYHTEI^{H1}VFARTSP^{H1}OOKLI^{H1}IVE^{H1}PT
ARLNI^{H1}FVSGVNI^{H1}RDAAKAVVHGT^{H1}DLKDM^{H1}NADOI^{H1}DDI^{H1}LRH^{H1}TEI^{H1}VFARTSP^{H1}OOKLI^{H1}IVE^{H1}PT
URLNI^{H1}FVSEVNI^{H1}REAKAAV^{H1}HGAE^{H1}LRDVS^{H1}QD^{H1}LD^{H1}EIL^{H1}RHTEI^{H1}VFARTSP^{H1}OOKLI^{H1}IVE^{H1}PT
ASLNI^{H1}FVSEVNI^{H1}RDAAKAVVHGS^{H1}DLR^{H1}DITE^{H1}DAL^{H1}DEIL^{H1}RHPEI^{H1}VFARTSP^{H1}OOKLI^{H1}IVE^{H1}PT
AERGI^{H1}FVR^{H1}IVNI^{H1}RDAAKAVVHGS^{H1}DLREMT^{H1}PAQI^{H1}DDI^{H1}LNHSEI^{H1}VFARTSP^{H1}OOKLI^{H1}IVE^{H1}PT
AERGV^{H1}FVSGVNI^{H1}REASAVVHGS^{H1}DLR^{H1}DMT^{H1}PAQI^{H1}DEI^{H1}LENHSEI^{H1}VFARTSP^{H1}OOKLI^{H1}IVE^{H1}PT

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

QRQGAIVAVTGGGVNDS^{H5}PALKKADI^{H5}GVAMGI^{H5}AGSDVSKQAADMI^{H5}LLDDNFASIVTGV^{H5}EE
QRQGAIVAVTGGGVNDS^{H5}PALKKADI^{H5}GIAMGI^{H5}AGSDVSKQAADMI^{H5}LLDDNFASIVTGV^{H5}EE
QRMGAI^{H5}VAVTGGGVNDS^{H5}PALKKADI^{H5}GVAMGI^{H5}AGSDVSKQAADMI^{H5}LLDDNFASIVTGV^{H5}EE
QRQGAIVAVTGGGVNDS^{H5}PALKKADI^{H5}GVAMGI^{H5}AGSDVSKQAADMI^{H5}LLDDNFASIVTGV^{H5}EE
QRQGAIVAVTGGGVNDS^{H5}PALKKADI^{H5}GVAMGI^{H5}AGSDVSKQAADMI^{H5}LLDDNFASIVTGV^{H5}EE
QRMGAI^{H5}VAVTGGGVNDS^{H5}PALKKADI^{H5}GVAMGI^{H5}AGSDVSKQAADMI^{H5}LLDDNFASIVTGV^{H5}EE

H5

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

RLIFDNLKKSIA^{H6}YTLT^{H6}SNIP^{H6}EIT^{H6}PF^{H6}LIF^{H6}IANI^{H6}PL^{H6}PLGT^{H6}VTI^{H6}L^{H6}CI^{H6}DLG^{H6}TM^{H6}VE^{H6}PAI^{H6}SLAYE^{H6}
RLIFDNLKKSIA^{H6}YTLT^{H6}SNIP^{H6}EIT^{H6}PF^{H6}LIF^{H6}IADI^{H6}PL^{H6}PLGT^{H6}VTI^{H6}L^{H6}CI^{H6}DLG^{H6}TM^{H6}VE^{H6}PAI^{H6}SLAYE^{H6}
RLIFDNLKKSIA^{H6}YTLT^{H6}SNIP^{H6}EIS^{H6}PE^{H6}LAS^{H6}IL^{H6}CDI^{H6}PL^{H6}PLGT^{H6}VTI^{H6}L^{H6}CI^{H6}DLG^{H6}TM^{H6}VE^{H6}PAI^{H6}SLAYE^{H6}
RLIFDNLKKSIA^{H6}YTLT^{H6}SNIP^{H6}EIS^{H6}PE^{H6}LL^{H6}FI^{H6}L^{H6}FDI^{H6}PL^{H6}PLGT^{H6}VTI^{H6}L^{H6}CI^{H6}DLG^{H6}TM^{H6}VE^{H6}PAI^{H6}SLAYE^{H6}
RLIFDNLKKSIA^{H6}YTLT^{H6}SNIP^{H6}EIT^{H6}PF^{H6}LV^{H6}Y^{H6}LA^{H6}DI^{H6}PL^{H6}PLGT^{H6}VTI^{H6}L^{H6}CI^{H6}DLG^{H6}TM^{H6}VE^{H6}PAI^{H6}SLAYE^{H6}
RLIFDNLKKSIA^{H6}YTLT^{H6}SNIP^{H6}EIT^{H6}PF^{H6}LIF^{H6}LAD^{H6}V^{H6}EL^{H6}PL^{H6}GT^{H6}IT^{H6}L^{H6}CI^{H6}DLG^{H6}TM^{H6}VE^{H6}PAI^{H6}SLAYE^{H6}

