

00551

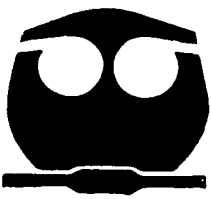


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 3

FACULTAD DE QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS

Identificación de la ATPasa de Na⁺/K⁺ de membrana
de *Taenia solium* y clonación de la subunidad α

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)
P R E S E N T A :
QFB DIANA BARRERA OVIEDO



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE CINCO

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por los proyectos: D-GAPA-PAPIIT IN218198 y CONACyT: 35333-M.

La alumna Diana Barrera Oviedo (No. de cuenta 9033203-8) recibió beca por parte de CONACyT (No. de registro: 129718).

Agradecimientos:

A la Dra. Marieta Tuena de Gómez Puyou, a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez y al Dr. Abraham Landa Piedra, por su tiempo y asesoría durante la realización del trabajo experimental de esta tesis.

Al jurado de examen conformado por:

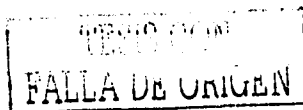
PRESIDENTE Dr. Antonio Peña Díaz

VOCAL Dra. Marieta Tuena de Gómez Puyou.

SECRETARIO Dra. Rosario A. Muñoz Clares

SUPLENTE Dra. Patricia Coello Coutiño

SUPLENTE Dr. Roberto Coria Ortega



Dedicatorias:

A mis padres por todo su apoyo y ejemplo.

A mis hermanos por que si.

A mi abuelita donde quiera que se encuentre.

A mis amigos, que ojalá no se alejen tanto.

Y por supuesto:

A Marquito por todo lo que hemos pasado juntos.

TESIS CON
FALLA DE CENSO

D

INDICE

	Página
I. Resumen	4
II. Introducción	5
2.1. <i>Taenia solium</i>	5
2.1.1. Descripción	5
2.1.2. Ciclo de vida	9
2.1.3. Cisticercosis – Teniasis	10
2.1.4. Interacción huésped – parásito	11
2.2. ATPasas	12
2.2.1. Clasificación	12
2.2.2. ATPasas tipo P	14
2.2.3. ATPasa Na ⁺ /K ⁺	15
2.2.3.1. Inhibidores	17
2.2.3.2. Isoformas	18
2.2.3.3. Estructura proteica	22
2.2.3.4. Actividad enzimática	25
2.2.3.5. Relevancia fisiológica de las isoformas de ATPasa de Na ⁺ /K ⁺	27
III. Antecedentes	28
IV. Justificación del proyecto	29
V. Hipótesis	30
VI. Objetivos	30
6.1. Objetivo general	30
6.2. Objetivos particulares	30
VII. Material y Métodos	31
7.1. Material biológico	31
7.2. Métodos bioquímicos	31
7.2.1. Obtención de membranas	31
7.2.2. Cuantificación de proteína	31

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

7.2.3.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)	32
7.2.4.	Ensayo de actividad de ATPasa	32
7.2.5.	Purificación de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ por cromatografía de afinidad	33
7.3.	Métodos inmunológicos	34
7.3.1.	Producción de anticuerpos policlonales contra un péptido sintético específico de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺	34
7.3.2.	Inmunoelectrotransferencia (IET)	35
7.3.3.	Inmunoelectrofluorescencia indirecta	35
7.4.	Métodos de biología molecular	36
7.4.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
7.4.2.	Purificación de fragmentos de DNA productos de PCR	37
7.4.3.	Reacción de Klenow	37
7.4.4.	Digestión de DNA con endonucleasas	37
7.4.5.	Defosforilación de DNA con fosfatasa alcalina intestinal	38
7.4.6.	Ligación de DNA	38
7.4.7.	Marcaje de la sonda	39
7.4.8.	Tamizaje de una biblioteca de DNAC de cisticerco de <i>T. solium</i>	39
7.4.9.	Purificación de DNA de fagos	41
7.4.10.	Purificación de DNA de plásmido	42
7.4.11.	Secuenciación de DNA	43
7.4.12.	Deducción y análisis de la secuencia de aminoácidos	44
7.5.	Apéndice: soluciones	45

VIII. Resultados	47
8.1. Bioquímica	47
8.1.1. Identificación de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺	47
8.1.2. Actividad enzimática e inhibición	48
8.1.3. Purificación de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ por cromatografía de afinidad	53
8.1.4. Inmunolocalización de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺	55
8.2. Biología molecular	56
8.2.1. Producción de sonda específica	56
8.2.2. Obtención de clonas	57
8.2.3. Secuencias	59
IX. Discusión	63
X. Conclusión	68
XI. Perspectivas	69
XII. Bibliografía	70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. RESUMEN

La ATPasa de Na^+/K^+ es una proteína integral de la membrana que produce un gradiente electroquímico para mantener el potencial de membrana, la actividad excitable de la célula y diversos sistemas secundarios de transporte. El gradiente de sodio se utiliza para el transporte de nutrientes y otras moléculas al interior de la célula. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de *Tenia solium*. Se desarrolló un antisuero policlonal específico contra la región NH_2 -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ deducida de la secuencia parcial de la clona aislada de una biblioteca de DNAC del cisticerco. Este antisuero identificó la presencia de la enzima en una fracción membranal del cisticerco denominada FM1, obtenida a baja velocidad de centrifugación. Así mismo, FM1 presentó la mayor actividad de ATPasa de Na^+/K^+ , identificada por su sensibilidad a ouabaína. A partir de FM1, y mediante una cromatografía de afinidad a ouabaína acoplada a agarosa, se purificó una fracción enriquecida para la ATPasa de Na^+/K^+ . Aunque esta fracción no presentó actividad enzimática, fue reconocida por el antisuero anti- NH_2 -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ del cisticerco. Los ensayos de inmunolocalización utilizando el mismo anticuerpo indicaron que la enzima se encuentra en la membrana tegumental, en células musculares y en células formadoras de canales. Además, se obtuvo la secuencia completa (DNAC de 3371 pb) del gen que codifica para la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ (1014 aminoácidos) que presenta los motivos característicos en estas subunidades. Los resultados confirman la presencia de la ATPasa de Na^+/K^+ en la membrana tegumentaria del cisticerco de *T. solium*.

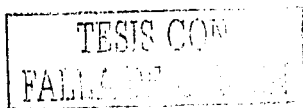
II. INTRODUCCIÓN

2.1. *Taenia solium*.

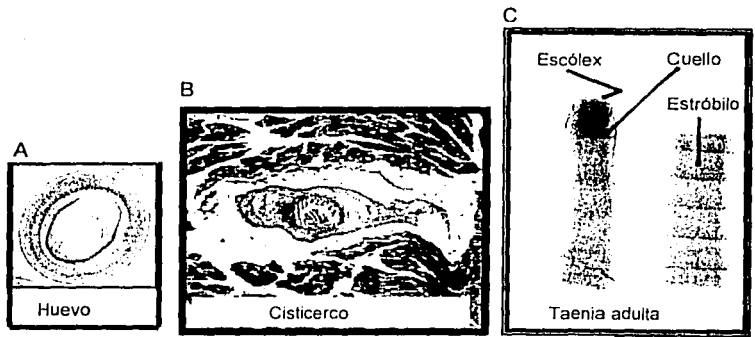
2.1.1. DESCRIPCIÓN.

Taenia solium pertenece al phylum *Platyhelminthes*, clase *Cestoda*, orden *Cyclophyllidea*, y familia *Taeniidae*. Lo más sobresaliente de los cestodos es la ausencia de boca y aparato digestivo, además de presentar tres diferentes estadios de desarrollo. La tenia adulta es un gusano plano, largo, de color blanco. En su cuerpo se distinguen 3 regiones: escólex, cuello y estróbilo (Esquema 1C). El escólex tiene el tamaño de una cabeza de alfiler y está formado por cuatro ventosas y un rostelo que posee una doble corona de ganchos. La corona interna contiene de 11 a 14 ganchos largos (de 0.13 a 0.16 mm) y la externa un igual número de ganchos pequeños (de 0.10 a 0.12 mm). El cuello es corto, sin segmentaciones y de menor diámetro que el escólex. Del cuello se origina el estróbilo que mide de 2 a 7 m de largo está formado por un gran número de segmentos denominados proglótidos (Yoshino, 1933). Los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros, ya que aún no tienen desarrollados los órganos sexuales. Los proglótidos maduros, en los cuales ya se han desarrollado los órganos sexuales, se encuentran en la parte central de la tenia. Los últimos segmentos son grávidos; en ellos se pueden observar las ramas uterinas, cuyo número define a la especie (Esquema 2). Los proglótidos grávidos miden 0.5 a 2 cm y contienen aproximadamente 60 000 huevos (Craig and Faust, 1970). Estos segmentos grávidos se liberan del estróbilo y se eliminan con el excremento.

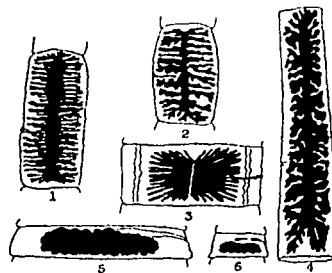
Los huevos son esféricos (Esquema 1A) y constan de la oncosfera y el embrióforo. La oncosfera o embrión está cubierta por una capa de bloques denominados en conjunto embrióforo. El embrióforo que rodea a la oncosfera está formado por bloques unidos de manera contigua. Los bloques embrióforicos están compuestos por una protelina similar a la queratina,



resistente a los jugos digestivos naturales y artificiales. En contraste, la sustancia cementante que une a los bloques es susceptible a la digestión enzimática (Trejo, 1986) y por tanto, al entrar al aparato digestivo los bloques se separan con facilidad. La capa que queda expuesta es la membrana oncosferal, la cual al entrar en contacto con la jugos gástricos permite que el embrión expuesto se active (Laclette *et al.*, 1982). Una de las manifestaciones de los cambios fisiológicos que ocurren en el embrión cuando se activa, es el inicio del movimiento de los ganchos, que le permite salir de la membrana oncosferal y sostenerse del epitelio intestinal del huésped (Yoshino, 1933a).



Esquema 1. Huevo (A), Cisticerco (B), Adulto (C) de *Taenia solium*.



Esquema 2. Proglótidos grávidos de céstodos que parasitan al ser humano mostrando los patrones uterinos característicos.

1. *Taenia saginata*;
2. *T. solium*;
3. *T. africana*;
4. *T. confusa*;
5. *Hymenolepis diminuta*;
6. *H. nana*

Doce días después de infectar a cerdos se observan en su tejido muscular cisticercos ovoides y quísticos, con un fluido denso y un punto que corresponde al escólex cerca de un polo (Esquema 1B). El escólex del cisticercos es idéntico al del gusano adulto. Estos cisticercos en desarrollo se encuentran en el hígado, cerebro y músculo esquelético de los cerdos infectados (Yoshino, 1933b). El crecimiento del cisticercos continúa hasta llegar a un tamaño de 8 a 15 mm a los 177-325 días después de la infección. Entre los 40 y 50 días el rostelo está formado por completo. De los 60 a 70 días se observa una bolsa llamada receptáculo, dentro del cual está el cuello que muestra en su superficie muchos dobleces como septos (Yoshino, 1933c). Estos septos conforman el canal espinal (Slais, 1982). El cuello crece con mayor rapidez que el receptáculo, que mide 1.6 a 3.6 mm de largo, y por tanto se enrolla sobre sí mismo en espiral o en forma de "S".

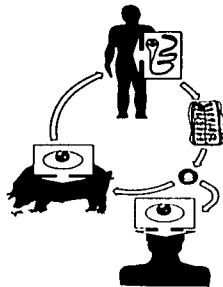
La superficie externa del cisticercos está rodeada por microvellosidades limitadas por una membrana plasmática que se encuentra cubierta por una capa vellosa de glucocálix (Ramírez-Bon *et al.*, 1982; Sosa *et al.*, 1977). El tegumento debajo de la membrana plasmática contiene vesículas elipsoidales de diferentes tamaños. En ocasiones, la membrana de las vesículas se une con la membrana plasmática y se abre hacia el exterior, con lo que adquiere la apariencia de estar liberando su contenido al medio externo (Ramírez-Bon *et al.*, 1982). La cara interna del tegumento es una banda protoplásmica continua, o sincicio, sostenida por una membrana basal de tejido conjuntivo. Dicha membrana está interrumpida por dobleces del sincicio que forman prolongaciones protoplásmicas, las cuales conectan al tegumento con los cuerpos celulares nucleados. Estas prolongaciones se encuentran llenas de vesículas, mitocondrias y microtúbulos. Las prolongaciones también contienen muchos ribosomas y un aparato de Golgi bien desarrollado, similar al de las células de reserva, que tienen gran cantidad de gotas de glucógeno y lípidos (Ramírez-Bon *et al.*, 1982). El sistema muscular está formado por miocitos, que se conectan con miofibrillas por medio de puentes citoplasmáticos, y

constituyen un sincicio. Entre la membrana basal del tegumento y las células tegumentarias y de almacén se encuentran haces de fibras musculares, que también se conectan con las fibras de colágena (Lumsden *et al.*, 1982, Ramírez-Bon *et al.*, 1982). Esta estructura y organización celular reúne los requisitos para considerarse un epitelio (Lumsden *et al.*, 1982). Los céstodos se nutren por difusión a través de este epitelio.

Los cisticercos localizados en el cerebro humano muestran dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. Los del tipo celuloso son pequeños (0.5 a 1.5 cm), tienen una vesícula esférica u ovalada blanca o amarillenta, con una pared translúcida a través de la cual se puede observar el escólex como gránulo sólido excéntrico. Las características morfológicas de los cisticercos celulosos alojados en los seres humanos y en los cerdos son similares. Los cisticercos celulosos frecuentemente están separados del tejido del huésped por una cápsula fina de colágena (Aluja *et al.*, 1987, Escobar and Nieto, 1972, 1983, Rabiela *et al.*, 1982, 1989, Puig-Solares, 1974, Gómez-Leal, 1989, Willms and Merchant, 1980). El cisticerco racemoso es una vesícula grande, redonda o lobulada, circunscrita por una pared delicada, o bien es similar a un racimo de uvas. Los cisticercos de tipo racemoso son parásitos muy grandes, hasta de 10 a 20 cm (Rabiela *et al.*, 1982, 1989, Escobar and Nieto, 1972, Escobar, 1983), y pueden contener hasta 60 ml de fluido (Berman *et al.*, 1981, Jung *et al.*, 1981). Probablemente, la característica más importante de este tipo es que en apariencia no tiene escólex, aunque en algunos casos se pueden observar vestigios de éste por medio de estudios histológicos detallados (Rabiela *et al.*, 1982, 1989, Escobar, 1983, Berman *et al.*, 1981, Jung *et al.*, 1981). El tipo celuloso es más frecuente en el cerebro humano, aunque en la mayoría de los casos coexisten en el mismo cerebro cisticercos de ambos tipos (Rabiela *et al.*, 1982).

2.1.2. CICLO DE VIDA

El gusano adulto parasita exclusivamente al ser humano cuando ingiere carne de cerdo infectada con cisticercos vivos, lo cual sucede cuando está cruda o insuficientemente cocida. El escólex evagina estimulado por la bilis y las enzimas digestivas. Las ventosas se adhieren a la pared intestinal e inducen la protrusión de los ganchos que se sostienen en la mucosa intestinal (Cañedo *et al.*, 1982). Después de 3 a 4 meses en el intestino, la tenia llega a su estadio adulto y desaloja en las heces del portador proglótidos grávidos llenos de huevos (Craig and Faust, 1970). Se considera que se liberan de 2 a 5 segmentos 2 a 3 veces por semana (Aluja *et al.*, 1987; Craig and Faust, 1970; Pearse *et al.*, 1987).



Esquema 3. Ciclo de vida de *Taenia solium*

Los huevos liberados de los proglótidos grávidos suelen ser ingeridos por los cerdos (Craig and Faust, 1970; Pearse *et al.*, 1987). Los humanos también pueden ingerirlos en forma accidental debido a la contaminación de alimentos y agua. Los cisticercos se desarrollan principalmente en el sistema nervioso central, ojo, músculo esquelético y tejido subcutáneo de los seres humanos. Siendo de mayor frecuencia la neurocisticercosis que la cisticercosis muscular y subcutánea (Schenone *et al.*, 1982), aunque también se han encontrado casos de presencia de cisticercos en tejido graso subcutáneo (Wortman, 1991).

2.1.3. CISTICERCOSIS - TENIASIS

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por la larva de *T. solium* en el humano y en el cerdo, en países en vías de desarrollo como los de América Latina, África y Asia. Esta enfermedad se asocia con una pobre higiene y métodos primitivos de crianza del ganado porcino (Mahajan, 1982).

En México, la infección con *T. solium* ha sido reconocida ampliamente; numerosos estudios clínicos y patológicos han identificado a la cisticercosis como un importante problema de salud causando severa morbilidad y serias pérdidas económicas (Flisser, 1988; Sarti and Gutierrez, 1986; Larralde *et al.*, 1992; Tsang and Wilson, 1995). En los años de 1953 a 1984 se encontraron 481 casos de cisticercosis (2.4%) de 20,026 autopsias realizadas en el Hospital General de México y en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de México. La neurocisticercosis fue considerada la principal causa de muerte en el 39% de los decesos por infección (Villagran and Olvera, 1989) y es la causa más común de epilepsias tardías (Medina *et al.*, 1990). Sin embargo, los datos documentados de cisticercosis en México son en gran parte derivados de centros clínicos urbanos. Estas estadísticas no reflejan la incidencia real de la cisticercosis ni la asociación de la cisticercosis con la teniasis en comunidades rurales, en donde se presume ocurren la mayor parte de las transmisiones (Sarti and Gutierrez, 1986). Por otro lado, los estudios serológicos de la población abierta en México muestran alrededor del 3.0% de positividad para cisticercosis (Larralde *et al.*, 1992).

La teniasis es una enfermedad que cursa asintóticamente y por este motivo no se tienen datos sobre la incidencia en la población. Sin embargo las personas que portan a la *T. solium* en su estado adulto son un foco de infección para la cisticercosis.

2.1.4. INTERACCIÓN HUÉSPED - PARÁSITO

La membrana plasmática tegumentaria del cisticerco es muy importante en la relación huésped-parásito, ya que este céstodo realiza su intercambio de nutrientes y secreciones a través de ésta.