H6

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

QAESD^{H7}IMKRRPRNPKT-D^{H7}KL^{H7}VNERLIS^{H7}MAYGQIGMI^{H7}QALSGGFE^{H7}FVY^{H7}EVI^{H7}LAENGF^{H7}EL^{H7}I^{H7}HL^{H7}LG
QAESD^{H7}IMKRRHARNPKK-D^{H7}KL^{H7}VNERLIS^{H7}MAYGQIGMI^{H7}QALSGGFE^{H7}FVY^{H7}EVI^{H7}LAENGF^{H7}EL^{H7}PT^{H7}LLG
HAEAD^{H7}IMKRRPRDFPN-D^{H7}KL^{H7}VNRRLIS^{H7}MAYGQIGMI^{H7}QASGGE^{H7}FVY^{H7}EVI^{H7}MAENGF^{H7}EL^{H7}KL^{H7}LG
QAESD^{H7}IMKRRPRNPKT-D^{H7}KL^{H7}VNERLIS^{H7}LAYGQIGMI^{H7}QASGGE^{H7}FVY^{H7}EVI^{H7}MAENGF^{H7}EL^{H7}QD^{H7}LG
EAEAD^{H7}IMKRRPRDPLYHDKLVNERLIS^{H7}MAYGQIGMI^{H7}QASGGE^{H7}FVY^{H7}EVI^{H7}MAENGF^{H7}FW^{H7}SRLLG
EAE-D^{H7}IMKRRPRDFPN-D^{H7}KL^{H7}VNERLIS^{H7}MAYGQIGMI^{H7}QASGGE^{H7}FVY^{H7}EVI^{H7}MAENGF^{H7}FW^{H7}SRLLG

H7

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

LRVD^{H8}DDRWINOVEDSYGQEW^{H8}TYEQ^{H8}RKIVE^{H8}FTCHTA^{H8}FFVSI^{H8}VVVQWADL^{H8}ICKTRNSV^{H8}F
IRV^{H8}WEDRYVNI^{H8}VEDSYGQEW^{H8}TYEQ^{H8}RKIVE^{H8}FTCHTA^{H8}FFVSI^{H8}VVVQWADL^{H8}ICKTRNSV^{H8}F
LRK^{H8}MDSKAVN^{H8}DLTOSYGQEW^{H8}TYR^{H8}DRK^{H8}LEY^{H8}CHTA^{H8}FFSIV^{H8}VVVQWADL^{H8}ICKTRNSV^{H8}F
LRK^{H8}MDSGRAV^{H8}NDLTOSYGQEW^{H8}TYD^{H8}ARK^{H8}Q^{H8}LES^{H8}SCHTA^{H8}FFSIV^{H8}VVVQWADL^{H8}ICKTRNSV^{H8}F
LR^{H8}REWDSKAIN^{H8}D^{H8}LADSYGQEW^{H8}TYN^{H8}QR^{H8}K^{H8}LEY^{H8}CHTA^{H8}FFASIV^{H8}VVVQWADL^{H8}ICKTRNSV^{H8}F
LR^{H8}KQWDS^{H8}PAIND^{H8}ADSYGQEW^{H8}TYQ^{H8}RK^{H8}LEY^{H8}CHTA^{H8}FFASIV^{H8}VVVQWADL^{H8}ICKTRNSV^{H8}F

H8

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

QQGM^{H9}KNKILIFGLFEETALAAFLSYCGM^{H9}GV^{H9}ALRMY^{H9}PLK^{H9}PTW^{H9}WFC^{H9}AF^{H9}PS^{H9}LLIFVY^{H9}DEVR
QQGM^{H9}KNKILIFGLFEETALAAFLSYCGM^{H9}GV^{H9}ALRMY^{H9}PLK^{H9}PTW^{H9}WFC^{H9}AF^{H9}PS^{H9}LLIFVY^{H9}DEVR
QQGM^{H9}RN^{H9}WALN^{H9}FGLVETV^{H9}LAAFLSYCGMEK^{H9}GLRMY^{H9}PLK^{H9}LV^{H9}W^{H9}FP^{H9}AI^{H9}FP^{H9}FALAI^{H9}FIY^{H9}DETR
QQGM^{H9}RNNI^{H9}N^{H9}FALVETV^{H9}LAAFLSYCGMEK^{H9}GLRMY^{H9}PLK^{H9}LV^{H9}W^{H9}FP^{H9}AI^{H9}FP^{H9}FALAI^{H9}FIY^{H9}DETR
QQGM^{H9}NNH^{H9}LT^{H9}FGLFEETLAI^{H9}FLSYCG^{H9}LDK^{H9}GLR^{H9}MM^{H9}EM^{H9}RT^{H9}W^{H9}W^{H9}GL^{H9}FP^{H9}FS^{H9}LI^{H9}FVY^{H9}DEVR
QQGM^{H9}NNH^{H9}LT^{H9}FGLFEETLAI^{H9}FLSYCG^{H9}LE^{H9}GLR^{H9}MM^{H9}EL^{H9}RT^{H9}W^{H9}W^{H9}LV^{H9}LP^{H9}FS^{H9}SI^{H9}FI^{H9}FDEVR

H9

HUMANO
SAPO
MOSCA
ARTEMIA
MANSONI
SOLIUM

KLI^{H10}IRRR^{H10}FGG-W^{H10}VEK^{H10}ETYY
KLI^{H10}LR^{H10}RR^{H10}FGG-W^{H10}EK^{H10}ETYY
RFY^{H10}LR^{H10}RR^{H10}FGG-W^{H10}LEQ^{H10}ETYY
KFY^{H10}LR^{H10}RR^{H10}FGG-W^{H10}VEQ^{H10}ETYY
KFY^{H10}LR^{H10}RR^{H10}FGG-W^{H10}LEK^{H10}ETYY
KFY^{H10}LR^{H10}RR^{H10}FGG-W^{H10}VER^{H10}ETYY

HUMANO= *Homo sapiens*. SAPO= *Bufo marinus*
MOSCA= *Drosophila melanogaster*. ARTEMIA= *Artemia franciscana*.
MANSONI= *Schistosoma mansoni*. SOLIUM= *Toenia solium*.

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona ATPEH-5 de *T. solium* con las subunidades α de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de otros organismos. Los aminoácidos que participan en la unión a ATP (ATP), fosforilación (P) y el dominio de unión con sitios transmembranales, se muestran en letras negras y subrayadas. Los dominios transmembranales se muestran subrayados y denominados de H1 a H8.

Tabla 3. Porcentaje de identidad entre secuencias de la subunidad α de ATPasas Na⁺/K⁺ de diferentes organismos.