Se ha identificado una serie de moléculas (carbohidratos, glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas) presentes en la superficie de la membrana tegumentaria de los céstodos en diferentes estadios de desarrollo (Joshua *et al.*, 1989; Lamsam and MacManus, 1990; Landa *et al.*, 1994; Schmidt and Peters, 1987; Sosa *et al.*, 1977). Algunos estudios han demostrado que las glicoproteínas participan en la evasión de la larva (cisticerco) a la respuesta inmune del huésped (Hammerberg *et al.*, 1980; Letonja and Hammerberg, 1983). Los céstodos realizan el intercambio de nutrientes y secreciones a través de su superficie tegumentaria (Lumsden, 1975; White *et al.*, 1992). Se han observado vesículas pinocíticas en la pared del cisticerco de *Taenia crassiceps*, que parecen transportar proteínas del huésped (Willms *et al.*, 1980) a través de su membrana tegumentaria (Threadgold and Dunn, 1983, 1984). Así mismo, otros estudios han demostrado que algunos transportadores son importantes para el transporte de nutrientes (Pappas and Read, 1973, Pappas, 1975), como los transportadores de glucosa (Rodríguez-Contreras, 1998; Skelly *et al.*, 1994), aminoácidos (Haynes, 1970; Miller *et al.*, 1996; Pappas and Read, 1973; Pappas *et al.*, 1973; Pfeiffer *et al.*, 1998) y proteínas (Hustead and Williams, 1977), que se han identificado en diferentes helmintos. Dichos transportadores requieren un gradiente de electrolitos para llevar a cabo su transporte, este gradiente puede ser proporcionado por algunas ATPasas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2. ATPasas

2.2.1. CLASIFICACIÓN

Las ATPasas son enzimas involucradas con la síntesis y/o la utilización del ATP, el cual es la principal fuente de energía en la célula.

Las ATPasas se han clasificado en tres tipos: F, V y P (Tabla I, II y III). Las ATPasas de la categoría F constan de una porción soluble (F_1) involucrada en la actividad catalítica de la enzima (síntesis o hidrólisis del ATP) y una porción membranal (F_0) involucrada en la translocación de H^+ . La masa molecular de F_1 es de 360-384 kDa conformada por las subunidades α , β , γ , δ y ϵ con una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. F_0 consta de los polipéptidos a, b y c, que presentan en conjunto una masa molecular de aproximadamente 190 kDa (Pedersen and Carafoli, 1987).

Las ATPasas de tipo V se encuentran en las vacuolas. Son las menos abundantes en los organismos y su masa molecular se estima es de 400 kDa. Estas ATPasas las componen más de 3 polipéptidos (α , β , γ) (Pedersen and Carafoli, 1987).

Las ATPasas de la clase P están asociadas con las membranas del retículo endoplásmico y las membranas citoplasmáticas. Constan de una sola subunidad α , con excepción de la ATPasa de Na^+/K^+ que también cuenta con una segunda subunidad β (Pedersen and Carafoli, 1987; Moller *et al.*, 1996).

Tabla I. ATPasas tipo F

Catión transportado	Organismo / membrana	Función
H ⁺	-Eucariotes / mitocondrial interna -Plantas superiores / tilacoidal -Procariotes / plasmática	Catalizar la formación de ATP a partir de ADP + P _i .

Tabla II. ATPasas tipo V

Catión transportado	Organismo / membrana	Función
H ⁺	-Animales / lisosomal y endosomal -Plantas superiores / vacuolar -Hongos / vacuolar	Crear valores de pH bajos en compartimentos para la activación de enzimas hidrolíticas.

Tabla III. ATPasas tipo P

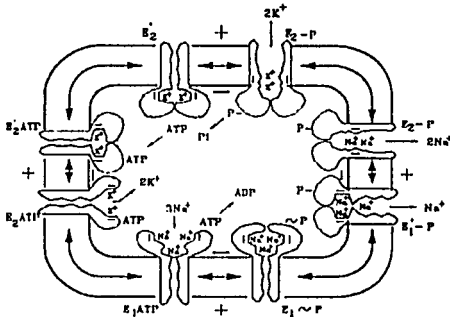
Catión transportado	Organismo / membrana	Función
Na ⁺ /K ⁺	Eucariotes superiores / plasmática	Mantener gradientes de concentración; crear potencial eléctrico.
H ⁺ /K ⁺	Células de mamífero secretoras de ácido / plasmática	Acidificar el contenido del estómago.
H ⁺	Hongos (<i>Neurospora</i>) y plantas superiores / plasmática	Crear valores de pH bajos en compartimentos para activar enzimas hidrolíticas.
Ca ²⁺	Eucariotes superiores / plasmática	Mantener baja la [Ca ²⁺] en citosol.
Ca ²⁺	Células de músculo de animales / retículo endoplasmática	Mantener la [Ca ²⁺] intracelular en el retículo endoplásmico.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

2.2.2. ATPasas TIPO P

Las ATPasas de tipo P se distribuyen ampliamente entre las especies y son responsables del transporte activo de varios cationes a través de las membranas de las células (Lutsenko and Kaplan, 1995; Sachs and Munson, 1991). Todas estas enzimas usan la hidrólisis del ATP para dirigir el transporte de cationes contra un potencial electroquímico. La designación de tipo P se refiere a la característica de estas enzimas de formar un intermediario fosforilado durante su ciclo catalítico. Este intermediario se forma cuando el γ -fosfato del ATP reacciona con el residuo aspartato 369 de la subunidad α .

Acompañando al proceso de fosforilación, las ATPasas tipo P captan, unen y transportan iones cíclicamente entre dos diferentes conformaciones dependientes de los cationes, denominadas E1 y E2 (Repke and Schon, 1992; Sachs and Munson, 1991; Skou and Esmann, 1992). El mecanismo molecular preciso que acopla la hidrólisis del ATP a los cambios conformacionales y a la translocación de iones aún no se describe por completo (Esquema 4).



Esquema 4. Ciclo catalítico de la ATPasa de Na⁺/K⁺.

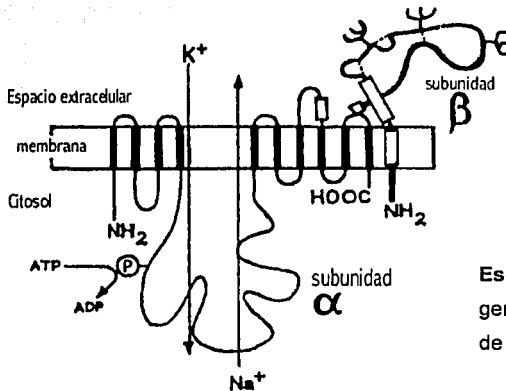
Las ATPasas P presentan dominios altamente conservados y una estructura terciaria semejante y equivalente en su organización topológica en

la membrana (Lutsenko and Kaplan, 1995). Una región con homología es la que se encuentra alrededor del aspartato fosforilado, llamado TGES/A (treonina, glicina, glutámico, serina/alanina). Dicha secuencia se encuentra entre los dominios transmembranales 2 y 3. También varias regiones, como la involucrada en la unión del ATP, muestran un alto número de aminoácidos conservados. Este tipo de ATPasas se inhibe por el vanadato, un análogo del estado de transición del fosfato, por lo cual se distinguen de las ATPasas de los tipos V y F (Sachs and Munson, 1991; Pedersen *et al.*, 1987).

2.2.3. ATPasa Na⁺/K⁺

La ATPasa de Na⁺/K⁺, o bomba de Na⁺, es una proteína integral de la membrana que se encuentra en todas las células eucariotas y es responsable del transporte a través de la membrana celular de iones de sodio (3 Na⁺) hacia el exterior y potasio (2 K⁺) al interior, utilizando ATP como la fuerza impulsora. Este transporte produce gradiente químico y eléctrico en la membrana celular. El gradiente eléctrico es esencial para generar el potencial de membrana de la mayoría de los tejidos y para la excitabilidad del músculo y células nerviosas. El gradiente de Na⁺ provee la energía que impulsa los anti y cotransportadores acoplados a este catión. Este sistema de transporte secundario media la translocación de iones (Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Cl⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻), sustratos (glucosa y aminoácidos) y neurotransmisores a través de la membrana plasmática (Glynn, 1991, 1993; Jorgensen, 1990; Skou, 1990; Skou and Esmann, 1992). En el riñón, la ATPasa de Na⁺/K⁺ juega un papel primordial, dirigiendo la reabsorción de Na⁺ y agua. Por lo cual esta enzima es esencial en el mantenimiento del agua corporal y de la homeostasis de electrolitos (Glynn, 1991; Jorgensen, 1990; Green, 1992). La ATPasa de Na⁺/K⁺ es un oligómero (Esquema 5) compuesto de la subunidad α y la subunidad β . La interacción de ambas subunidades da como resultado una enzima funcional, sin embargo se han encontrado tretámeros formados por 2 subunidades α y 2 subunidades β .

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN



Esquema 5. Estructura general de la ATPasa de Na⁺/K⁺.

La subunidad α es una proteína con diversas porciones transmembranales con masa molecular de aproximadamente 112 KDa, y es la responsable de las propiedades de catálisis y transporte de la enzima. La subunidad α contiene los sitios de unión a cationes, ATP, y al inhibidor ouabaina (Lingrel and Kuntzweiler, 1994; Mercer, 1993; Pedemonte and Kaplan, 1990, Pressley, 1996). La subunidad β es un polipéptido que atraviesa la membrana una sola vez, y dependiendo de su glicosilación tiene una masa molecular entre 40 y 60 KDa. La subunidad β es esencial para la actividad normal de la enzima (Blanco, 1994a; Chow and Forte, 1995; McDonough *et al.*, 1990) y está involucrada en la captación del K⁺ (Lutsenko and Kaplan, 1993) y en la modulación de la afinidad por el K⁺ y el Na⁺ (Blanco *et al.*, 1995a, b; Eakle *et al.*, 1994, 1995; Jaisser *et al.*, 1992). En las células de los vertebrados la subunidad β puede actuar como chaperona, estabilizando el correcto plegamiento de la subunidad α para facilitar su deposición en la membrana plasmática (Chow and Forte, 1995; McDonough *et al.*, 1990).

2.2.3.1. INHIBIDORES

a) **Cardioglicósidos:** o cardiotónicos, son inhibidores específicos de la ATPasa de Na^+/K^+ . La ouabaína es un cardioglicósido ampliamente utilizada, es soluble en agua y tiene una K_i del orden de 10^{-7} – 10^{-5} M para las enzimas de la mayoría de los tejidos. Este inhibidor se une a aminoácidos de las asas extracelulares de la subunidad α . La inhibición aumenta cuando la proteína está fosforilada y unida al Na^+ (Schwartz, 1983).

b) **Vanadato:** es un análogo del estado de transición del fosfato unido al sitio de fosforilación de las ATPasas tipo P; Inhibe a la enzima en un intervalo de concentración en nanomoles. La unión del vanadato se ve favorecida cuando el K^+ se encuentra unido en su sitio citoplasmático, mientras que el K^+ extracelular no la afecta.

c) **Oligomicina:** este antibiótico se une extracelularmente pero, en contraste con los cardioglicósidos y el vanadato, no produce una inhibición total de la actividad enzimática (Glynn, 1985). La oligomicina decremента la velocidad de la transición de $E_1\text{Na}_3$ a $E_2\text{K}_2$ (ver Esquema 4) (Esmann and Skou, 1985).

2.2.3.2. ISOFORMAS

La ATPasa Na^+/K^+ se expresa como varias isoformas, codificadas por distintos genes, para ambas cadenas polipeptídicas (Fambrough, 1988; Levenson, 1994; Lingrel *et al.*, 1990, 1994; Sweadner, 1989, 1991). La inhibición por cardiotónicos en preparaciones de la enzima de roedores hizo evidente la existencia de isoformas de la bomba de Na^+ (Marks, 1978). Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular se identificaron al menos 3 subunidades α en los vertebrados, conocidas respectivamente como $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ (Shull *et al.*, 1986, 1985; Sverdlov *et al.*, 1987). Recientemente Shamraj y Lingrel identificaron una cuarta isoforma α ($\alpha 4$) en el testículo del ratón (1994).

En la actualidad, se han identificado tres diferentes isoformas de la subunidad β de la ATPasa Na^+/K^+ . Dos de las isoformas, $\beta 1$ y $\beta 2$, se encontraron en tejidos de mamíferos (Gloor *et al.*, 1990; Martín-Vasallo *et al.*, 1989) y en aves (Lemas and Fambrough, 1993), mientras que $\beta 3$ se detectó en anfibios (Good *et al.*, 1990), ratón (Besirli *et al.*, 1997), rata y humano (Gloor *et al.*, 1990; Martín-Vasallo *et al.*, 1989).

Las isoformas de ambas subunidades α y β de la ATPasa Na^+/K^+ presentan un patrón de expresión tejido específico (Tablas IV y V). Además, este patrón de expresión está sujeto al estado de desarrollo de tejido y/o organismo, así como a la regulación hormonal y puede alterarse durante algunas enfermedades como la hipertrófia ventricular (Blanco *et al.*, 1994c; Ewart and Klip, 1995; Charlemerne *et al.*, 1994; Charlemerne and Swynghedauw, 1995; Zahler *et al.*, 1996).

Tabla IV. Localización en tejidos de humano de las diferentes isoformas de las subunidades α y β de la ATPasa Na^+/K^+

Isoforma	Localización	Referencia
$\alpha 1$	Casi todos los tejidos.	Fambrough, 1988; Levenson, 1994; Lingrel <i>et al.</i> , 1990; Lingrel, 1992; Sweadner, 1989
$\alpha 2$	Corteza renal, médula, papila gustativa, adipocitos, músculo, corazón y cerebro (células gliares).	Lucking <i>et al.</i> , 1996; Lytton <i>et al.</i> , 1985, Hundal <i>et al.</i> , 1992; Lavoie <i>et al.</i> , 1997; Zahler <i>et al.</i> , 1992; McGrail, 1991; Brines and Robbins, 1993; Cameron <i>et al.</i> , 1994; Fink <i>et al.</i> , 1996
$\alpha 3$	Corteza renal, médula, papila, tejido nervioso, neuronas.	Lucking <i>et al.</i> , 1996; Hieber <i>et al.</i> , 1991; McGrail <i>et al.</i> , 1991, Levenson, 1994; Sweadner, 1992
$\alpha 4$	Testículo.	Shamraj and Lingrel, 1994
$\beta 1$	Casi todos los tejidos.	Eakle, 1995; Levenson, 1994, Lingrel <i>et al.</i> , 1990; Lingrel, 1992; Sweadner, 1989
$\beta 2$	Músculo esquelético, glándula pineal, tejido nervioso.	Lavoie <i>et al.</i> , 1997; Shyjan <i>et al.</i> , 1990, Peng <i>et al.</i> , 1997
$\beta 3$	Testículo, retina, hígado, pulmón	Arystarkhova and Sweadner, 1997; Marks and Seeds, 1978

Se han determinado otros mecanismos implicados en la generación de las isoformas de la ATPasa Na^+/K^+ , como las variaciones en el procesamiento transcripcional de los mensajeros, que ocurren en algunas células. En músculo vascular canino (Medford *et al.*, 1991), $\alpha 1$ -T ha perdido el 40% de la secuencia carboxílica terminal. En el epitelio de la retina humana también se

han encontrado transcriptos truncados de las subunidades α y β . La secuencia truncada de la isoforma $\alpha 1$ se produjo por una deleción que generó un codón de término que produce un extremo carboxilo terminal similar al de la ATPasa de calcio de retículo sarcoplásmico. El polipéptido $\beta 1$ truncado es dos aminoácidos más pequeño del extremo COOH terminal, además de diferir en los últimos dos aminoácidos (Ruiz *et al.*, 1995).

Otro mecanismo que contribuye a la heterogeneidad de la bomba de Na^+ es la asociación de las isoformas α y β en diferentes heterodímeros (Tabla V).

Tabla V. Localización de diferentes isoformas de la ATPasa Na^+/K^+

Isoforma	Localización	Referencia
$\alpha 1\beta 1$	Casi en todos los tejidos	Fambrough, 1988; Levenson, 1994, Lingrel <i>et al.</i> , 1990; Lingrel, 1992; Sweadner, 1989
$\alpha 1\beta 2$	Glándula pineal	Shyjan <i>et al.</i> , 1990
$\alpha 2\beta 1$	Células del plexo coroideo	Zlokovic <i>et al.</i> , 1993
$\alpha 2\beta 3$	Corteza renal, médula, papila gustativa	Lucking <i>et al.</i> , 1996
$\alpha 3\beta 2$	Células fotorreceptoras de retina	Schneider and Kraig, 1990; Schneider <i>et al.</i> , 1991
$\alpha 3\beta 3$	Glándula pineal	Shyjan <i>et al.</i> , 1990

Existen poblaciones celulares que expresan varias isoformas con el potencial de múltiples combinaciones de α y β . Dichas poblaciones están en el sistema nervioso central (Levenson, 1994; Sweadner *et al.*, 1992), en las células epiteliales ciliares del ojo (Ghosh *et al.*, 1990), en el órgano sensorial del oído (Ten Cate *et al.*, 1994), y en el plexo coroideo (Zlokovic *et al.*, 1993).

La posibilidad de combinación de diferentes heterodímeros fue sugerida por la expresión de múltiples isoformas en varios tejidos y células (Cameron *et al.*, 1994; Levenson, 1994; Peng *et al.*, 1997; Schneider and Kraig, 1990; Schneider *et al.*, 1991; Zlokovic *et al.*, 1993). La facilidad de asociación entre las isoformas α y β se confirmó con la expresión de diferentes combinaciones de polipéptidos de la ATPasa Na^+/K^+ de rata en células de insecto. En este sistema de expresión, cada subunidad α puede ensamblarse con cualquier subunidad β formando un complejo catalíticamente activo (Blanco *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1994b; Blanco *et al.*, 1995a, b).

En preparaciones de la enzima se ha identificado también una tercera proteína determinada subunidad γ (Reeves *et al.*, 1980). La subunidad γ es un pequeño polipéptido hidrofóbico de 8 a 14 KDa que fue inicialmente considerado un contaminante de la purificación. Sin embargo, se demostró que es parte de la enzima (Forbush *et al.*, 1978; Lowndes *et al.*, 1984; Rogers and Lazdunski, 1979). Otra evidencia de que la subunidad γ es un componente de la ATPasa Na^+/K^+ es la colocalización con la subunidad α en segmentos de la nefrona y la coinmunoprecipitación con el complejo α - β (Mercer *et al.*, 1993). El alto grado de identidad de esta subunidad a través de diversas especies sugiere que puede ser importante en la función de la enzima. Los estudios de expresión han demostrado que la subunidad γ no se requiere para la actividad normal de la ATPasa Na^+/K^+ (DeTomaso *et al.*, 1993; Hardwicke and Freytag, 1981; Scheiner-Bobis and Farley, 1994). Recientemente en la isoforma $\alpha 1\beta 1$ expresada en ovocitos de *Xenopus*, se demostró que la subunidad γ puede modificar el voltaje dependiente de la activación por K^+ (Beguin *et al.*, 1997). Al parecer la subunidad γ puede estabilizar la conformación E1 de la enzima (Therien *et al.*, 1997) y puede requerirse para el desarrollo de embriones de ratón (Jones *et al.*, 1997). Por otra parte se ha establecido que la subunidad γ pertenece a una pequeña familia de proteínas implicadas en el transporte de iones a través de la

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

membrana plasmática. Esta familia de proteínas induce la actividad de canales iónicos, cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus*. Congruente con estos datos, cuando se encuentra presente la subunidad γ , selectivamente se inducen canales catiónicos en los ovocitos de *Xenopus* (Minor *et al.*, 1998). La importancia fisiológica de esta actividad se desconoce, aunque la información refuerza la evidencia de que la subunidad γ puede modificar la función de la ATPasa Na^+/K^+ .