	Humano	Sapo	Mosca	Artemia	Mansoni	Solium
Humano	100	90.93	73.97	74.35	73.36	72.70
Sapo		100	72.41	74.15	73.36	72.07
Mosca			100	79.52	74.36	72.70
Artemia				100	73.66	74.73
Mansoni					100	82.80
Solium						100

HUMANO *Homo sapiens*

SAPO *Bufo marinus*

MOSCA *Drosophila melanogaster*

ARTEMIA *Artemia franciscana*

MANSONI *Schistosoma mansoni*

SOLIUM *Taenia solium*

DISCUSIÓN

La cisticercosis en México es una de las enfermedades parasitarias más frecuentes, sobre todo en estados del centro y el bajo, con una prevalencia promedio de 2.0% en la República Mexicana, en donde se han encontrado diversos factores de riesgo que favorecen la transmisión de *T. solium*, entre los que se pueden mencionar la convivencia con un portador del céstodo adulto, el bajo nivel económico de las comunidades, las precarias condiciones higiénicas de las mismas, la coprofagia en cerdos, por citar algunos (Díaz-Camacho, 1989; Larralde et al., 1992; Sarti et al., 1992; Aranda-Álvarez et al., 1995; Martínez et al., 1997). Esto habla de la necesidad de implementar medidas de prevención, las cuales resultarían suficientes para erradicar esta parasitosis. Sin embargo, estas medidas requieren de campañas de educación, así como de mejoramiento de las condiciones de vivienda, lo cual resulta muy costoso, hablando en términos de recursos económicos y humanos. Sin ser ignoradas, estas medidas están siendo apoyadas por investigaciones destinadas al mejoramiento del diagnóstico específico de las personas afectadas, así como a encontrar un tratamiento para la enfermedad enfocado a su futura erradicación; para ello se ha venido buscando el antígeno o el conjunto de antígenos que puedan servir a estos fines entre ellos la elaboración de una vacuna.

Las ATPasas son proteínas que juegan un papel fundamental en el transporte de iones a través de la membrana para mantener el equilibrio iónico entre el medio externo y el citoplasma de las células, por lo que son moléculas esenciales en la sobrevivencia de las mismas y por lo tanto del organismo como un todo. Las ATPasas están presentes en una gran diversidad de organismos, desde bacterias hasta mamíferos, lo cual reitera su papel fundamental dentro de las células.

En el presente trabajo, se aisló y caracterizó parcialmente un cDNA que codifica para la

subunidad α de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ del metacéstodo de *T. solium*.

La identificación de una banda de aproximadamente 100 kDa en varios ténidos, por medio de la técnica de inmunoelectrotransferencia, utilizando los anticuerpos anti- subunidad α de la ATPasa H^+ de *N. crassa*, muestra la gran similitud inmunogénica que presenta la subunidad α de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{-K}^+$, a pesar de que su afinidad está dirigida contra un tipo de ion diferente. Este resultado sugiere que la banda de 100 kDa encontrada podría corresponder a una de las isoformas de la subunidad α que integran las ATPasas de tipo P en los ténidos ensayados, incluyendo a *T. solium*. En un principio se pensó en utilizar los anticuerpos contenidos en este suero como sonda para aislar la subunidad α de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{-K}^+$, a partir de bibliotecas de expresión de *T. solium* disponibles en el laboratorio clonadas en el vector $\lambda\text{gt}10$. Sin embargo, esta idea se descartó debido al conocimiento de que los anticuerpos presentan reacción cruzada con las subunidades α de varias ATPasas tipo P (Ca^{2+} , H^+), lo que dificultaría el aislamiento específico de la ATPasa de interés.

Por tal motivo, se decidió utilizar la estrategia de producir un fragmento de DNA específico para la subunidad α de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ mediante la técnica de PCR utilizando dos oligonucleótidos diseñados a partir de regiones altamente conservadas de la subunidad α de varias ATPasas $\text{Na}^+ \text{-K}^+$, obtenidas del banco de datos Genbank. Se obtuvo un fragmento de DNA de 1Kb, el cual se utilizó como sonda para aislar un cDNA que codifica para una subunidad α de la ATPasas $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ de *T. solium*.

El tamizaje de una biblioteca de cDNA de *T. solium* construida en $\lambda\text{gt}10$, con el fragmento antes mencionado resultó en el aislamiento de siete clonas con tamaños entre los 2.5 a 3.5 Kb. Los análisis de restricción en las clonas conteniendo los insertos mayores (ATPEH-7 y ATPEH-5) fueron muy similares, por lo que se escogió la clona conteniendo el inserto de

mayor tamaño, la ATPEH-5. La secuencia nucleotídica de la clona ATPEH-5 fue de 3,231 bases y codifica para una proteína de 1,014 aminoácidos con un peso molecular de 111,989 Da. Los análisis computacionales y de comparación con otras ATPasas utilizando los programas de PCgene y Genbank indicaron que se trataba de una subunidad α de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Además, se encontraron secuencias características como el sitio de fosforilación (DKTGS/T), la secuencia del sitio de unión al ATP (KGAPE), la secuencia conservada encontrada en el dominio que contiene a este sitio, TGDN, y las secuencias de los dominios transmembranales (H1-H8), relacionados con la unión a los iones y su translocación (Lutsenko et al., 1995).

A pesar del alto grado de identidad entre la secuencia de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de *T. solium*, con las secuencias de otras especies, existen regiones de aminoácidos no conservados que pueden ser importantes para mantener la estructura o la actividad de la proteína, como por ejemplo la región amino-terminal, la cual presenta diferencias entre las diversas ATPasas. Estas diferencias pueden representar un blanco para el diseño de nuevos fármacos o para el desarrollo de una respuesta inmune (vacuna) que afecten en forma específica a dichas regiones y como consecuencia alterar la estructura o actividad de la proteína sin dañar proteínas homólogas de otras especies (Gómez-Puyou et al., 1995).

Por otro lado, se han realizado pocos estudios para determinar si estos organismos presentan diversas isoformas de esta proteína, así como de comparaciones de sus propiedades bioquímicas, inmunológicas y enzimáticas con el humano y el cerdo que son huéspedes de varios platelmintos. A este respecto, existe un estudio que sugiere que *Schistosoma mansoni* existen probablemente 2 isoformas determinados por el descubrimiento de 2 sitios de unión a la ouabaina, lo que ya ha sido demostrado en otros organismos (Souto y Noël, 1994).

Los análisis descritos en esta tesis claramente demuestran que hemos clonado y

secuenciado la (o) una de las isoformas de la subunidad α que componen a las ATPasas de Na^+ - K^+ del metacéstodo de *T. solium*.

Puesto que esta enzima juega un papel muy importante en los organismos, incluyendo los platelmintos para mantener un equilibrio iónico entre el interior del organismo y el medio externo, el disponer del cDNA clonado para la subunidad α de la ATPasa Na^+ - K^+ , abre la posibilidad de expresar y producir suficientes cantidades de esta enzima para poder realizar estudios de transporte, vacunación, diagnóstico, diseño de drogas en contra de estos organismos. Así mismo, se pueden realizarse estudios sobre el papel que juega esta proteína en la relación huésped-parásito.

secuenciado la (o) una de las isoformas de la subunidad α que componen a las ATPasas de Na^+ - K^+ del metacéstodo de *T. solium*

Puesto que esta enzima juega un papel muy importante en los organismos, incluyendo los platelmintos para mantener un equilibrio iónico entre el interior del organismo y el medio externo, el disponer del cDNA clonado para la subunidad α de la ATPasa Na^+ - K^+ , abre la posibilidad de expresar y producir suficientes cantidades de esta enzima para poder realizar estudios de transporte, vacunación, diagnóstico, diseño de drogas en contra de estos organismos. Así mismo, se pueden realizarse estudios sobre el papel que juega esta proteína en la relación huésped-parásito.

ANEXO I

1. Amortiguador salino de fosfato (PBS 10X)

NaCl	137mM	80.0gr
KCl	2.7mM	2.0gr
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	4.3mM	11.5gr
KH ₂ PO ₄	1.4mM	2.0gr

ajustar pH a 7.4 y aforar a un litro.

2. Gel SDS-PAGE

Acrilamida 30% Bis 0.8%

Tris-HCl 1.5M pH 8.8

Tris-HCl 1.5M pH 6.8

SDS 10%

Temed (N,N,N',N'-tetrametilen diamino) (BIORAD)

Persulfato de amonio

3. Amortiguador para proteínas

H ₂ O desionizada	3.8ml
Tris-HCl 0.5M pH6.8	1.0ml
SDS 10%	1.6ml
2-mercaptoetanol	0.4ml
Azul de bromofenol	0.4ml

4. Amortiguador para electroforesis de proteínas (5X)

Tris base	9.0gr
Glicina	43.2gr
SDS	3.0gr

se afora a 600ml con H₂O desionizada.