2.2.3.3. ESTRUCTURA PROTEÍCA

La complejidad de la ATPasa Na^+/K^+ puede también extenderse a la estructura de la enzima. Se ha demostrado que diferentes isoformas α pueden asociarse en complejos oligoméricos. Sin embargo, se desconoce si la estructura cuaternaria de la bomba de Na^+ influye en las propiedades funcionales de la enzima (Blanco *et al.*, 1994a).

Las secuencias peptídicas completas de las isoformas α se dedujeron de los DNACs que codifican para los polipéptidos de la rata (Schneider, 1985; Shull, 1986), pollo (Fambrough and Bayne, 1983) y humano (Lingrel *et al.*, 1990; Sverdlov *et al.*, 1987). Las subunidades α en la rata varían ligeramente en su tamaño; la subunidad $\alpha 1$ posee 1,024 aminoácidos, $\alpha 2$ posee 1,021, $\alpha 3$ es la más pequeña con 1,014, y $\alpha 4$ es la más grande con 1,028 residuos. Los estudios de la secuencia de aminoácidos, marcaje de sitios específicos y digestión proteolítica han contribuido para obtener un modelo de la posible orientación de la subunidad α en la membrana plasmática (Arystarkhova *et al.*, 1995; Canfield and Levenson, 1993; Lingrel *et al.*, 1994; Lingrel and Kuntzweiler, 1994; Mohraz *et al.*, 1994; Pedemonte and Kaplan, 1990; Sweadner and Arystarkhova, 1992; Vasilets and Shwarz, 1993). Estos estudios predicen que la región NH_2 -terminal tiene 4 porciones que atraviesan la membrana, un gran segmento citoplasmático de un tercio del polipéptido y una región COOH -terminal que contiene 6 segmentos transmembranales.

La identidad entre las isoformas es alta (Tabla VI). La mayor variabilidad estructural se encuentra en el NH₂-terminal, los sitios de unión a ouabaína entre los segmentos transmembranales 1 y 2 (de 4 a 8 sitios), y la región citoplasmática entre los aminoácidos 403 y 503. Los sitios con mayor identidad son la región citoplasmática donde se encuentran el sitio de unión al ATP, el sitio de fosforilación, las regiones hidrofóbicas transmembranales y la región COOH-terminal (Levenson, 1994; Lingre *et al.*, 1994; Mercer, 1993).

Tabla VI. Identidad entre las isoformas de la subunidad α de la ATPasa de Na⁺/K⁺

Isoformas comparadas	Identidad	Referencia
$\alpha 1-\alpha 2$	92%	Lingre <i>et al.</i> , 1994; Mercer, 1993
$\alpha 1-\alpha 3$	96%	Lingre <i>et al.</i> , 1994; Mercer, 1993
$\alpha 2-\alpha 3$	91%	Lingre <i>et al.</i> , 1994; Mercer, 1993
$\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$	87%	Lingre <i>et al.</i> , 1994; Mercer, 1993
$\alpha 1-\alpha 4$	78%	Levenson, 1994

Las secuencias de aminoácidos de las isoformas β se dedujeron de los DNAs de la rata (Malik *et al.*, 1996), humano (Ruiz *et al.*, 1995), pollo (Lemas and Fambrough, 1993), sapo (Gloor *et al.*, 1990), y ratón (Martin-Vasallo *et al.*, 1989). En la rata, la isoforma $\beta 1$ tiene 304 aminoácidos, la isoforma $\beta 2$ tiene 290, y la isoforma $\beta 3$ tiene 279 aminoácidos. Todas las isoformas β poseen una estructura básica común (Esquema 5): una región citoplasmática, un segmento transmembranal, y un gran dominio extracelular. La identidad entre las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ a través de las especies de mamíferos es del 95%. Este valor baja a un 60% cuando se compara con otras especies que no sean

mamíferos. La homología entre las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ es del 34% y la similitud es del 24%, mientras que $\beta 1$ y $\beta 3$ exhiben un 68% de similitud con un 39% de identidad. La similitud entre $\beta 2$ y $\beta 3$ alcanza un 61%, con 49% de residuos conservados (Malik *et al.*, 1996). El segmento transmembranal de la subunidad β es una región altamente conservada entre las isoformas y las especies. Todas las isoformas β están altamente glicosiladas. La isoforma $\beta 1$ de los mamíferos tiene tres sitios de N-glicosilación. Los posibles sitios de glicosilación para la isoforma $\beta 2$ varían dependiendo de la especie, de tal forma que la subunidad del pollo tiene cuatro posibles sitios, en la rata existen siete, en el humano existen ocho y en el ratón se han encontrado nueve (Chow and Forte, 1995). Sin embargo se desconoce si todos los sitios son utilizados. La inhibición de la glicosilación de la subunidad β de la ATPasa de Na^+/K^+ con tunicamicina resulta en una bomba de Na^+ catalíticamente competente con una afinidad normal a la ouabaína (Takeda *et al.*, 1988; Zamofing *et al.*, 1988, 1989). La expresión de una enzima teniendo una subunidad β con los sitios de N-glicosilación mutados también da como resultado una enzima activa con afinidad por K^+ y ouabaína normales. La disminución de la glicosilación de la subunidad β reduce su habilidad para ensamblarse con la subunidad α en la membrana, y aumenta la sensibilidad de la enzima (ambas subunidades) a la proteólisis, sugiriendo que la glicosilación juega un papel importante en el plegamiento de la proteína (Beggah *et al.*, 1997).

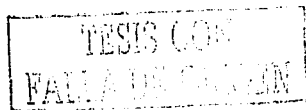
Otra importante característica de la estructura de la subunidad $\beta 1$ es la presencia de tres puentes disulfuro en la región extracelular, los cuales en la rata se encuentran en $\text{Cys}^{125}\text{-Cys}^{148}$, $\text{Cys}^{158}\text{-Cys}^{174}$, y $\text{Cys}^{212}\text{-Cys}^{275}$. Todas las cisteínas, pero no su posición relativa, están conservadas en la secuencia de las isoformas $\beta 2$ y $\beta 3$, sugiriendo similitudes en la estructura terciaria de los polipéptidos. El tratamiento de la ATPasa de Na^+/K^+ con agentes reductores que rompen los enlaces disulfuro, produce la inactivación de la enzima,

sugiriendo que los puentes disulfuro se requieren para la función de la ATPasa de Na^+/K^+ . El quitar cualquier puente disulfuro, por mutagénesis dirigida de las cisteínas involucradas, es suficiente para evitar su ensamble adecuado, por lo cual la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ disminuye (Beggah *et al.*, 1997).

2.2.3.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La caracterización de las propiedades funcionales de las diferentes combinaciones de polipéptidos α y β ha sido difícil. Frecuentemente se expresa más de una isoforma en la misma célula, complicando el análisis individual de las isoformas. La isoforma $\alpha_1\beta_1$ se ha analizado ampliamente, debido a que constituye prácticamente el único tipo en el riñón. La comparación de la afinidad por los sustratos de las enzimas de riñón y de cerebro (Urayama and Nakao, 1979), determinó que la isoforma renal $\alpha_1\beta_1$ presenta menor afinidad por el ATP, similar para el K^+ y mayor para el Na^+ que la enzima neuronal $\alpha_2\beta_3$ (Sweadner, 1985). En el conejo, perro y humano, la diferencia en la afinidad a los esteroides cardiotónicos no es marcada, aunque la isoforma α_1 en estas especies es mucho más sensible a la ouabaína (Berrebi-Bertrand and Maixent, 1994; Hansen, 1992; Harashima *et al.*, 1988; Hauger *et al.*, 1985; Jensen, 1992; Madsen *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1996).

Mediante técnicas de biología molecular, se han utilizado células de mamíferos para expresar separadamente cada isoforma de la ATPasa de Na^+/K^+ . Así se determinó que los valores de K_i para la ouabaína son de 40 y 80 nM para las isoformas α_2 y α_3 , respectivamente (Hara *et al.*, 1988; Kolansky *et al.*, 1992). Los análisis de las isoformas por separado demuestran que $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_3\beta_1$ presentan una afinidad similar por el ATP y K^+ , mientras que la isoforma $\alpha_3\beta_1$ tiene menor afinidad por Na^+ comparado con $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$. También se demostró la gran susceptibilidad de la bomba de Na^+ de cerebro



de rata y corazón de perro a ser inactivada, debido a que la isoforma presente es la $\alpha_3\beta_1$ (Berrebi-Bertrand and Maixent, 1994; Gerbi *et al.*, 1993).

Las células de insecto se han utilizado para ensamblar varias isoformas α y β en una enzima funcional (Blanco *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1994b; Blanco *et al.*, 1995a, b; DeTomaso *et al.*, 1993). La infección de células con baculovirus recombinantes ha permitido demostrar que todas las isoformas α pueden ensamblarse establemente con cualquier polipéptido β_1 o β_2 (Ackermann and Geering, 1992; Lemas *et al.*, 1994; Schmalzing *et al.*, 1992). Aunque todos los posibles pares α y β resultan en una enzima activa, algunas combinaciones, tal como $\alpha_1\beta_2$, tienen baja actividad, sugiriendo que no todas las asociaciones son igualmente favorecidas. La evidencia para la selectiva interacción de ciertas subunidades α y β se ha demostrado en ovocitos de *Xenopus* (Schmalzing *et al.*, 1997). Sin embargo la importancia de la asociación o expresión de una u otra isoforma en específico en cierto tejido es desconocida.

Utilizando las isoformas de rata expresadas en células de insecto y mediante análisis de curvas de dosis respuesta para el Na^+ , K^+ , ATP y la ouabaina se determinaron los parámetros cinéticos (Tabla VII).

Tabla VII. Características cinéticas de las isoformas de la ATPasa de Na⁺/K⁺ de rata expresadas en células de insecto Sf-9.

Isoforma	Catión Na ⁺ K _{0.5} , mM	Catión K ⁺ K _{0.5} , mM	Sustrato ATP K _m , mM	Inhibición con ouabaina K _i , mM
α1β1 nativa	17.5 ± 0.4	2.1 ± 0.7	0.32 ± 0.04	9.8 ± 0.9E-5
α1β1	16.4 ± 0.7	1.9 ± 0.2	0.46 ± 0.10	4.3 ± 1.9E-5
α2β1	12.4 ± 0.5	3.6 ± 0.3	0.11 ± 0.01	1.7 ± 0.1E-7
α2β2	8.8 ± 1.0	4.8 ± 0.4	0.11 ± 0.02	1.5 ± 0.2E-7
α3β1	27.9 ± 1.3	5.3 ± 0.3	0.09 ± 0.01	3.1 ± 0.3E-8
α3β2	17.1 ± 1.0	6.2 ± 0.4	0.07 ± 0.02	4.7 ± 0.4E-8

La enzima α1β1 de rata expresada en células de insecto es 2 veces más sensible, y la α3β1 aproximadamente 20 veces menos sensible a la ouabaina que la enzima α1β1 nativa. Esta diferencia en sensibilidad entre la nativa y la expresada puede ser resultado de la diferencia en el ambiente lipídico que la rodea. Alternativamente, la sensibilidad a la ouabaina puede ser influenciada por la subunidad γ o por la estructura oligomérica de la subunidad α.

2.2.3.5. Relevancia fisiológica de las isoformas de la ATPasa de Na⁺/K⁺

Las múltiples isoformas de la ATPasa de Na⁺/K⁺ con diferentes afinidades por el Na⁺ puede ser fisiológicamente importantes en el control secundario de los niveles de Ca²⁺ intracelular. Las variaciones en el Ca²⁺ citoplasmático son importantes en la regulación de la contracción, secreción y excitabilidad (Blaustein, 1993).

La estricta regulación de la expresión de los polipéptidos α y β bajo varias condiciones fisiológicas sugiere una diferencia funcional de las isoformas. Durante el desarrollo ocurre un cambio en la cantidad relativa de las isoformas

en varios tejidos (Orlowski and Lingrel, 1988). Un ejemplo es la regulación de la expresión de las isoformas de la ATPasa de Na^+/K^+ durante el desarrollo del corazón de la rata. En este tejido, entre la segunda y tercera semana de vida, se da un cambio en la expresión de la isoforma $\alpha 3$ a la isoforma $\alpha 2$, la cual es la isoforma predominante en el miocardio del adulto (Lucchesi and Sweadner, 1991). Además se ha observado que coincide con cambios importantes en las propiedades electrofisiológicas del miocardio (Lingrel *et al.*, 1990; Lucchesi and Sweadner, 1991). En varias enfermedades cardiacas se modifica la composición de las isoformas. Estos cambios pueden reflejar el intento por reestablecer la función alterada asociada con la enfermedad (Book *et al.*, 1994).

III. ANTECEDENTES

En parásitos se conoce muy poco sobre las ATPasas de cualquier tipo (P, V o F). En el helminto *Schistosoma mansoni* se clonaron dos isoformas de la ATPasa tipo P: ATPasa de Calcio (SMA1 y 2) (De Mendoza *et al.*, 1995; Talla *et al.*, 1998). SMA1 cuenta con 1022 aminoácidos y una masa molecular de 113 kDa. Esta proteína tiene 67% de identidad con otras ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), pero ha perdido el dominio de fosforilación que existe en las isoformas de humano SERCA 1 y 2. El análisis de la secuencia de aminoácidos de SMA1 indicó que tiene dos asas citoplasmáticas y diez segmentos hidrofóbicos, los cuales son característicos de las ATPasas Tipo P. SMA2 se ha expresado en la levadura, y sus características sugieren su presencia únicamente en las membranas internas de ambos organismos. SMA1 y SMA2 están involucradas en procesos de regulación de la concentración de calcio y por tanto en la regulación de la homeostasis celular. En *T. solium* hasta la fecha sólo se conoce que existe actividad de ATPasa en la superficie externa del parásito (Sosa, 1978). Sin embargo no fue identificada la enzima o enzimas que tenían dicha actividad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El interés en *Taenia solium* radica en su capacidad de infectar al humano produciendo la neurocisticercosis y la teniasis. Debido al relevante papel que la ATPasa de Na^+/K^+ juega en la fisiología de las células de organismos eucariotes y procariotes sería de gran importancia caracterizar a esta enzima en un parásito: *T. solium*. La generación del conocimiento básico de los genes que codifican para la ATPasa de Na^+/K^+ y las características de sus productos podrían conducirnos a desarrollar mejores estrategias para la erradicación de este parásito.

V. HIPÓTESIS

Las células de *Taenia solium*, igual que las de todos los organismos, requieren un sistema que le proporcione un gradiente eléctrico y químico para su homeostasis y para la toma de nutrientes. Por ello es posible que la enzima ATPasa de Na^+/K^+ se encuentre en el cisticerco de este parásito.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Identificación de la ATPasa de Na^+/K^+ , aislamiento y caracterización del DNAc que codifica para la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de membrana de cisticerco *Taenia solium*.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación de la ATPasa de Na^+/K^+ en cisticerco de *T. solium*.
- Purificación de la ATPasa de Na^+/K^+ de cisticerco de *T. solium*.
- Localización de la ATPasa de Na^+/K^+ en el tejido de cisticerco de *T. solium*.
- Producción de sonda de DNA para el tamizaje de una biblioteca de DNAc de cisticerco de *T. solium*.
- Aislamiento y caracterización del DNAc que codifique para la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

Los metacéstodos de *Taenia solium* se obtuvieron por disección del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente. Los cisticercos fueron lavados con una solución de antibióticos (penicilina 1000 U/ml y estreptomicina 1000 U/ml) en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y se guardaron a -70°C hasta su uso. Los anticuerpos anti-ATPasa tipo P de *Neurospora crassa* fueron donados por el Dr. Juan Pablo Pardo de la Facultad de Medicina.

7.2. Métodos bioquímicos

7.2.1. Obtención de membranas

La fracción de membranas se obtuvo homogeneizando por 5 segundos en un Polítron (Brinkmann), 1 g de cisticercos en sacarosa 0.25 M en PBS, conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF, TLCK y EDTA). La suspensión obtenida se centrifugó a 1000 xg por 10 min. Las fracciones obtenidas se denominaron FM1 (fracción membranal 1) al precipitado, y FS1 (fracción soluble 1) al sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 3000 xg por 30 min., obteniendo dos fracciones: un precipitado y un sobrenadante, que se denominaron FM2 (fracción membranal 2) y FS2 (fracción soluble 2) (Skou and Esmann, 1992).

7.2.2. Cuantificación de proteína

Las fracciones obtenidas y utilizadas en todos los ensayos se sometieron a una cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado por Hartree (1972), utilizando una curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA). Por duplicado se colocaron en tubos de ensayo 200 μl de la muestra y se les agregó 1 ml de una solución compuesta por 50 partes de la solución "A" (ver apéndice) y 1 parte de solución "B". La mezcla se agitó y se dejó en

reposo por 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μ l de una solución de Folin 1:2 en agua y se dejaron reposar 45 min. Finalmente, se leyó la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo Du 640.

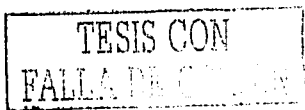
7.2.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

Se mezclaron 100 μ g de la muestra correspondiente con amortiguador de muestra de Laemmli 2X y se hirvieron durante 3 min (Laemmli, 1970). Las proteínas de las muestras se separaron en geles de poliacrilamida con SDS al 10% (p/v), en una cámara de electroforesis mini-Protean de la casa Bio-Rad. Para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (ver apéndice). La determinación del peso molecular de las bandas obtenidas en la electroforesis se llevó a cabo comparándolas con una mezcla de proteínas globulares estándares de la casa Bio-Rad.

7.2.4. Ensayo de actividad de ATPasa

La actividad se midió a 37°C en presencia o ausencia de ouabaína 10 mM o azida 5 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en 40 μ l de volumen total: 15 μ l de muestra (con la correspondiente cantidad de proteína total, diluida en solución de imidazol 25 mM) y 25 μ l de amortiguador de reacción (ver apéndice). Luego del tiempo apropiado se detuvo la reacción con 40 μ l de ácido tricloroacético 0.5 N (ATC). La cantidad de fósforo inorgánico (Pi) formado se cuantificó por el método de verde de Malaquita modificado (Hightower and McCarty, 1996).