5. Amortiguador de transferencia

Metanol	20%
Tris	25mM
Glicina	192mM

se afora a 1 litro con H₂O desionizada.

6. Medio de cultivo SOBm

Bacto-triptona	20.0gr
Extracto de levadura	5.0gr
NaCl	0.5gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	10mM
KCl	2.5mM

7 Medio de cultivo Luria Betani (LB)

Bacto-triptona	10.0gr
Extracto de levadura	5.0gr
NaCl	10.0gr

8. Medio de cultivo SM

NaCl	5.8gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.0gr
Tris-HCl 1M pH7.5	50.0ml
Gelatina al 2%	5.0ml

Todos los componentes de cada uno de los medios de cultivo se disuelven y se aforan a 1 litro con agua desionizada. El pH de todos los medios se ajusta a 7.0 y se esterilizan en autoclave durante 20min a 15Lb de presión en ciclo líquido. El Mg⁺⁺ y el K⁺ se esterilizan por filtración a través de membranas con poros de 0.22µ de diámetro. Para los medios sólidos se les agrega bacto agar o agarosa a una concentración final de 1.5% y para top agar a una concentración final de 0.75%

9. SSC 20X (Solución de Citratos Salina)

NaCl	17.3g
Citrato de Sodio	88.2g

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10N y ajustar el volumen a 1lt con agua desionizada.
Esterilizar en autoclave.

10. Amortiguador TE

Tris-HCl pH 8.0	10.0mM
EDTA pH 8.0	1.0mM

11. Amortiguador TAE (50X)

Tris-base	242.0ml
Ácido acético glacial	57.1ml
EDTA 0.5M pH 8.0	100.0ml

12 Gel de Agarosa 1%

Agarosa	0.5gr
Amortiguador TAE 1X	50ml
Bromuro de etidio	4 μ l

REFERENCIAS

- Aluja,A., Escobar,A., Escobedo,F., Flisser,A., Laclette,J.P., Larralde,C., Madrazo, I., Velázquez,V. y Willms,K. 1987. *Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por T. solium*. Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica, México. 115pp.
- Allan,J.C., Ávila,G., García-Noval,J., Flisser,A., Craig,P.S. 1990. Immunodiagnosis of taeniosis by coproantigen detection. *Parasitology*. **101**(Pt3): 473-477.
- Aluja,A y Vargas,G. 1989. La Histopatología de la Cisticercosis Porcina. En: Cisticercosis Humana y Porcina: su conocimiento e investigación en México. Flisser,A. y Malagón,F. Limusa, México. pp147-155.
- Antolovic,R., Brüller,H.J., Bunk,S., Linder,D. y Schoner,W. 1991. Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur. J. Biochem.* **199**:195-202.
- Aranda-Álvarez,J.G., Tapia,R.R., Celis,Q.G., Grijalva,O.I.E., y Correa,D. 1995. Human cysticercosis: risk factors associated with circulating serum antigens in an open community of San Luis Postosí, Mexico. *Am. Trop. Med. Parasitol.* **89**(6):689-692.
- Ávila,G., Aguilar,L., Martínez,A., Benitez,M., Valencia,S. y Flisser,A. Inmunodiagnóstico de la taeniasis humana y experimental en el periodo prepatente de la infección por medio del ELISA para coproantígenos de *Taenia*. *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1994 octubre 9-15 Acapulco, Gro., México. México (D.F.)*. 1994:150.
- Blanco,G., DeTomaso,A.W., Koster,J., Xie,Z.J. y Mercer,R.W. 1994. The α -subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit. *J. Biol. Chem.*, **269**(38):23420-23425.
- Blanco,G., Koster,J.C. y Mercer,R.W. 1994. The α -subunit of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:8542-8546.
- Botero,D.,Tanowitz, H.B.,Weiss, L.M., and Wittner, M. 1993. Taeniasis and Cysticercosis. *Parasitic Diseases*. **7**(3):683-697.
- Cataldi de Flombaum,M.A., y Stoppani,A.O.M. 1981. Influence of efrapeptin, aurovertin y citreoviridin on the mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol.*

Biochem. Parasitol. 3:143-155.

Cox, F.E.G. (1982). *Modern Parasitology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp159.

Díaz-Camacho, S., Candil-Ruiz, A., Uribe-Beltrán, M. y Willms, K. 1989. Epidemiología de teniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: *Cisticercosis Humana y Porcina: su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa, México. pp243.

Escobedo, F. 1989. Tratamiento de cisticercosis /teniasis humana. En *Cisticercosis Humana y Porcina: su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. y Malagón, F. Limusa, México. pp205.

Flisser, A., Madrazo, I. y Delgado, H. 1997. *Cisticercosis Humana. El Manual Moderno*, México. pp.19-28.

Flisser, A., Plancarte, A., Correa, D., Rodríguez del Rosal, E., Feldman, M., Sandoval, M., Torres, A., Meza, A., Parkhouse, R.M., Harrison, L.J., Wilson, M., Avila, G., Allan, J., Craig, P.S., Vallejo, V., Ortiz, D., García, E., y McManus, D.P. 1990. New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65(1):95-98.

Geerts, S., Coles, G.C. y Gryseels, B. 1997. Anthelmintic resistance in human helminths: Learning from the problems with worm control in livestock. *Parasitology today*. 13(4):149-151.

Gómez-Poyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, Y., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Monfort, R. 1995. Using evolutionally changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triose phosphate isomerase. *Chem. and Biol.* 2:847-855.

Gottstein, B., Tsang, V.C.W., y Schantz, P.M. 1986. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(2):308-313.

Hayashi, Y. 1992. Minimum enzyme unit for Na⁺/K⁺ ATPase is the α - β protomer. Determination by low-angle laser light scattering photometry coupled with high performance gel chromatography for substantially simultaneous measurement of ATPase activity and molecular weight. *Biochem. Biophys. Acta.* 983(2): 217-229.

Infante, M.F., Reyna, M.O., y Farias, P.H. 1997. Establecimiento y evaluación del sistema avidin-biotina sobre papel de nitrocelulosa, para el serodiagnóstico de cisticercosis porcina. *Vet. Mex.* 28(4):287-290.

Johnson, K.S., Harrison, G.B.L., Lightowers, M.W., O'Hoy, K.L., Cogle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vinton, J.G., Heath, D.D. y Rickard, M.D. 1989. Vaccination

against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. **338**(13):585-587.

Larralde,C., Laclette,J.P., Oween,C., Madrazo,I., Sandoval,M., Bojalil,R., Sciuotto,E., Contreras,L., Arzate,J., Díaz,M.L., Govezensky,T., Montoya,R.M., Goodsaid,F. 1986. Reliable serology of *T. solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination. *Am. J. Trop. Hyg.* **35**(5):965-973.

Larralde,C., Padilla,A., Hernández,M., Govezensky,T., Sciuotto,E., Gutiérrez,G., Tapia-Conyer,R., Salvatierra,B. y Sepúlveda,J. 1992. Seroepidemiología de la Cisticercosis en México. *Salud Pública México*. **34**:197-210.

Lightowers,M.W. 1994. Vaccination against animal parasites. *Veterinary Parasitology*. **54**:177-204.

Lingrel,J.B., y Kuntzweiler,T. 1994. Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**(31):19659-19662.

Liu,L.X., y Weller,P.F. 1996. Antiparasitic drugs. *The New England Journal of Medicine*. **334**(18):1178-1184.

Lutsenko,S., y Kaplan,J.H. 1993. An Essential Role for the Extracellular Domain of the Na, K-ATPase -subunit in Cation Occlusion. *Biochemistry*. **32**:6737-6743.

Lutsenko,S., y Kaplan,J.H. 1995. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry*. **34**(48):15607-15613.

Malagón,F. 1989. Elementos del Binomio Taeniasis/Cisticercosis: una síntesis. En: Cisticercosis Humana y Porcina: su conocimiento e investigación en México. Flisser,A. y Malagón,F. Limusa, México. pp:3-6.