Una vez detenida la reacción con ATC, se adicionaron 80 μ l de la solución C (ver apéndice) y la mezcla se agitó por 2 min. Posteriormente se adicionaron 80 μ l de una solución de ácido cítrico al 10% (p/v) y a los de 30



min. se determinó la absorbencia a 630 nm en un lector de ELISA modelo 550 marca Bio-Rad. La cantidad de Pi se calibró con una curva conteniendo diferentes cantidades de KH_2PO_4 en ácido perclórico (APC) 0.3 M, se incubó por 40 min. a 25°C y se registró su absorbencia a 630 nm. El APC hidroliza al KH_2PO_4 , formando 10 nmol de P_i por cada 10 μl de KH_2PO_4 1 mM.

7.2.5. Purificación de la ATPasa de Na^+/K^+ por cromatografía de afinidad

a) Preparación de la columna de afinidad a ouabaina

Se utilizó 1 g de una matriz de agarosa epóxica con un brazo para 12 átomos (Sigma Chemical), se rehidrató y lavó tres veces con agua desionizada y se activó con amortiguador de carbonatos (ver apéndice). Después se le adicionó una solución de ouabaina 10 mM en amortiguador de carbonatos y se incubó durante 20 h a 37°C en agitación rotatoria suave. Se retiró la solución y se lavó la matriz con la solución amortiguadora de carbonatos y luego con agua destilada. Posteriormente se adicionó una solución de etanolamina 1 M pH 8.5 y se incubó por 4 h a 37°C en agitación rotatoria. Finalmente se lavó una vez con una solución de Tris-Base 200 mM pH 8.5 y otra vez con una solución de imidazol 25 mM pH 7.4. La matriz (1 ml) se transfirió a una columna (1 x 10 cm), se equilibró con 50 ml de solución de equilibrio (ver apéndice) y se almacenó a 4°C hasta que fue utilizada (Yingst *et al.*, 1998). La eficiencia de la unión se determinó empíricamente con la cantidad de proteína unida de la fracción FM1.

b) Cromatografía de afinidad

La matriz de la columna se equilibró con 5 ml de la solución de unión (ver apéndice). Posteriormente, se cerró la parte inferior de la columna y se agregó la fracción FM1 mezclada (1:2) con la solución de unión, se cerró la parte superior de la columna y se incubó por 4 h a 4°C agitando por inversión en un agitador Bellco Biotechnology. La columna se colocó en posición vertical, se drenó y se lavó la matriz con 10 ml de la solución de unión a temperatura

ambiente y una vez con la misma solución a 37°C. Luego de drenar completamente el líquido se cerró la parte inferior de la columna, se agregaron 1.5 ml de una solución de elución (ver apéndice) y se incubó con agitación por inversión durante 15 min. a 37°C. La columna se colocó en posición vertical, se drenó y lavó con 0.5 ml de solución de elución. La fracción obtenida se sometió a SDS-PAGE y se determinó su actividad de ATPasa. Después se lavó la matriz de la columna con 2 ml de una solución de elución total (ver apéndice), que contiene SDS para eliminar totalmente las proteínas. Finalmente la columna se volvió a equilibrar con 50 ml de la solución de equilibrio y se guardó a 4°C (Yingst *et al.*, 1998).

7.3. Métodos inmunológicos

7.3.1. Producción de anticuerpos policlonales contra un péptido sintético específico de la ATPasa de Na⁺/K⁺ de *T. solium*

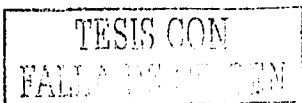
Se mandó sintetizar un péptido de los primeros 18 aminoácidos de la región amino-terminal de la subunidad α de la ATPasa Na⁺/K⁺ de *T. solium*. Estos 18 aminoácidos fueron deducidos a partir de la secuencia nucleotídica obtenida de la clona aislada en esta tesis. Este péptido fue utilizado para producir anticuerpos en un conejo Nueva Zelanda de aproximadamente 2 meses de edad, al cual se le inyectó subcutáneamente 100 μ g del péptido sintético acoplado a BSA, mezclado con Al(OH)₃ (1:2) como adyuvante. Se inyectó la mezcla anterior a los 0, 15 y 30 días. Luego de la tercera inyección se sangró al conejo para evaluar la producción de anticuerpos contra los 18 aminoácidos del amino-terminal de la subunidad α de la ATPasa Na⁺/K⁺ de *T. solium*. Mediante un ELISA, se determinó un título de 1:5000 en el suero. El conejo fue sangrado a blanco mediante punción cardíaca y se obtuvo el suero por centrifugación a 2000 xg por 10 min. Este suero que contiene los anticuerpos se denominó anti-₁₈NH₂-terminal subunidad α de la ATPasa Na⁺/K⁺.

7.3.2. Inmunoelctrotransferencia (IET)

Después de separar las proteínas en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC). Para lo cual, el gel, las membranas de nitrocelulosa, papeles filtro del tamaño del gel y las esponjas de una cámara de transferencia modelo mini Trans-Blot marca Bio-Rad, se humedecieron en una solución amortiguadora de transferencia (ver apéndice). Posteriormente se colocaron en el siguiente orden: un par de papeles filtro, sobre ellos el gel, encima la membrana de nitrocelulosa y nuevamente un par de papeles filtro. Después se colocaron en el contenedor de la cámara de transferencia colocando el gel hacia el ánodo, evitando en todo momento la formación de burbujas. Se llenó la cámara con el amortiguador de transferencia y se aplicó una corriente de 100 miliamperes durante 1 h. Una vez terminada la transferencia, la membrana de NC se lavó con amortiguador PBS (ver apéndice) y se cortaron tiras de NC de aproximadamente 3 mm (conteniendo todas las proteínas). La tira de NC se bloqueó durante 30 min. a temperatura ambiente con una solución de leche descremada Svelty al 5% (p/v) en PBS-Tween al 0.03% (v/v). Posteriormente se agregó el suero a evaluar (1^{er} anticuerpo) a la dilución adecuada en la misma solución de bloqueo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Las tiras se lavaron 3 veces durante 5 min. cada vez con la solución de PBS-Tween, se adicionó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (2^{do} anticuerpo) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente se lavaron las tiras como se indicó anteriormente y se adicionó una solución reveladora (Towbin, 1979).

7.3.3. Inmunofluorescencia indirecta

Los cisticercos obtenidos de cerdos infectados se lavaron con PBS y se incluyeron en Tissue-Tek (laboratorios Miles, Indianápolis, Indiana) e inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Se realizaron cortes de 6 µm en un crióstato (Cryo-cut, American Optical Corp.) y se colocaron en portaobjetos manteniéndolos en refrigeración



hasta su uso. Los cortes se incubaron 12 h a 4°C con anticuerpos anti- α -NH₂-terminal subunidad α de la ATPasa Na⁺/K⁺ (0.5 mg/ml) en PBS-Tween 0.03% (v/v) con albúmina sérica bovina (BSA) 1% (p/v). Posteriormente se lavaron durante 10 min. 4 veces con PBS-Tween y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) diluido 1:50 en BSA al 1% (p/v) en PBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron de la manera descrita y se montaron en una solución glicerol-PBS (9:1). Fueron fotografiados en un microscopio Nikon Optiphot con sistema de epifluorescencia. Como control negativo se utilizó suero de conejo no inmunizado como primer anticuerpo (Grzanna, 1982).

7.4. Métodos de biología molecular

7.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción se llevó a cabo utilizando como molde 100 ng de DNAC obtenido a partir de RNA total o bien DNA de fago de las clonas obtenidas de los tamizajes de la biblioteca de DNAC de cisticercos de *T. solium*. La reacción además contenía 50 pmol de cada uno de los iniciadores específicos, deoxi-nucleótidos tri-fosfato (dNTPs) 200 μ M de cada uno (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8.3, y 5 U de la enzima Taq Polimerasa (Biotecsa). La amplificación se llevó a cabo con un programa de un ciclo inicial de 3 min. a 95°C, 1 min. a 50°C y 2 min. a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1 min. a 95°C, 1 min. a 50°C y 2 min. a 72°C, y finalmente un ciclo de 1 min. a 50°C y 5 min. a 72°C. Los DNACs generados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en amortiguador TAE (ver apéndice) con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/ml. El DNAC se visualizó mediante luz UV. Para estimar el peso molecular de los DNACs obtenidos se corrieron a la par marcadores de peso molecular conocido (DNA del fago λ digerido con la endonucleasa Hind III, o el plásmido pBR322 digerido con la enzima de restricción Msp I).

7.4.2. Purificación de fragmentos de DNAc productos de PCR

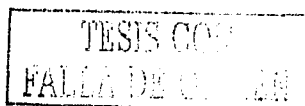
Una vez identificados los fragmentos resultantes de la PCR en un gel de agarosa, se cortaron y se disolvieron en una solución de NaI 6 M con agitación a 37°C. Una vez disuelta la agarosa, se agregaron 2 µl de perlas de vidrio (tratadas para unir al DNA por carga) y se incubó por 2 h a 4°C con agitación eventual. Se centrifugó a 5000 xg durante 30 segundos, se desechó el sobrenadante y las perlas fueron lavadas una vez con 500 µl de la solución de NaI y dos veces con una solución de lavado conteniendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, y etanol 50% (v/v). Finalmente las perlas se secaron a 37°C y se adicionaron 25 µl de solución amortiguadora TE (ver apéndice) e incubaron 30 min. a 37°C (Vogelstein and Gillespie, 1979).

7.4.3. Reacción de Klenow

Los fragmentos de DNAc previamente purificados se sometieron a una reacción con la enzima Klenow para generar extremos romos. Para ello se mezclaron 10 µg del DNAc, 2.5 µl de amortiguador de la enzima, 1 µl de dNTPs 1mM, 1 µl de la enzima (5 U) y se completó el volumen de la reacción a 25 µl con agua. La mezcla se incubó 30 min. a temperatura ambiente y se detuvo la reacción adicionando 1 µl de EDTA 0.5 M pH 8. Posteriormente se eliminaron las proteínas mediante una extracción con 25 µl fenol y luego dos extracciones con 25 µl de cloroformo. Finalmente, la fase acuosa se utilizó para precipitar el DNA con 2.5 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.3, y 70 µl de etanol frío e incubando a -70°C por 30 min. Luego de centrifugar 15 min. a 15,000 xg el precipitado se secó a 37°C y fue resuspendido en 15 µl de amortiguador TE.

7.4.4. Digestión de DNA con endonucleasas

De 1 a 5 µg del DNA (fragmentos de DNAc o vector plasmídico pUC18) se mezclaron con 10 µl del amortiguador de la enzima y 1 µl de la enzima de restricción a elegir: Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III, Pst I, Xba I, Xho I o Sma I



(Gibco-BRL) y se ajustó el volumen a 100 μ l. La reacción fue incubada de 3 a 6 h a 37°C. Posteriormente se precipitó el DNA y se resuspendió en 20 μ l de amortiguador de TE para cargarlo en un gel de agarosa (restricción de clonas) o para continuar con su tratamiento (fragmentos para clonarlos).

7.4.5. Defosforilación de DNA con fosfatasa alcalina intestinal

Luego de digerir el DNA de interés se resuspendió en 90 μ l de agua y se adicionaron 10 μ l de amortiguador de la fosfatasa alcalina intestinal (CIP) 10X, 0.5 unidades de CIP y se incubó por 1 h a 50°C. La reacción se detuvo adicionando 1 μ l de EDTA 0.5 M, pH 8, e incubando por 10 min. a 75°C. Se realizó una extracción con igual volumen de fenol y dos extracciones con cloroformo. La fase acuosa se tomó para precipitar el DNA, el cual se resuspendió en 10 μ l de amortiguador de TE.

7.4.6. Ligación de DNA

La ligación de los fragmentos con el vector apropiado se llevó a cabo en 20 μ l de amortiguador de ligación, 1 μ l de T4 Ligasa (1 U) (New England Biolabs) en un volumen final de 100 μ l, incubando a 16°C durante 12 horas. La reacción anterior fue utilizada para transformar células competentes TG1 (SupE, hsd 5, thi, -(lac-proAB), F'[traD36, proAB+, lacI^q, lacZ-M15]), las cuales se sembraron en medio sólido con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C por 12 horas. Las bacterias transformadas se seleccionaron por su resistencia a ampicilina. Las clonas positivas fueron sembradas en medio líquido con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron por 12 h a 37°C, en agitación. Las células obtenidas del cultivo anterior se utilizaron para realizar preparaciones pequeñas de DNA de plásmido de cada una de las clonas. Con dicho DNA se realizaron reacciones de PCR para identificar las clonas que contenían inserto.

7.4.7. Marcaje de la sonda

El marcaje de las sondas o fragmentos se llevó a cabo utilizando el estuche de marcaje con iniciadores al azar (Random Primer RTS RadPrime DNA Labeling System de Gibco-BRL). Aproximadamente 25 ng de DNA purificado en 45 μ l de amortiguador de TE se hirvieron durante 5 min. e inmediatamente se colocaron en hielo por un minuto. Después se adicionó el DNA a un tubo del estuche conteniendo todos los reactivos necesarios (amortiguador de reacción, dNTP's y la enzima Klenow) para el marcaje. Se agitó suavemente para hidratar los componentes y se adicionaron 5 μ l de (α - 32 P) dCTP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l). Nuevamente se mezcló y se incubó a 37°C durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 μ l de EDTA 0.2 M y se guardó a -20°C hasta su uso.

7.4.8. Tamizaje de una biblioteca de DNAC de cisticerco de *T. solium*

La biblioteca que se utilizó se preparó con anterioridad a partir de RNAM de cisticerco de *T. solium* y fue construida en el fago λ gt10 conteniendo un título de 7×10^9 fagos/ml. Para el tamizaje primario se mezclaron bacterias *Escherichia coli* cepa C600hfl (supE44, thi¹, LeuB6, lacY1, tonA21, L-(F_R, m_k+) mcrA-, hfl-) con aproximadamente 45,000 fagos de la biblioteca y se incubaron a 37°C durante 30 min. Después, las bacterias infectadas se mezclaron con agar Top-SOBM fundido a 48°C, se sembraron sobre agar SOBMsólido en 3 cajas de Petri de 120 mm de diámetro y se incubaron a 37°C hasta la aparición de placas líticas.

Después de permanecer 2 horas en refrigeración, los fagos contenidos en las placas de lisis fueron transferidos a papel de nitrocelulosa por duplicado. Esto se realizó manteniendo las membranas sobre las placas por 1 min. y se hicieron marcas para su posterior ubicación. Las membranas de nitrocelulosa se expusieron a una solución desnaturalizante durante 3 min., para liberar el DNA de los fagos. Inmediatamente se colocaron en una solución neutralizante

durante 3 min. Posteriormente se colocaron en una solución de SSC 5X (ver apéndice) por 3 min. Se eliminó el exceso de líquido que tenían y finalmente el DNA fue fijado a la membrana mediante luz ultravioleta durante 30 segundos en un UV Spectrolinker XL-1500 Crosslinker (Spectronic Corporation). Las membranas se trataron con la solución de pre-hibridación durante 4 h a 50°C. En esta misma solución se adicionó la sonda marcada radiactivamente y se incubó a la misma temperatura durante toda la noche. Luego de retirar la solución con la sonda marcada radiactivamente, las membranas se lavaron 4 veces a 55°C con una solución de SSC 2X y SDS 0.5% (p/v). Posteriormente se secaron y fueron expuestas sobre películas de autoradiografía X-OMAT (Kodak) por 24 horas a -70°C.

Las clonas se consideraron positivas si se encontraba una marca intensa en la misma posición en las dos réplicas correspondientes a la misma caja. Se identificaron las placas líticas correspondientes a las clonas positivas, se recogieron del agar y se resuspendieron individualmente en 1 ml de medio SM (ver apéndice). A partir de éstas se realizó un tamizaje secundario sembrando alrededor de 1000 fagos. Se aislaron las clonas positivas, y a partir de estas se realizó un tamizaje terciario donde se sembraron 100 fagos de cada una de las clonas positivas. Las clonas que resultaron positivas del tamizaje terciario fueron resuspendidas en medio SM (ver apéndice) y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

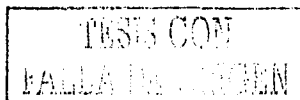
7.4.9. Purificación de DNA de fagos

Se infectó *E. coli* C600hfl con 5×10^6 fagos mediante su incubación conjunta a 37°C durante 15 min.; posteriormente se mezcló con medio top-SOBM-agarosa fundido a 48°C, se sembró sobre SOBMs sólido en cajas de Petri de 88 mm de diámetro y se incubó a 37°C hasta la confluencia de las placas líticas. Los fagos se recuperaron de la superficie de las placas agregando 5 ml del medio SM y agitando lentamente durante 1 h. La suspensión recuperada se mezcló con 200 µl de cloroformo y después se centrifugó a 6000 xg. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante, del cual se tomaron 700 µl y se adicionaron 700 µl de solución de polietilenglicol 8000 (PEG) incubando a 4°C durante 1 h. Esta mezcla se centrifugó a 15000 xg durante 15 min. a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 200 µl de medio SM, se le adicionaron 2 µg de RNAasa A, 0.2 µg de DNAasa 0.1 µl y se incubó durante 30 min. a 37°C. Se detuvo la actividad de las enzimas con 2 µl de SDS al 10% (p/v) y 2 µl de EDTA 0.5 M pH 8 incubando durante 15 min. a 68°C. Después se adicionaron 200 µl de fenol mezclando vigorosamente durante 1 min., manteniendo a temperatura ambiente durante 3 min. Posteriormente se agregaron 100 µl de cloroformo y se mezcló vigorosamente. La mezcla fue centrifugada a 15000 xg durante 2 min. y se recuperó la fase acuosa para repetir dos extracciones más con cloroformo. A la fase acuosa se le adicionaron 200 µl de isopropanol y se mantuvo 30 min. a -70°C para precipitar el DNA. Se centrifugó a 15000 xg por 10 min. a 4°C, el precipitado se lavó con etanol frío al 70% (v/v) y luego de remover el etanol se dejó secar a 37°C para finalmente ser resuspendido en 30 µl de TE. Los insertos de DNAs de los fagos de interés se amplificaron por medio de la PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonación del fago λgt10. Estos fragmentos se clonaron en el vector pUC18 siguiendo la metodología descrita anteriormente.

7.4.10. Purificación de DNA de plásmido

Las bacterias que fueron transformadas con plásmido recombinante se crecieron en 50 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37°C y en agitación constante. El cultivo se centrifugó a 6000 xg durante 10 min., se desechó el sobrenadante y el botón de células fue resuspendido en 5 ml de una solución que contenía glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8. Luego de permanecer 10 min. a temperatura ambiente se adicionaron 10 ml de una solución de NaOH 0.2 M y SDS 1% (p/v), la mezcla se agitó suavemente por inversión, se mantuvo 10 min. en hielo y se agregaron 7.5 ml de una solución de acetato de amonio 7.5 M agitando vigorosamente. Después de 10 min. en hielo, la mezcla se centrifugó a 6000 xg, 10 min. a 4°C y se recuperó el sobrenadante. A este último se le agregaron 15 ml de isopropanol y después de incubarlo 10 min. en hielo fue centrifugado nuevamente en la forma mencionada. El precipitado se resuspendió en 200 µl de TE, se le agregaron 20 µg de RNAasa y se incubó durante 30 min. a 37°C. Posteriormente se limpió el DNA por extracción con fenol y cloroformo como se indicó en la purificación de DNA de fago.

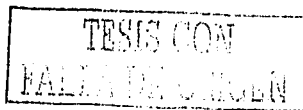
La fase acuosa recuperada se pasó a través de una columna de sefaroza-4B de 10 ml (1 x 15 cm), equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 0.5 ml y se determinó la presencia de DNA plasmídico en las fracciones por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE. El DNA de las fracciones que lo contenían fue precipitado con 50 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, 1 ml de etanol absoluto frío y se mantuvo 30 min. a -70°C. Posteriormente se centrifugó a 15000 xg 10 min. a 4°C, el DNA precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y se secó a 37°C para después resuspenderlo con 30 µl de TE. El DNA de las diferentes fuentes se cuantificó y se determinó su pureza por espectrofotometría, midiendo la absorbencia a 260 y 280 nm.



7.4.11. Secuenciación de DNA

Se utilizó el método de Sanger con ligeras modificaciones para realizar la secuenciación, con un estuche de T7 Sequenase Versión 2.0 (Amersham Co). Se colocaron en tubos Eppendorf 2.5 μ l de cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos (A, C, G, T) (ddNTPs) y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Se preparó una mezcla de 5.5 μ l de agua, 1 μ l de NSA 10X y 0.5 μ l de HCl 1 N denominándola "solución de alineación". Se preparó una mezcla que contenía 1 μ l de ditiotreitól (DTT) 2X, 2 μ l de dNTPs diluidos (1:5), 2 μ l de sequenasa diluida en su amortiguador (1:8) y 0.5 μ l de α S³⁵ (dATP 500-1200 Ci/ mmol de Amersham). Esta mezcla se denomina "mezcla maestra" y se mantuvo en hielo hasta su uso. Posteriormente, se mezclaron 3 pmol (1 μ l) del iniciador específico con 0.5 μ l de NaOH 1 N, y con 300 ng (2.5 μ l) del DNA molde para secuenciar. Esta mezcla se incubó a 37°C por 10 min. y se agregaron 7 μ l de la solución de alineación y se incubaron por 5 min. a la misma temperatura. Después se agregaron 5.5 μ l de la mezcla maestra y se incubó por 5 min. adicionales a temperatura ambiente; inmediatamente se colocaron 3.5 μ l de esta reacción en cada uno de los tubos que contenían los ddNTPs y se incubaron a 45°C por 5 min., transcurrido el tiempo se agregaron 4 μ l de la solución de paro incluida en el estuche.

Los productos de las reacciones obtenidas se corrieron en un gel de acrilamida al 6% (p/v) de 0.4 mm de grosor y 45 cm de altura. Se utilizó una cámara de secuencia modelo S2 (Gibco BRL Sequencing System), y la electroforesis se corrió a 55 Watts, utilizando un amortiguador de TBE 1X. Después del tiempo de corrida, se fijó el gel durante 10 min. con una solución de ácido acético al 10% (v/v) y se secó en un horno a 55°C. El gel se puso en contacto con una placa de autoradiografía X-OMAT (Kodak) por 48 h a -70°C. Posteriormente la placa se reveló y fijó para hacer la lectura de la secuencia obtenida.



7.4.12. Deducción y análisis de la secuencia de aminoácidos

Después de conocer la secuencia nucleotídica del DNAc que codifica para la subunidad α de la ATPasa de Na⁺/K⁺, se identificó el marco de lectura correcto y se realizó la deducción de su secuencia de aminoácidos. Utilizando programas computacionales como el PC/GENE de Intelligent, Inc. y el programa GCG de la Universidad de Wisconsin, USA. Otros análisis realizados con estos programas fueron la determinación de sitios activos, sitios de fosforilación, identificación de hidrofobicidad, identificación de los segmentos transmembranales, determinación de la orientación del extremo amino-terminal (intra o extracelular), así como análisis de alineamiento y comparación de secuencias de aminoácidos.

7.5. Apéndice: soluciones

- Agar SOBM: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y agar bacteriológico 1.5% (p/v).
- Agar Top SOBM: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y agar bacteriológico 0.7% (p/v).
- Amortiguador de carbonatos: carbonato de sodio 100 mM, pH 8.5.
- Amortiguador de reacción: NaCl 100 mM, KCl 20 mM, ATP 3 mM, MgCl₂ 3 mM en Imidazol 25 mM, pH 7.4.
- Amortiguador para muestra de Laemmli 2X: SDS 3% (p/v), Tris HCl 62.5 mM y 2-β mercaptoetanol 5% (v/v), pH 6.8.
- Azul de Coomassie: metanol 50% (v/v), azul de Coomassie R-350 0.05% (p/v), ácido acético 10% (v/v).
- Gel de acrilamida al 6% (p/v): 33.75 g de urea, 18 ml de H₂O, 11.25 ml de acrilamida 40% (p/v) - bis-acrilamida 2% (p/v), 13.5 ml de TBE 5X, 800 μl de persulfato de amonio al 10% (p/v) y 5 μl de TEMED.
- Medio LB: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.05% (p/v), NaCl 1% (p/v).
- Medio SM: NaCl 0.58% (p/v), MgSO₄·7H₂O 0.2% (p/v), Tris-HCl 0.05% (p/v) pH 7.5, gelatina 0.01% (p/v).
- Medio SOBM agarosa: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05% (p/v), KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y agarosa 1.5% (p/v).
- Medio Top SOBM agarosa: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.05, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y agarosa 0.7% (p/v).
- NSA 10X: Tris-HCl 400 mM pH 7.5 y MgCl₂ 200 mM.
- PBS: Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM y NaCl 100 mM, pH 7.5.
- PBS – Tween: Tween 20 al 0.3% (v/v) en PBS.
- Solución "A" de Lowry: Na₂CO₃ 2% (p/v), NaOH 0.1 M, tartrato de sodio y potasio 2% (p/v).
- Solución "B" de Lowry: CuSO₄ 0.05% (p/v).
- Solución A de verde de Malaquita: alcohol polivinílico al 0.55% (p/v) y Verde de malaquita al 0.055% (p/v).

Solución Amortiguadora de transferencia: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10% (v/v).

Solución B de verde de Malaquita: molibdato de amonio pentahidratado al 2.5% (p/v) en HCl 4 N.

Solución C de Verde de Malaquita: partes iguales de las soluciones A y B, adicionando 4 mg de p-metilaminofenol por cada ml de solución C. Debe de prepararse en el momento.

Solución de elución total: imidazol 25 mM, SDS 1% (p/v) y pH 7.4.

Solución de elución: NaCl 140 mM, ATP 3 mM, EDTA 1 mM, imidazol 25 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM y pH 7.4.

Solución de equilibrio: Imidazol 50 mM pH 7.4.

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

Solución de PEG: PEG al 20% (v/v) con 2% (p/v) de NaCl 2 M.

Solución de prehibridación: SSC 5X, formamida 50% (v/v), SDS 0.2% (p/v), sarcosil 0.1% (p/v), reactivo de bloqueo 5% (p/v) (Boehringer 1993657-11).

Solución de unión: KCl 140 mM, EDTA 1 mM, imidazol 25 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM y pH 7.4.

Solución desnaturalizante: NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M.

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

Solución reveladora para inmunoelectrotransferencia: diaminobencidina 0.02% (p/v) y peroxido de hidrógeno 3% (v/v).

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

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

TBE 5X: Tris-borato 0.45 M, 0.01 M de EDTA.

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

VIII. RESULTADOS

8.1. BIOQUÍMICA

8.1.1. Identificación de la ATPasa Na^+/K^+

La centrifugación diferencial del homogenado total de cisticercos (HC) en la solución de sacarosa permitió obtener a 1000 xg por 10 min. una fracción membranal 1 (FM1) y una fracción soluble 1 (FS1). Asimismo, la centrifugación de la FS1 a 3000 xg por 30 min. resultó en la obtención de una segunda fracción membranal 2 (FM2) y una fracción soluble 2 (FS2). Las diferentes fracciones se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) (Fig. 1A). Se observó que el HC (carril 1) presenta un patrón muy complejo constituido por una gran cantidad de proteínas con un intervalo de masa molecular de 10 a 200 kDa; la FS1 (carril 2), presenta un menor número de proteínas con el mismo intervalo de masa molecular, mostrando un enriquecimiento en las moléculas de bajo peso molecular. La FM1 en el carril 3 muestra un enriquecimiento de 2 moléculas con masa molecular de 50 y 100 kDa, así como varias bandas de diversos pesos moleculares. La FS2 (carril 4) muestra un enriquecimiento en bandas de bajo peso molecular con tamaños similares a las del FS1. Finalmente, la FM2 en el carril 5 mostró un patrón difuso (barrido) con bandas en el intervalo de 10 a 2000 kDa. Probablemente este patrón es debido a la agregación que las proteínas sufren por la centrifugación del método utilizado. Posteriormente con dichas fracciones se realizó un ensayo de inmunoelectrotransferencia (IET) (Fig. 1B) utilizando un suero anti-ATPasas tipo P de *Neurospora crassa* (1:2000) y un suero anti- $_{18}\text{NH}_2$ -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de *T. solium* (1:500). Ambos anticuerpos reconocieron una banda de alrededor de 100 kDa en HC total, y en las fracciones FM1 y FS1 y no reconocieron ninguna banda en las otras fracciones. El suero preinmune, utilizado como control negativo no reconoció ninguna banda en las fracciones antes mencionadas. La lectina Concanavalina A (Con A) revelada con un

segundo anticuerpo anti-ConA acoplado a peroxidasa en IET, mostró que la lectina se unió a varias moléculas en el HC y la FM1, incluida la banda enriquecida de 50 kDa y no reconoció a la banda de 100 kDa (dato no mostrado).

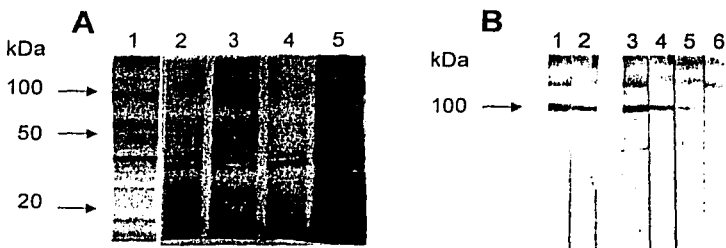


Figura 1. A. Fraccionamiento por centrifugación diferencial del homogenado de cisticercos de *T. solium*. Gel de PAGE-SDS (10% (p/v)) 1: Homogenado (HC), 2: Fracción soluble (FS1), 3: Fracción membranal (FM1), 4: FS2, 5: FM2. **B.** Inmunoelctrotransferencia. Carril: 1 y 2: HC, 3: FM1, 4: FS1, 5: FM2, 6: FS2. Antisueros: 1: anti-ATPasas tipo P de *Neurospora crassa*, 2-6: anti- $_{18}\text{NH}_2$ -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de *T. solium*.

8.1.2. Actividad enzimática e inhibición

La actividad de ATPasa se determinó por el método de verde de Malaquita, en el cual se cuantificó el fósforo inorgánico (P_i) formado por la hidrólisis de ATP. La cantidad de P_i se calibró con una curva estándar (Fig. 2), el P_i se formó a partir de la hidrólisis del KH_2PO_4 con ácido perclórico.

Como control positivo se utilizó la actividad de actina en presencia de miosina (datos no mostrados). Se midió la actividad de ATPasa en las fracciones membranales y solubles. Puesto que no se encontró actividad en

las fracciones FM2 y FS2, sólo se trabajó con las fracciones FM1 y FS1. Se utilizaron 40, 80 y 120 ng de proteína total de la fracción FM1, y 100, 200 y 400 µg de proteína total de la fracción FS1, para establecer la cantidad que sería utilizada en ensayos subsecuentes (Fig.s 3 y 4). Se determinó que se utilizarían 40 ng de la FM1 y 100 µg FS1. Estas cantidades de proteína total presentaron un mínimo de P_i en la preparación (al tiempo 0) y se observó producción apreciable de P_i .

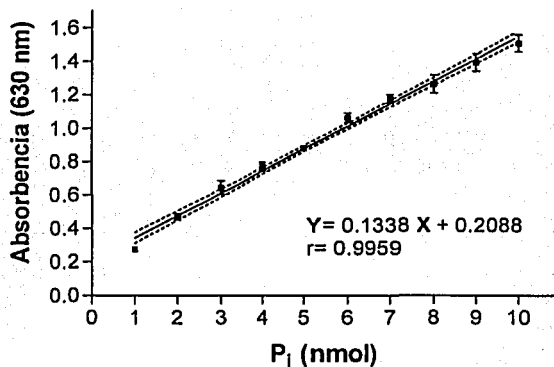


Figura 2. Curva patrón de fósforo inorgánico (P_i). Diez µl de KH_2PO_4 1 mM contienen 10 nmoles de P_i en presencia de APC. El P_i se cuantificó por el método de verde de Malaquita. $n=6$, $prom \pm DE$.

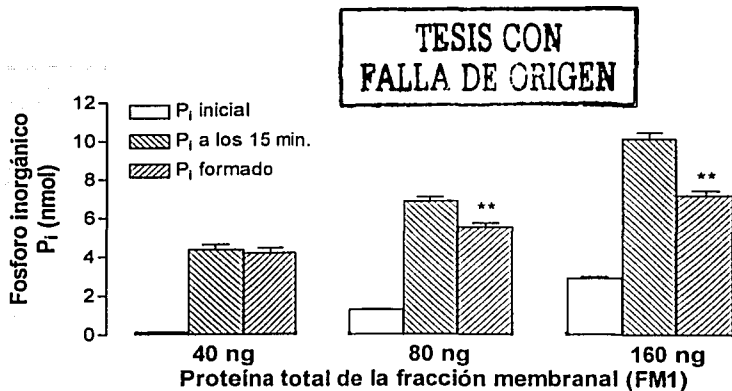


Figura 3. Cantidad de P_i generado en una fracción membranal (FM1) de cisticerco de *T. solium*. [ATP]=3 mM, n=6, prom±DE. P_i formado = P_i a los 15 min. – P_i inicial. **P<0.001 respecto al P_i formado en 40 ng.

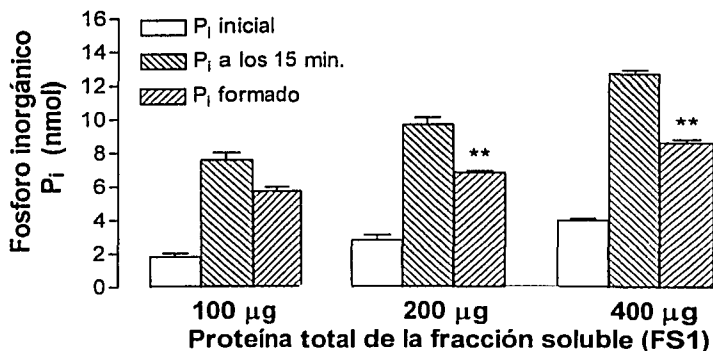


Figura 4. Cantidad de P_i generado en una fracción soluble (FS1) de cisticerco de *T. solium*. [ATP]=3 mM, n=6, prom±DE. P_i formado = P_i a los 15 min. – P_i inicial. **P<0.001 respecto al P_i formado en 100 µg.

Se siguió el curso temporal de la actividad de ATPasa en ambas fracciones para establecer el tiempo adecuado de producción de P_i (Fig. 5). Se decidió que los ensayos subsiguientes se realizarían durante 15 min.

Posteriormente se midió la actividad en presencia o ausencia de ouabaina (inhibidor específico de la ATPasa de Na^+/K^+) para determinar la actividad correspondiente a la ATPasa de Na^+/K^+ (Fig. 6). Se midió la actividad en presencia o ausencia de azida (inhibidor de las ATPasas tipo F) para descartar la actividad correspondiente a las ATPasas tipo F, que también se encuentran en las membranas (Fig. 6). La actividad de ATPasa en FM1 (Fig. 6A), disminuyó un 29% en presencia de ouabaina y 67% en presencia de azida de sodio. En la FS1 (Fig. 6B) se encontró que la actividad de ATPasa no disminuyó significativamente en presencia de ouabaina, pero disminuyó un 29% en presencia de azida de sodio.

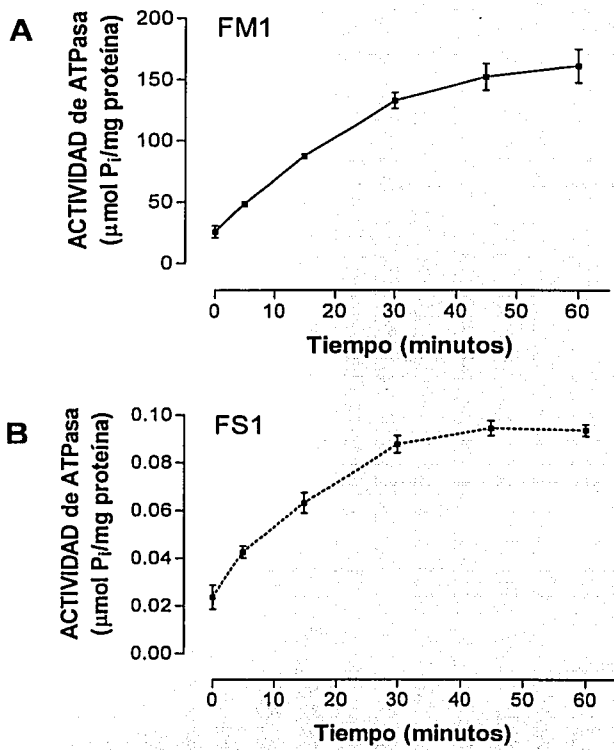


Figura 5. Curso temporal de la actividad de ATPasa en las fracciones **A:** membranal (FM1, 40 ng) y **B:** soluble (FS1, 100 μg) de cisticercos de *T. solium*. [ATP]=3 mM, n=6, prom \pm DE.