Manoutcharian,K., Larralde,C., Fragoso,G., Rosas,G., Hernández,M., Govezensky,T., Baca,M., Sciuotto,E., Aluja,A., Villalobos,N., y Rodarte,L.F. Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis.

Manoutcharian,K., Rosas,G., Hernández,M., Fragoso,G., Aluja,A., Villalobos,N., Rodarte,L.F., y Sciuotto,E. 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* **82**(2):250-254.

Martínez,M.J.J., Aluja,A., Martínez,V.N., Jaramillo,A.C.J., y Gemell,M. 1997. Epidemiología de la cisticercosis en cerdos de una comunidad rural del estado de Guerrero, México. *Vet. Mex.* **28**(4):281-286.

Møller,J.V., Juul,B., y le Maire,M. 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1286**:1-51.

Monroy,O.A., Gómez,G.L.J., Ramírez,R.A. y Carrillo,L.G. 1992. Reconocimiento por inmunoelectrotransferencia de antígenos de *T. solium* y su larva. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 34:33-38.

Noël,F., y Soares de Moura,R. 1986. *Schistosoma mansoni*: Preparation, characterization of (Na+K)-ATPase from tegument and carcass. *Experimental Parasitology.* 62:298-307.

Pathak,K.M.L. y Gaur,S.N.S. 1990. Inmunization of pigs with culture antigens of *T. solium*. *Veterinary Parasitology.* 34:353-356.

Pedersen,P.L., y Carafoli,E. 1987. Ion motive ATPases. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS.* 12:146-150.

Sambrook,J., Fritsch,E.I.,y Maniatis,T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory press. N.Y.

Sarti,E. 1989. Epidemiología de la Taeniasis/Cisticercosis. En: Cisticercosis Humana y Porcina: su conocimiento e investigación en México. Flisser,A. y Malagón,F. Limusa, México. pp233-241.

Shull,G.E., Lane,L.K. y Lingrel,J.B. 1986. Amino-acid sequence of the β -subunit of the (Na+K)ATPase deduced from cDNA. *Nature.* 321(22):429-431.

Shull,G.E., Schwartz,A. y Lingrel,J.B. 1995. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na-K)ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature.* 316:691-695.

Sciutto,E., Aluja,A., Fragoso,G., Rodarte,L.F., Hernández,M., Villalobos,M.N., Padilla,A., Keilbach,N., Baca,M., Govezensky,T., Díaz,S., Larralde,C. 1995. Immunization of pigs against *T. solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60(1-2): 53-67.

Skou,J.C. y Esmann,M. 1992. The Na,K-ATPase. *J. of Bioenergetics and Biomembranes.* 24(3):249-261.

Sosa,A., González-Angulo,A., Calzada,L., y Alva,S. 1978. Presence of ATPase on the vesicular membrane of *Cysticercus cellulosae*. A high resolution cytochemical study. *Specialia/Experientia.* 34/2.

Souto,P.D. y Noël,F. 1994. Heterogeneity of Ouabain binding sites in *Schistosoma mansoni*. First evidence for the presence of two (Na-K)ATPase isoforms in platyhelminths. *Biochemical Pharmacology.* 47(2):331-336.

Takeyasu,K., Lemas,V., y Fambrough,D.M. 1990. Stability of Na-K-ATPase α -subunit isoforms in evolution. *Am. J. Physiol.* 259(4):C619-C630.

Thompson, R. 1977. *Techniques in clinical immunology*. Backwell Scientific Publ. Oxford. p.85.

Towbin,H., Staehelin,T. y Gordon,J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354.

Tsang,V.C.W., Band,J.A., y Boyer,A.E. 1989. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis human cysticercosis (*T. solium*). *J. of Infectious Disease.* 159(1):50-59.

Valdez,F., Hernández,M., Govezensky,T., Fragoso,G. y Sciutto,E. 1994. Immunization against Taenia crassiceps cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80(6):931-936.

Vibanco-Pérez,N., Jiménez,L., Merchant,M.T. y Landa,A. 1999. Characterization of Glutathione S-Transferasa of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 85(7):00-00 (en prensa).

Vogelstein,B. y Gillespie,D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:615.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**