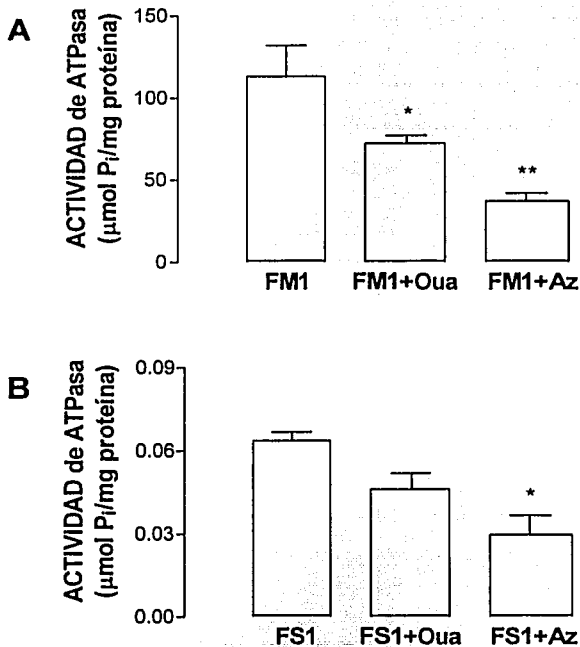


Figura 6. Actividad de ATPasa en ausencia y presencia de ouabaina 10 mM (Oua) o Azida de sodio 5 mM (Az) en **A:** fracción membranal (FM1, 40 ng) y **B:** fracción soluble (FS1, 100 μg) de *T. solium*. 15 min. de reacción. [ATP]=3 mM, n=6, prom±DE. *P<0.05, **P<0.001 vs. fracción sin inhibidor.

8.1.3. Purificación de la ATPasa de Na⁺/K⁺ por cromatografía de afinidad

Se purificó la ATPasa de Na⁺/K⁺ de cisticercos de *T. solium* mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de agarosa epóxica conjugada con ouabaina. Se empleó la fracción FM1, debido a que contenía mayor cantidad (determinada por IET) y actividad de ATPasa inhibida por ouabaina.

La FM1 y la fracción purificada por afinidad se sometieron a un gel de SDS-PAGE al 10% (p/v) y se realizó una tinción con plata. La FM1 está compuesta por varias bandas de 10-200 kDa, resaltando 2 bandas principales con masa molecular de 50 y 100 kDa. En contraste la fracción eluida de la columna presentó solamente las dos bandas de 50 y 100 kDa (Fig. 7A). Por otro lado, los sueros preparados en contra de la subunidad α de ATPasas tipo P de *N. crassa* y la región anti- $_{18}\text{NH}_2$ -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de *T. solium*, reconocieron a la banda de 100 kDa en ambas fracciones antes mencionadas (Fig. 7B). El suero preinmune de conejo, utilizado como control negativo no reconoció ninguna banda en la fracción eluida de la columna. Cabe mencionar que la fracción con ATPasa de Na^+/K^+ purificada fue ensayada para determinar su actividad de ATPasa, pero no se observó dicha actividad.



Figura 7. ATPasa de Na^+/K^+ de cisticerco de *T. solium* purificada por cromatografía de afinidad con ouabaína. **A:** Gel de PAGE-SDS (10% (p/v)). 1: Fracción membranal (FM1, 100 μM), 2: Fracción de ATPasa Na^+/K^+ purificada (10 μM). **B:** Identificación de la subunidad α en la fracción purificada. Antígenos: 1 y 3: Fracción purificada de ATPasa de Na^+/K^+ , 2: Fracción membranal (FM1). Anticuerpos: 1: Suero de conejo preinmune, 2 y 3: suero anti- $_{18}\text{NH}_2$ -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de *T. solium*.

8.1.4. Inmunolocalización de la ATPasa de Na⁺/K⁺

Puesto que disponíamos de un suero con anticuerpos específicos en contra de la región amino terminal de la subunidad α de la ATPasa Na⁺/K⁺, se utilizó para determinar su localización en el tejido del cisticerco. Los cortes de congelación de cisticercos se ensayaron por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos de este suero identificaron a la ATPasa Na⁺/K⁺ en la membrana plasmática tegumentaria, en células musculares del cisticerco y células formadoras de canales (Fig. 8). Un suero preinmune de conejo utilizado como control no detectó ninguna proteína en cortes similares del tejido del parásito.

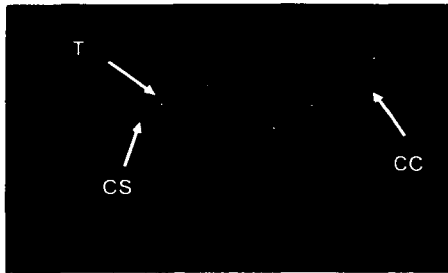


Figura 8. Inmunofluorescencia indirecta en un corte de cisticerco enfrentado a un suero anti-₁₈NH₂-terminal de la ATPasa Na⁺/K⁺ de *T. solium*. T: Tegumento, CS: células subtegumentales (musculares) y CC: células formadoras de canales.

8.2. BIOLOGÍA MOLECULAR

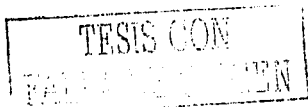
8.2.1. Producción de sonda específica

Se diseñaron dos oligonucleótidos específicos denominados ATPX1 y ATPX2 (Fig. 9A) a partir de las secuencias nucleotídicas de dos dominios altamente conservados en las ATPasas de Na^+/K^+ , el sitio de unión al ATP y el de fosforilación. Por medio de la PCR utilizando DNA complementario (obtenido a partir de RNA total) y los oligonucleótidos antes mencionados se sintetizó un fragmento, aproximadamente de 1 kb (Fig. 10). El fragmento de DNAc se purificó con perlas de vidrio, se trató con la enzima Klenow para generar extremos romos y se clonó en el vector plasmídico pUC18 digerido con la endonucleasa Sma I (genera extremos romos). Con la reacción de ligación anterior se transformaron bacterias, las cuales se crecieron, conservando y produciendo el plásmido que contiene el fragmento de interés. Posteriormente se preparó DNA del plásmido recombinante, se determinó la secuencia de nucleótidos y se dedujo la secuencia de aminoácidos (Fig. 9B). El análisis de comparación de secuencias de aminoácidos con otras ATPasas tipo P ubicadas en la base de datos de Gen Bank mostraron que la secuencia del fragmento clonado presentaba una alta identidad con ATPasas de Na^+/K^+ .

A Secuencia de los oligonucleótidos específicos:
ATPX1: ATCTGTTCCGGATAAGACCGGTACT
ATPX2: ACTGGGGATGGTGTCAACGACTCA

B Secuencia de aminoácidos del fragmento:
ICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNKIFEADTSDDDQ
STANYSRASSTWMLSRIAMLCNRAEFKPGEEET

Figura 9. A: Oligonucleótidos específicos diseñados y **B:** secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica del fragmento obtenido con los oligonucleótidos ATPX1 y ATPX2.



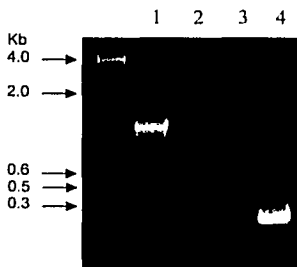


Figura 10. Gel de agarosa mostrando el fragmento de DNA amplificado de la ATPasa de Na^+/K^+ producido por PCR. 1: DNAc + oligonucleótidos ATPX1 + ATPX2, 2: DNAc + oligonucleótido ATPX1, 3: DNAc + oligonucleótido ATPX2, 4: Control positivo del estuche de secuenciación (vector M13 + oligonucleótidos M13F +R).

8.2.2. Obtención de clonas

El tamizaje primario se llevó a cabo infectando bacterias *E. coli* con fagos de la biblioteca de DNAc de cisticerco de *T. solium*, construida en el fago $\lambda\text{gt}10$. Como sonda se utilizó el fragmento de DNAc purificado que se marcó radiactivamente con ^{32}P por el método de marcaje con iniciadores al azar. Después de los tres tamizajes (primario, secundario y terciario) se obtuvieron 6 clonas positivas a la sonda, y de las cuales se preparó DNA de fago. Cabe mencionar que durante el proceso de los tamizajes se perdió la clona 1, y no fue posible recuperarla por lo que no se hablará más de ella. El DNA de los fagos se utilizó para hacer una reacción de PCR con dos iniciadores específicos que flanquean la región de clonación del fago $\lambda\text{gt}10$. Los fragmentos resultantes de la reacción anterior se corrieron en un gel de agarosa al 2% (p/v) con el objetivo de determinar el tamaño de los DNAs copia obtenidos (Fig. 11).

Por otro lado, se realizó la restricción de cada una de las 5 clonas obtenidas, utilizando diferentes endonucleasas y los fragmentos de DNAc generados por PCR con los oligonucleótidos de $\lambda\text{gt}10$. Las clonas 2 (2.7 kb), 3 (3.2 kb), 5 (3.9 kb) y 6 (3.5 kb) presentaron el mismo patrón de corte con las enzimas Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III, Pst I, Xba I y Xho I (Tabla 1). Sin embargo, la clona 4 (3.4 kb) presentó un patrón diferente de restricción, se encontraron sitios de corte para Bgl II y Hind III, un sitio de corte para Eco RI,

dos sitios para Pst I, y no presenta los 4 sitios de corte que tienen las otras clonas con Xho I (Tabla 1).

Debido a que las clonas 2, 3, 5 y 6 presentaron el mismo patrón de restricción, se escogió la clona 5 por su mayor tamaño. Este criterio se utilizó ya que en dicha clona podríamos encontrar la secuencia completa del mensajero que codificara para la ATPasa de Na^+/K^+ .

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

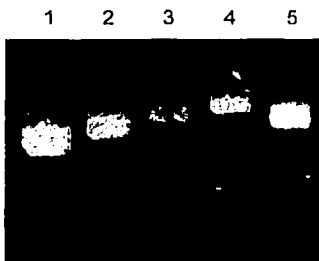


Figura 11. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X mostrando los tamaños de las clonas obtenidas del tamizaje de una biblioteca de ADNc de cisticerco de *T. solium*. 1: Clona 2 (2.7 kb), 2: Clona 3 (3.2 Kb), 3: Clona 4 (3.4 Kb), 4: Clona 5 (3.9 Kb), 5: Clona 6 (3.5 Kb).

Tabla 1. Fragmentos de restricción de las clonas obtenidas del tamizaje de una biblioteca de DNAc de cisticerco de *T. solium*.

No. de clona.	2 (2.7 Kb)	3 (3.2 Kb)	4 (3.4 Kb)	5 (3.9 Kb)	6 (3.5 Kb)
	Tamaño de fragmentos generados (Kb).				
Control	2.7	3.2	3.4	3.9	3.5
Bam HI	2.7	3.2	3.4	3.9	3.5
Bgl II	2.7	2.7,0.5	1.1,0.9,0.4	2.7,1.2	2.7,0.8
Eco RI	2.7	3.2	1.5,1.3,0.6	3.9	3.5
Hind III	2.7	3.2	1.5,1.4,0.5	3.3,0.6	2.9,0.6
Pst I	2.7	3.2	2.0,1.4	3.9	3.5
Xba I	2.7	3.2	3.4	3.9	3.5
Xho I	1.1,0.9,0.7	1.1,0.9,0.7, 0.4,0.2	3.4	1.0,0.9,0.8, 0.7,0.5	1.0,0.9,0.7, 0.5,0.4

8.2.3. Secuencias

El fragmento de PCR contenido en la clona 5, amplificada con los oligonucleótidos que flanquean al vector λ gt10, se clonó en el vector pUC18 para determinar su secuencia. Los análisis computacionales de la secuencia nucleotídica mostraron una secuencia de 3,420 nucleótidos (Fig. 12) con una región que codifica para una proteína de 1014 aminoácidos con un masa molecular deducido de 112,140 Da. La secuencia de aminoácidos (Fig. 13) presentó una identidad con otras ATPasas de Na^+/K^+ : del 66.3% con la de hidra (*Hidra vulgaris*), 71.1% con la de sapo (*Bufo marinus*), 72% con la del camarón (*Artemia franciscana*), 71.3% con la de cerdo (*Sus scrofa*), 71.5% con la isoforma $\alpha 1$, 72.3% con la $\alpha 2$ y 71% con $\alpha 3$ de humano (*Homo sapiens*). La figura 12 muestra la localización de segmentos característicos de las ATPasas de Na^+/K^+ , los 10 segmentos transmembranales (verde) y 2 grandes asas intracelulares (naranja). Además, se identificó el sitio donde se une el ATP (azul) y el sitio de fosforilación (azul subrayado). Asimismo, se identificaron los aminoácidos conservados involucrados en la unión del inhibidor ouabaina (rosa) y en la formación de puentes disulfuro (morado). El análisis de hidrofobicidad tipo Kyte & Doolittle (Fig. 14) (Kyte and Doolittle, 1982) y el análisis para la predicción de hélices transmembranales según el modelo de Hidden Markov (Tusnády and Simon, 2001), confirma la presencia de 10 dominios con alta hidrofobicidad, dos regiones con baja hidrofobicidad y la orientación del amino-terminal hacia el interior de la célula. Estas tres características están presentes en todas las subunidades α de las ATPasas tipo P.

1 TCTAGAAGTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTAAAAAGCAAAGAATTCGGCGGCCCGGTGTACGTGAGCT
 71 GTTGTGTTGGGGTAGGAATGGGTAATCAGTGGGTGACAAGTATCGTGATGCCACGGATGGGAACAAGG
 141 ATGCAAAGAAGGATCTTAATGAGCTCAAGCAGGAGCTTGCAATGGACGAACATCAGATTTCTCTGGACGA
 211 ACTCTATGCTCGCTTCTGGGACCAATCCTGATACTGGTCTCAC**CAGTGAACAGCGAAAGCACCGCT**TAGAT
 281 CGAGATGGACCTTAAGCAGCTTACCCTTCCAAAGACGCCCCAGAGTGGGTTAAGTTTGAAGAATATGT
 351 TTGGTGGCGTTTTCATGCTTTTGGGATCGGCGCGCTCTCTGTTCATCGCTCATGGTATTCTTGGT
 421 TTGGTCAGGAAACCCCTACTFATATGATAACTGTGACTCGGTATCGCTCTGGCGTGGTGTGCTGCTTAT
 491 ACGGGCTGTTTCTCGT**TACCACAGCTCCAACT**CAATCGAAGATCAGTAGGATCTTGTCAAGCTTTGGC
 561 CTCAATATGCGGTTGTAATTCGTGGAGGTCAGAGAATCGAGCTCCTCTGGAAGCTCTGTGCGTTGGTGA
 631 CATCATCGATGTTAAATTCGGTGAACCGGCTCCCGCCGACATTCGTGTCTATCAAGAGCCAGCTCTTCAAG
 701 GTGGACAACCTCGGCATTGACGGGAGAGCTCGAGCCGACCTCGAGCGGAGTACACATAATGAGAATC
 CCGTTAGAGACAAGAATCTCGCCTTCTCTCTACTAACCGCCCTGGAGGGGACATCGCCGGGCTGATGCT
 841 AGCTAACCGGTGACCGAACCGTCATGGGTCGATCAATTCACACTGGCTCGGCTCGGAGTGGGCGTCACT
 991 CCAATTCGGCGCGAGATTCGCACCTCATTCATATATACACTGGTGGGCTGTTTCTGGGGCTCACTT
 981 TCTTTATATCGGCTTTATCTCGGCTACTACTGGCTGTGTCGGCTATCTCCCTTATCGGATCATGCT
 1051 GGCCAAAGCGCGCGGGGCTTACCTAGCTACCGTGGCTGTGCTCACTCTCACAGCCAGGCTATGGCG
 1121 AGCAAGAACTGTCTGGTGAAGAATCTCGAGGCTCTCGAGACTCTTGGCTCCACTTCCAG**CACTGCTCCG**
 1191 **ATAAGACCGGTACTCTCACCAAGCCGATGACTGTCCAGCACATGGTTCGACAACAGATCTCGA**
 1261 GGCTGACACTTCCGAGACCAATCCACTGGGAATATAGCGGGCATCTCCACGTGGATGGGCCCTCTCG
 1331 CGTATCGCCATGTTATGTAACCTGCGGATTCAGCCGGGGGAGAAAGAACCTGTGCTCAAACGGG
 1401 AGTCAACGGGAGCGCTTCAGACTAGCTCGCTTAACTGCTCACTCTCACAGCCAGGCTATGGCG
 1471 GTACCAGCGGAAAGCCAGGCTGCGGMAATTCGAATCAACTCACTAATAAGACTGACGTTAGTGTG
 1541 CATCAGACCGAGATGGGATGAGGCTACCTCGTAGTCATGAAGGATGCGCCGAGCGCATCTTATG
 1611 TCTTCCACCGTCTGTATGGAGGGTCCAGAACTCCACATGGAGATCAGTGGGCTGAGAGCTTCAACAC
 1601 CCGT**TACC**CGAACTCGGTCGATTTGGGAGCGCTGTCTTGGCTCTGTGACTCTGGCTCCCTCGCGAC
 1751 AMGTTCCCTCGCGGCTTAACTTCGACATAGATGAACCTAACCTCCCTATCGAGGAATGCCCTTTGG
 1821 GTCTCATGTCAGATGATCCACTCTGTGTCGGTGGCCGATGCTCTTCCAGTGTGCATCGCCGG
 1891 TATCAAGGGTATATGTAACGGGCAEATCCTATCACGCCAAGGATTCGCAAGGGATGGGGATCGCG
 1961 ATCTCTAGCGGGAATAGACTGTAGAAGACATGGGGCGGAAGCTGGAGTCCCGTGAATCGGCAACC
 2031 CTCTGTGAGCTAGCGATGTCTCTTACGGCTCGGATCTCGTGAATGACACCTGATATGACTGATG
 2101 GATACTGAGAACACTCTGAGATTTCTTCTGCTGCTACTCACCAAGCAGAACTCATCTT**TTGGA**
 2171 GCGATCCAGCGTATGGGTGCCATTTGCTGT**TACCGGATGCTCACGACTCACTGCTTGAAGA**
 2241 AGGCTGATATCGGTTGCCATGGGATCACGGGTAGTGTATGTGATTAAGCGGACATGACATGATCCT
 2311 CTTGACGACAATTTGGCTCCATGCTCACGGGTGGAGAGGGGGCTATAATCTTGACAACCTGAG
 2381 AATTCGATCGCTATACCCTCACTCTAAGATCCCTGAGATCAGCCGCTTCTTATCTTCAATCTGGAG
 2451 ACTGGCTCTGCCCTGGGACCAATCAEAATCTGTGCATGATTTGGCGACGGACATGCTGCCGCCAT
 2521 TCTACTGGCTACGAGGGCCCAAGACATATGAAGCGCATGCCACGGACCTTTCCGCGATAAATGT
 2591 GTGACGAGCGTCTATCTCGATGGCTTACGGCTCAGATTGCGATGATCCAGGCTCGCGGGTCTCTGG
 2661 TTTACTTTGCTACTCGGACAANAACGGTTTTCGGCCAGCGGCTCATGGGCTGGGCTAACAGTGGGA
 2731 CTCCACCGCATCAAGTATTCGGCGACTCTCACGGCCAAAGTGGAGCTACACAANAAGTAAAGCGTCT
 2801 GAGTACACCTGTACACAGGCTTTTTTCGCTCCATGCTATTCTCCAGTACGGGATCTACTCATATGCA
 2871 AGACCCGAAGAATCTATCTATCAGCAGGCGATGTGAAACCCACCACTCACTTTTGGCTCTCTCTCGA
 3941 GACTACACGGCCATCTCTCTCTACTGCTCGGCTCTTGAGCAGCGCTTGAGAATGATGCTCCTCGA
 3011 TGCCACTGGTGGTTGCCGGTTTGGCCCTTGGGCTGGTCAATCTTCAATTTTCGATGAGTGGGAAGAAT
 3081 TCTTTCGAACCTCCTCCCGGCCAATTTGGGTGAGCAGGAGACTAACTATTAATAGTATGCTGCGATCGA
 3151 CAATAAACAATAACAAATCCCACTTCCGTCCTCCACTCTCTCCCTGCTCTTACCACTCCCTCCG
 3221 TTAGTGTCTCACTCTTCCAAAGCAAATTAATAATGCTTATGATGTAGCTTCCAAACAATGATGAT
 3291 TTGAAATTCGAAGCGGAAATTCGACAGATATCCATCACTGCGGGCGCTCGAGCATGATCTAGAGG
 3361 CCCAATTCGGC

Figura 12. Secuencia nucleotídica de la clona 5 correspondiente a un DNAC que codifica para la subunidad α de una ATPasa Na^+/K^+ de *T. solium*. Subrayadas se muestran las secuencias utilizadas para el diseño de oligonucleótidos utilizados para secuenciar y en negritas se muestra las secuencias que coinciden con los oligonucleótidos de ATPX-1 y ATPX-2, respectivamente.



MGKSRGDKYRDATDGKKDAKKDLNELKQELAMDEHQISLDELYAR	1
LGTNPDTGLTSEQAKTRLDRDGNALTPPKTTPPEWVKFCKNM	46
FMHIAHIVIC H PCWCAGEPLYDN	91
QESKSSKYMESFAKLVPQYAVVIRGGQRIDAPAEALVVG	135
DIIDVKEFGDRVPADIRVFKASSFKVDHSALTGESEPOQTRTAEYTN	181
ENPLETKNLFAFFSTNAVEGTCRQVVVATGDRVTMGRITANLASGLE	226
MGATPIAREIAHFH	271
	YYWLDVA
	316
TAKRMAKNCILVKNLEAVETLG	316
STST ICSDKT GTTLTQHRMTVAHMWFDNKIFEADTSEDDQSTANYSR	361
ASSTWMALEIRIAMLNRAEFKPGEEITDVLKRECNQDADESALLK	406
CVGLGIGGVTGYETEKPKVAEIPENITPKYQVSVHQTDDGDERYL	451
VVMKGAPERILLRCSSTVIMEGQELHMDQWRESFNHAYLELGGIG	496
ERVLGFCLELRPADEFPRGEKEDI DEPNETEGMPEVGLMMDIDP	541
PRAAVPDVAVSKCRSAGIKVVMVTGDHITAKALAKGVGISTDGMK	586
TVEDI AAEKRGVPTVQVHPREASACVYHGESELRIMTTPAQYDEILEH	631
HSEIVEARTSPQOKLIVEGIQEMGAVAVTGDGVDNSPALEKAD	676
IGVAMGTPGSDVSKQAADMLLDDIFASIVTQVEEGRIIFEDNLKK	721
S	766
	DVPLPLGT
	811
EAEEDIMKRMPRDPFRDKLVNERL	811
	856
	ENGFWPSRLLGLRKQWDSPAINDVADSYQEWYTYQ
RKRLEY	901
	KTRKNSIYQQGMWNHH
	946
	EHGLRMM
DEVRRKKFLRTLPPGNWVERETNY	991

Figura 13. Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de la clona 5 correspondiente a un DNac que codifica para la subunidad α de una ATPasa Na^+/K^+ de *T. solium*. Verde: región transmembranal, Naranja: Asas intracelulares, Cursivas: asas extracelulares, Azul subrayado: Sitio de fosforilación, Azul: Sitio de unión a ATP, Rosa: aminoácidos de unión a ouabaina, Morado: cisteínas que forman puentes disulfuro.

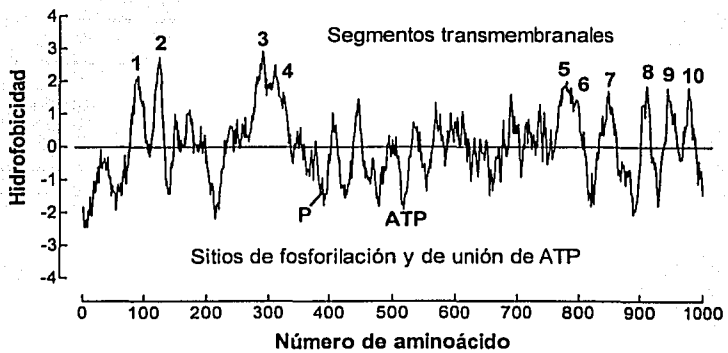


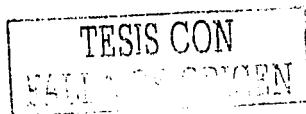
Figura 14. Análisis de Kyte y Doolittle de la secuencia de aminoácidos de la clona 5 correspondiente a un DNAc que codifica para la subunidad α de una ATPasa Na^+/K^+ de *T. solium*. Los números muestran los segmentos transmembranales; P: sitio de fosforilación; ATP: sitio de unión al ATP.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. DISCUSIÓN

Los portadores de *Taenia* adulto (teniásicos) raramente tienen conocimiento de serlo debido a que esta parasitosis cursa asintóticamente y el portador no presenta afecciones serias. El principal problema radica en que los teniásicos liberan los proglótidos en sus heces. En dichos proglótidos se encuentran huevos que pueden infectar a cerdos y humanos. La cisticercosis es la enfermedad más grave que ocasiona *T. solium*, puesto que puede generar problemas neurológicos e inclusive la muerte; de ahí la importancia de su estudio. Simples medidas de higiene como son la dotación de drenajes, agua potable, mejorar la crianza rústica de los cerdos, mejoramiento de la educación sanitaria, como evitar la defecación al aire libre, lavarse las manos antes de ingerir alimentos, no ingerir carne de cerdo infectada con cisticercos y cocinarla bien, así como lavar y desinfectar los vegetales (Espejo, 1977), además de la enseñanza para identificar y tratar la teniasis, disminuirían la incidencia de la cisticercosis. Las campañas de educación y desarrollo de infraestructura sanitaria no han surtido efecto en los países subdesarrollados, debido a su pobreza. También la pobreza no ha permitido que se dé a la población recursos para su higiene como agua potable, drenaje y educación, por lo que es necesario encontrar otros medios por los cuales la incidencia de cisticercosis y teniasis disminuyan.

Dos estrategias que se han estado impulsando para disminuir la incidencia de estas enfermedades consisten en: desarrollar una vacuna para prevenir la cisticercosis porcina o crear fármacos específicos para administrarlos a cerdos o a humanos. La primera estrategia ha conducido a la caracterización de diversas moléculas con diferentes funciones en el sistema de la *T. solium*, y a pesar de los buenos resultados hasta la fecha no existe una vacuna comercial disponible para su aplicación en contra de *T. solium* (Flisser and Lightowers, 2001). La segunda estrategia se ha basado en la identificación de moléculas esenciales para la vida de los parásitos con la idea de generar nuevos



fármacos que sólo afecten al parásito y no a su hospedero (Castellanos-Gonzalez *et al*, 2002).

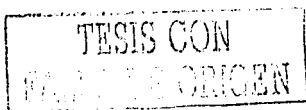
La ATPasa de Na^+/K^+ es una molécula que es interesante estudiar y tal vez utilizar en un futuro para crear una vacuna o diseñar fármacos en su contra, puesto que es una molécula esencial para la vida de los organismos. Por otro lado, una de las características de los céstodos, incluyendo a la *T. solium*, es que no presentan sistema digestivo, por lo cual tienen que tomar su alimento a través de su membrana basal. Esta característica hace muy importante la presencia y función de la ATPasa de Na^+/K^+ , enzima que proporciona gradientes de potasio y sodio que son utilizados para introducir moléculas como la glucosa y diversos aminoácidos, y que además mantiene el potencial eléctrico de la célula.

En 1978 se detectó actividad de ATPasa en la superficie del cisticerco de *T. solium* (Sosa, 1978). No se determinó a qué tipo de ATPasa pertenecía esta actividad, pero debido a su localización en la superficie tegumentaria podemos suponer que eran ATPasas tipo P de las membranas plasmáticas y de algunos organelos. La ATPasa de Na^+/K^+ es la única del tipo P compuesta por dos subunidades (α y β), siendo la α la subunidad más conservada a través de las especies.

Aprovechando la gran homología que tienen los dominios importantes para la función de estas ATPasas tipo P, se utilizaron anticuerpos heterólogos desarrollados contra la ATPasa de tipo P de *N. crassa* para identificar ATPasas de este tipo en *T. solium*. Estos anticuerpos reconocieron a una banda de aproximadamente 100 kDa, lo que nos sugirió la presencia de este tipo de ATPasas. Además, estudios de IET en donde se utilizó el antisuero específico contra la región NH_2 -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ nos indicaron su presencia. Estos resultados nos alentaron para obtener una fracción pura de la bomba de Na^+ a partir del cisticerco de *T.*

solium, para lo cual utilizamos un método muy utilizado para purificar proteínas de membrana. Este método se basa en la centrifugación diferencial de un homogenado total del organismo. Con la primera centrifugación a baja velocidad obtuvimos una fracción rica en proteínas membranales de gran tamaño que denominamos FM1, contrastando con una fracción soluble, denominada FS1, que contenía proteínas más pequeñas. Una segunda centrifugación nos permitió obtener una fracción posiblemente membranal con proteínas de tamaño similar a los observados en FS1 y una fracción soluble, denominadas FM2 y FS2 respectivamente. Los ensayos de IET en esta fracción utilizando el antisuero anti- $_{18}\text{NH}_2$ -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ y los ensayos de actividad enzimática específicos para la ATPasa de Na^+/K^+ nos permitieron conocer que la FM1 contenía la mayor cantidad y actividad de esta enzima, comparado con la fracción FS1. La actividad de ATPasa en FM1 correspondió en un 29% a la ATPasa de Na^+/K^+ (actividad de ATPasa inhibida con ouabaína) y un 67% correspondió a las ATPasas tipo F (actividad de ATPasa inhibida con azida de sodio). En contraste en la FS1 la actividad presente no disminuyó significativamente en presencia de ouabaína (aunque también se identificó la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ por IET). Este resultado muestra que logramos obtener una fracción enriquecida en ATPasa de Na^+/K^+ (FM1), la cual se obtuvo a baja velocidad de centrifugación. Esto puede deberse a que este parásito posee un tegumento sincicial formado por una membrana plasmática que rodea al cisticerco, y en el citoplasma de las células subtegumentales contienen vacuolas de varios tamaños y organelos (Ramírez-Bon *et al.*, 1982). Lo que ayuda a que esta estructura pueda disgregarse fácilmente permitiendo obtener una fracción rica en membranas en el primer precipitado (FM1).

La adición de azida de sodio a la fracción FS1 disminuye la actividad de forma significativa en un 29%, lo que sugiere la presencia de ATPasas tipo F, pero en menor cantidad que en la fracción FM1. El 55% de la actividad de ATPasa presente en la FS1 no tenemos evidencia para adjudicársela a algún

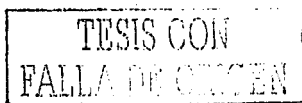


tipo de ATPasa. Esta actividad podría deberse a diversas enzimas con la capacidad de hidrolizar el ATP incluyendo a las ATPasas tipo V.

Posteriormente buscamos el obtener una fracción con mayor pureza que la que teníamos en la fracción FM1, para lo cual construimos una columna de agarosa a la que se le acopló ouabaina, un inhibidor específico de la ATPasa de Na^+/K^+ . Con esta columna logramos obtener una fracción con alta pureza y visualizar con una tinción de coomassie la presencia de 2 proteínas predominantes (100 y 50 KDa). El ensayo de IET utilizando los antisueros específicos contra la subunidad α de la ATPasas tipo P y de Na^+/K^+ reconocieron sólo a la proteína de 100 kDa. Estos resultados podrían sugerir que la proteína de 50 KDa es la subunidad β , lo que indica que hemos aislado a la enzima completa. Lamentablemente, esta fracción no presentó actividad de ATPasa, probablemente debido a una pérdida de la estructura terciaria de la enzima producida durante el proceso de purificación. Es sabido que esta enzima requiere estar embebida en una membrana para que pueda adoptar una conformación adecuada.

El estudio de inmunolocalización utilizando el anticuerpo anti- $_{18}\text{NH}_2$ -terminal de la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ permitió localizar a la enzima en la membrana plasmática tegumentaria, en células musculares y células formadoras de canales en el cisticerco. Este ensayo muestra que es una enzima que se encuentra en diversos tipos celulares y por tanto es probable que su papel fisiológico sea igual de importante que en otros organismos.

Una vez confirmada la presencia de la ATPasa de Na^+/K^+ en *T. solium*, se aisló un DNAC que codifica para la subunidad α de esta enzima. Para esto se sintetizó una sonda a partir de dos oligonucleótidos específicos, los cuales se diseñaron basándonos en los dominios de fosforilación y de unión al ATP que son muy conservados en estas enzimas de varias especies. Con los tamizajes



utilizando la sonda específica para la ATPasa de Na^+/K^+ se obtuvieron 5 clonas de diferentes tamaños. Los análisis de restricción sugieren que cuatro clonas son semejantes (clonas 2, 3, 5 y 6) y una es diferente (clona 4). Esto sugiere que podrían existir más de una isoforma de esta subunidad α , lo cual no es sorprendente, ya que se ha observado que otras especies tienen hasta 4 isoformas diferentes (Shamja and Lingrel, 1994). Sin embargo falta por comprobar esta hipótesis. Debido a que los análisis de restricción mostraron que 4 clonas eran semejantes, se decidió secuenciar sólo la clona 5, que era la de mayor tamaño. La secuencia nucleotídica obtenida fue de 3371 nucleótidos, contiene la región codificante completa para la ATPasa de Na^+/K^+ . Cabe mencionar que no se encontró en el DNAc aislado ninguna secuencia de poliadenilación. Los análisis computacionales de la secuencia de aminoácidos deducida muestran que la clona 5 codifica para un péptido de 1,014 aminoácidos, este tamaño es característico de la isoforma 3 de humano y rata, pero presenta mayor identidad con la isoforma 2 de humano (71.5% con $\alpha 1$, 72.2% con $\alpha 2$ y 71% con $\alpha 3$). Otros análisis mostraron que la proteína presenta los 10 dominios transmembranales y dos grandes asas, además de aminoácidos importantes en la función de ATPasa de Na^+/K^+ , como los sitios de captación de cationes, unión a ATP, fosforilación y de unión al inhibidor ouabaína. Lo que sugiere que la secuencia obtenida es la de un RNA mensajero que codifica para una ATPasa de Na^+/K^+ .

Por otra parte las porciones de la proteína que presentan menor identidad son las asas extracelulares. Esta particularidad puede ser utilizada para diseñar fármacos específicos que inhiban la actividad de esta ATPasa del parásito y no tenga efecto sobre la del huésped. También podrían ser utilizados para inmunizar cerdos, evitando que el cisticerco sea viable y por tanto incapaz de establecerse, con lo cual se rompería el ciclo de vida del parásito.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

La caracterización bioquímica realizada permitió conocer parcialmente las características de la ATPasa de Na^+/K^+ de la *T. solium*. Sin embargo no podemos afirmar que la actividad sensible a ouabaina corresponda a la proteína que codifica el DNAc obtenido, debido a que cabe la posibilidad de que este parásito tenga mas de una isoforma, por lo que de ser así, la actividad observada corresponde a la suma de la actividad de las isoformas presentes.

X. CONCLUSIÓN

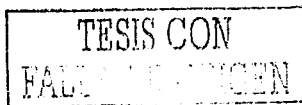
Se demostró la presencia de la ATPasa de Na^+/K^+ en el cisticerco de *T. solium* mediante: IET, actividad de ATPasa inhibida por ouabaina y la obtención de un DNAc que codifica para la subunidad α .

XI. PERSPECTIVAS

Es importante la caracterización de moléculas con importancia fisiológica para el parásito, como es el caso de la ATPasa Na^+/K^+ , porque hace posible diseñar diversas estrategias para romper el ciclo de vida de *T. solium*. Estas estrategias podrían ser: 1) diseño de fármacos específicos que inhiban la función de la enzima, 2) diseño de péptidos específicos de las subunidades α y β de la ATPasa de Na^+/K^+ que se podrían utilizar para desarrollar una vacuna para cerdos. Buscando con estas estrategias destruir a los parásitos evitando que continúen su ciclo de vida.

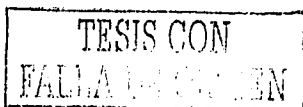
Es importante obtener el DNAc que codifica para la subunidad β , debido a que esta subunidad es la menos conservada a través de las especies y por tanto es un buen blanco para disminuir la actividad de la enzima, utilizando alguna de las estrategias antes mencionadas.

Las herramientas generadas en este proyecto: el desarrollo de un método de purificación de la enzima, la generación de anticuerpos específicos y la obtención del DNAc que codifica para la subunidad α , contribuirán a la mejor caracterización de esta enzima. Ya que, una de sus limitaciones es requerir de la membrana para obtener una estructura funcional. El disponer de una enzima pura o de los DNAc de las subunidades α permitirá obtener una enzima funcional al incorporarla en liposomas o bien expresarla en células eucariontes para su caracterización enzimática.

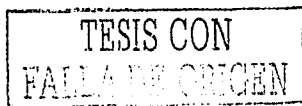


XII. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann U., and Geering K. 1992. $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits can associate with presynthesized α subunits of *Xenopus* oocytes Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 267: 12911-12915.
- 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 *Taenia solium*. México: Fondo de Cultura Económica. 115p.
- Arystarkhova E., and Sweadner K.J. 1997. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase $\beta 3$ subunit. The presence of $\beta 3$ in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 22405-22408.
- Arystarkhova E., Gibbons D.L., and Sweadner K.J. 1995. Topology of the Na,K-ATPase. Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating. *J. Biol. Chem.* 270: 8785-8796.
- Beggah A.T., Jaunin P., and Geering K. 1997. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the β subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 10318-10326.
- Beguín P., Wang X., Firsov D., Puoti A., Claeys D., Horisberger J.D., and Geering K. 1997. The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16: 4250-4260.
- Berman J.D., Beaver P.C., Cheever A.W., and Quindlen E.A. 1981. Cysticercus of 60-milliliter volume in human brain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 616-619.
- Berrobi-Bertrand I., and Maixent J.M. 1994. Immunodetection and enzymatic characterization of the $\alpha 3$ isoform of Na,K-ATPase in dog heart. *FEBS Lett.* 348:55-60.
- Besirli C.G., Gong T.W., and Lomax M.I. 1997. Novel $\beta 3$ isoform of the Na,K-ATPase β subunit from mouse retina. *Biochem. Biophys. Acta* 1350: 21-26.

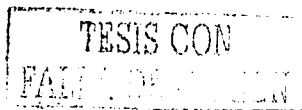


- Blanco G., DeTomaso A.W., Koster J., Xie Z.J., and Mercer R.W. 1994. The α -subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit. *J. Biol. Chem.* 269: 23420-23425. a
- Blanco G., Koster J.C., and Mercer R.W. 1994. The α subunit of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8542-8546. b
- Blanco G., Koster J.C., Sanchez G., and Mercer R.W. 1995. Kinetic properties of the $\alpha 2\beta 2$ isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 34: 319-325. a
- Blanco G., Sanchez G., and Mercer R.W. 1995. Comparison of the enzymatic properties of the Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 3\beta 2$ isozymes. *Biochemistry* 34: 9897-9903. b
- Blanco G., Xie Z.J., and Mercer R.W. 1993. Functional expression of the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ isoforms of the Na,K-ATPase in baculovirus-infected insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1824-1828.
- Blanco G., Xie Z.J., and Mercer R.W. 1994. Functional expression of Na,K-ATPase α and β isoforms. In: *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, Hormonal Control and Its Role in Disease*, edited by Bamberg E. and Schoner W.. Darmstadt, Germany: Steinkopff. 82-85. c
- Blaustein M.P. 1993. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol.* 264: C1367-C1387.
- Book C.B., Wilson R.P., and Ng Y.C. 1994. Cardiac hypertrophy in the ferret increases expression of the Na,K-ATPase alpha 1 but not alpha 3-isoform. *Am. J. Physiol.* 266: H1227-H1227.
- Brines M.L., and Robbins R.J. 1993. Cell-type specific expression of Na⁺,K⁺-ATPase catalytic subunits in cultured neurons and glia: evidence for polarized distribution in neurons. *Brain Res.* 631: 1-11.
- Cameron R., Klein L., Shyjan A.W., Rakic P., and Levenson R. 1994. Neurons and astroglia express distinct subsets of Na,K-ATPase α and β subunits. *Mol. Brain Res.* 21: 333-343.



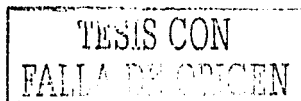
- Cañedo L., Laclette J.P., and Morales E. 1982. Evagination of the metacystode of *Taenia solium*, In Flisser A., Willms K., Laclette J.P., Larralde C., Ridaura C., and Beltran F. (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press. 363-373.
- Canfield V.A., and Levenson R. 1993. Transmembrane organization of the Na,K-ATPase determined by epitope addition. *Biochem.* 32: 13782-13786.
- Castellanos-Gonzalez A., Jiménez L., and Landa A. 2002. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* 32: 1175-1182.
- Charlemerne D., and Swynghedauw B. 1995. Myocardial phenotypic changes in Na, K-ATPase in left ventriculus hypertrophy: pharmacological consequences. *Eur. Heart J.* 16: 20-23.
- Charlemerne D., Orlowski J., Oliviero P., Rannou F., Sainte-Beuve C., Swynghedauw B., and Lane L.K. 1994. Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. *J. Biol. Chem.* 269: 1541-1547.
- Chow D.C., and Forte J.G. 1995. Functional significance of the β subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J. Exp. Biol.* 198: 1-17.
- Craig A., and Faust E.C. 1970. *Foundation of Parasitology. Clinical Parasitology.* Philadelphia. Lea & Febiger. 529-535.
- De Mendoza R.L., Beck E., Rumjanek F.D., and Goffeau A. 1995. Cloning of SMA1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72: 129-139.
- DeTomaso A.W., Xie Z.J., Liu G., and Mercer R.W. 1993. Expression, targeting, and assembly of functional Na,K-ATPase polypeptides in baculovirus-infected insect cells. *J. Biol. Chem.* 268: 1470-1478.
- Eakle K.A., Kabalin M.A., Wang S.G., and Farley R.A. 1994. The influence of β subunit structure on the stability of Na⁺/K⁺-ATPase complexes and interaction with K⁺. *J. Biol. Chem.* 269: 6550-6557.
- Eakle K.A., Lyu R.M., and Farley R.A. 1995. The influence of β subunit structure on the interaction of Na⁺/K⁺-ATPase complexes with Na⁺. *A*

- chimeric β subunit reduces the Na^+ dependence of phosphoenzyme formation from ATP. *J. Biol. Chem.* 270: 13937-13947.
- Escobar A. 1983. The pathology of neurocysticercosis, In Palacios E., Rodriguez-Carbajal J., Taveras J.M. (eds): *Cysticercosis of the central nervous system, III.* USA: Thomas Springfield Ill. 27-54.
- Escobar A., and Nieto D. 1972. Parasitic diseases, In *Pathology of the nervous system.* Minckler J (ed). New York MC Graw-Hill. 3: 2507-2515.
- Esmann M., and Skou J.C. 1985. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 857-863.
- Espejo H. 1977. Tratamiento de infecciones por *H. nana*, *T. saginata*, *T. solium* y *D. pacificum* con prazicuantel. *Bol. Chileno Parasitol.* 32: 39-40.
- Ewart H.S., and Klip A. 1995. Hormonal regulation of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* 269: C295-C311.
- Fambrough D.M. 1988. The sodium pump becomes a family. *Trends Neurosci.* 11: 325-328.
- Fambrough D.M., and Bayne E.K. 1983. Multiple forms of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in the chicken. Selective detection of the major nerve, skeletal muscle, and kidney form by a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 258: 3926-3935.
- Fink D., Knapp P.E., and Mata M. 1996. Differential expression of Na,K-ATPase isoforms in oligodendrocytes and astrocytes. *Dev. Neurosci.* 18: 319-326.
- Flisser A. 1988. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol. Today* 4: 131-137.
- Flisser A., and Lightowlers M.W. 2001. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis, *Mem Oswaldo Cruz* 96: 353-360.
- Forbush B., Kaplan J.H. III, and Hoffman J.F. 1978. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabaina: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase . *Biochemistry* 17: 3667-3676.
- Gerbi A., Debray M., Maixent J.M., Chanez C., and Bourre J.M. 1993. Heterogeneous Na^+ sensitivity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ isoenzymes in whole brain membranes. *J. Neurochem.* 60: 246-252.



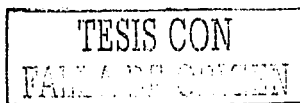
- Ghosh S., Freitag A.C., Martin-Vassallo P., and Coca-Prados M. 1990. Cellular distribution and differential gene expression of the three alpha subunit isoforms of the Na,K-ATPase in the ocular ciliary epithelium. *J. Biol. Chem.* 265: 2935-2940.
- Gloor S., Antonicek H., Sweadner K.J., Pagliusi S., Frank R., Moos M., and Schachner. 1990. The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the β subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 110: 165-174.
- Glynn I.M. 1985. Oligomycin. In the enzymes of Biological Membranes (Martonosi, A. N. ed.) Plenum Press, New York, 3: 28-114.
- Glynn I.M. 1991. The Na,K-transporting adenosine triphosphatase. In: The Enzymes of Biological Membranes (2nd ed), edited by A. Martonosi New York: Plenum. 3: 35-114.
- Glynn I.M. 1993. All hands to the sodium pump. *J. Physiol. (Lond.)* 462: 1-30.
- Gómez-Leal A. 1989. Cisticercosis del globo ocular y sus anexos, En Flisser A., Malagón F. (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, México: Limusa Noriega. 129-139.
- Good P.J., Richter K., and Dawid P. 1990. A nervous system-specific isotype of the β subunit of Na⁺,K⁺-ATPase expressed during early development of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9088-9092.
- Green N. M., 1992 In ion-motive ATPases: Structure, function and regulation (Scarpa A., Carafoli E., Ppa S., eds) Academy of Sciences, NY. 104.
- Grzanna R. 1982. Light microscopic immunocytochemistry with fixed, unembedded tissues. In Thechniques in immunocytochemistry, G.R. Bollock and Petrusz P. (Eds.). Academic Press, London, UK 183-200.
- Hammerberg B., Dangler C., and Williams J. 1980. *Taenia taeniaeformis*: Chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. *J. Parasitol.* 66: 569-576.
- Hansen O. 1992. Heterogeneity of Na,K-ATPase from kidney. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 607: 229-234.

- Hara Y., Urayama O., Kawakami K., Nojima H., Nagamune H., Kojima T., Ohta T., Nagano K., and Nakao M. 1988. The third type of α subunit of Na,K-ATPase. *Prog. Clin. Biol. Res.* 268: 73-78.
- Harashima H., Suriyama Y., Sawada Y., Shigenobu K., Kasuya Y., Iga T., and Hanano M. 1988. Kinetic analysis of the positive inotropic action (PIA) of ouabain in isolated perfused rabbit heart. Slow onset of PIA and slow binding to Na, K adenosine triphosphatase. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11: 533-540.
- Hardwicke P.M., and Freytag J.W. 1981. A proteolipid associated with Na,K-ATPase is not essential for Apase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 250-257.
- Hauger R., Luu H.M.D., Goodwin F.K., and Paul S.M. 1985. Characterization of [3H]ouabain binding sites in human brain, platelet and erythrocyte. *J. Neurochem.* 44: 1704-1708.
- Haynes W.D., 1970. *Taenia crassiceps*: uptake of basic and aromatic amino acids by larvae. *Exp. Parasitol.* 27: 256-264.
- Hieber V., Siegel G.J., Fink D.J., Beatty M.W., and Mata M. 1991. Differential distribution of (Na,K)-ATPase alpha isoforms in the central nervous system. *Cell Mol. Neurobiol.* 11: 253-262.
- Hightower K.E., and McCarty R.E. 1996. Structural stability of chloroplast coupling factor 1 as determined by differential scanning calorimetry and cold inactivation. *Biochemistry* 35: 4852-4857.
- Hundal H.S., Marette A., Mitsumoto Y., Ramlal T, Blostein R., and Klip A. 1992. Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na,K-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 267: 5040-5043.
- Hustead S.T., and Williams J.F. 1977. Permeability studies on taenia metacestodes: I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaeformis*, *T. crassiceps*, and *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63: 314-321.



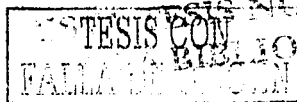
- Jaisser F., Horisberger J.D., and Rossler B.C. 1992. The β subunit modulates potassium activation of the Na-K pump. *Ann. NY Acad. Sci.* 671: 113-119.
- Jensen J. 1992. Heterogeneity of pig kidney Na,K-ATPase as indicated by ADP- and ouabain-binding stoichiometry. *Biochem. Biophys. Acta.* 1110: 81-87.
- Jones D.H., Davies T.C., and Kidder G.M. 1997. Embryonic expression of the putative γ subunit of the sodium pump is required for acquisition of fluid transport capacity during mouse blastocyst development. *J. Cell Biol.* 139: 1545-1552.
- Jorgensen P.L. 1990. Structure and molecular mechanisms of the Na,K-pump. In: *Monovalent Cations In Biological System*. Boca Raton, FL: CRC 117-154.
- Joshua G.W.P., Harrison L.J.S., and Sewell M.M.H. 1989. Developmental changes in Proteins and glycoproteins revealed by direct ratio-iodination of viable *Taenia saginata* larvae. *Parasitol.* 99: 265-274.
- Jung R.C., Rodriguez M.A., Beaver P.C., Schenthal J.E., and Levy R.M. 1981. Racemose cysticercus in human brain. A case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 620-624.
- Kolansky D.M., Brines M.L., Gilmore-Hebert M., and Benz E.J. Jr. 1992. The A2 isoform of rat Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase is active and exhibits high ouabain affinity when expressed in transfected fibroblasts. *FEBS Lett.* 303: 147-153.
- Kyte J., and Doolittle R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Laclette J.P., Ornelas Y., Merchant M.T., and Willms K. 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs, In Flisser A., Willms K., Laclette J.P., Larralde C., Ridaura C. and Beltran F. (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press. 375-387.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lamsam S., and MacManus D.P. 1990. Molecular characterization of the surface and cysti fluid components of *Taenia crassiceps*. Parasitol. 101: 115-125.
- Landa A., Merchant M.T., Wilms K., and Lacleite J.P. 1994. Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (cestoda) cysticerci. J. Parasitol. 24: 265-269.
- Larralde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez C., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., y Sepulveda J. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Revista Salud Pública de México. 34: 197-210.
- Lavoie L., Levenson R., Martin-Vasallo P., and Klip A. 1997. The molar ratios of α and β subunits of the Na⁺-K⁺-ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. Biochemistry 36: 7726-7732.
- Lemas M.V., and Fambrough D.M. 1993. Sequence analysis of DNA encoding an avian Na⁺,K⁺-ATPase β 2-subunit. Biochem. Biophys. Acta 1149: 339-342.
- Lemas M.V., Yu H.Y., Tekeyasu K., Kone B., and Fambrough D.M. 1994. Assembly of Na,K-ATPase α subunit isoforms with Na,K-ATPase β subunit isoforms and H,K-ATPase β 3subunit. J. Biol. Chem. 269: 18651-18655.
- Letonja T., and Hammerberg B. 1983. Third component of complement immunoglobulin deposition and leucocyte attachment related to surface sulfate on larval *Taenia taeniaeformis*. J. Parasitol. 69: 637-644.
- Levenson R. 1994. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 123: 1-45.
- Lingrel J.B. 1992. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. J. Bioenerg. Biomembr. 24: 263-270.
- Lingrel J.B., and Kuntzweiler T. 1994. Na⁺, K⁺ - ATPase. J. Biol. Chem. 269: 19659-19662.
- Lingrel J.B., Orlowsky J., Shull M.M., and Price E.M. 1990. Molecular genetic of Na,K-ATPase. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 38: 37-89.

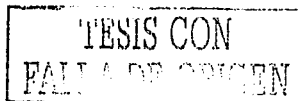


- Lingrel J.B., Van Huysse J., O'Brien W., Jewell-Motz, and Schultheis. 1994. Na,K-ATPase: structure-function studies. *Renal Physiol. Biochem.* 17: 198-200.
- Lowndes J.M., Hokin-Neaverson M., and Ruoho A.E. 1984. Photoaffinity labeling of (Na⁺K⁺)-ATPase with [¹²⁵I]iodoazidocymarin. *J. Biol. Chem.* 259: 10533-10538.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucchesi P.A., and Sweadner K.J. 1991. Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity. *J. Biol. Chem.* 266: 9327-9331.
- Lucking K., Nielsen J.M., Pedersen P.A., and Jorgensen P.L. 1996. Na-K-ATPase isoform (α_3 , α_2 , α_1) abundance in rat kidney estimated by competitive RT-PCR and ouabain binding. *Am. J. Physiol.* 271: F253-F260.
- Lumsden R. 1975. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp. Parasitol.* 37: 267-339.
- Lumsden R.D., Voge M., and Sogandares-Bernal F. 1982. The metacystode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host, In Flisser A., Willms K., Lacleste J.P, Larralde C., Ridaura C., and Beltran F. (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press. 307-361.
- Lutsenko S., and Kaplan J.H. 1993. An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry* 32: 6737-6743.
- Lutsenko S., and Kaplan J.H. 1995. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* 34: 15607-15613.
- Lytton J., Lin J.C., and Guidotti G. 1985. Identification of two molecular forms of (Na⁺,K⁺)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 1177-1184.

- Madsen K.L., Meddings J.B., and Fedorak R.N. 1992. Basolateral membrane lipid dynamics alter Na-K ATPase activity in rabbit small intestine. *Can. J. Pharmacol.* 70: 1483-1490.
- Mahajan R.C. 1982. Geographical distribution of human cysticercosis, In Flisser A., Willms K., Laclette J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F., eds. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. New York: Academic Press, 39-48.
- Malik N., Canfield V.A., Beckers M.C., Gros P., and Levenson R. 1996. Identification of the mammalian Na,K-ATPase β 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 22754-22758.
- Marks M.J., and Seeds N.W. 1978. A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci.* 23: 2735-2744.
- Martin-Vasallo P., Dackowski W., Emanuel J.R., and Levenson R. 1989. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264: 4613-4618.
- McDonough A.A., Geering K., and Farley R.A. 1990. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.* 4: 1598-1605.
- McGrail K.M., Phillips J.M., and Sweadner K.J. 1991. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* 11: 381-391.
- Medford R.M., Hyman R., Ahmad M, Allen J.C., Pressley T.A., Allen P.D., and Nadal-Ginard B. 1991. Vascular smooth muscle expresses a truncated Na⁺, K⁺-ATPase α 1 subunit isoform. *J. Biol. Chem.* 266: 18308-18312.
- Medina M.T., Rosas E., Rubio-Donnadieu F., and Sotelo J. 1990. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch. Inter. Med.* 150: 325-327.
- Mercer R.W. 1993. Structure of the Na,K-ATPase. *Int. Rev. Cytol.* 137: 139-168.

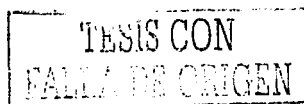


- Mercer R.W., Biemesderfer D., Bliss D.P., Collins J.H., and Forbush B. 1993. Molecular cloning and immunological characterization of the γ -polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 121: 579-586.
- Miller C.L., Day T.A., Bennett J.L., and Pax R.A., 1996. Schistosoma mansoni: L-glutamate-induced contractions in isolated muscle fibers evidence for a glutamate transporter. *Exp. Parasitol.* 84: 410-419.
- Minor N.T., Sha Q., Nichols C.G., and Mercer R.W. 1998. The gamma subunit of the Na,K-ATPase induces cation channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6521-6525.
- Mohraz M., Ackermann E., and Sweadner K.J. 1994. Immunoelectron microscopy of epitopes on Na,K-ATPase catalytic subunit. Implication for the transmembrane organization of the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 166: 2929-2936.
- Moller J.V., Juul B., and Maire M. 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochem. Biophys. Acta* 1286: 1-51.
- Osowski J., and Lingrel J.B. 1988. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit mRNAs. *J. Biol. Chem.* 263: 10436-10442.
- Pappas P.W., 1975. Membrane transport in helminthes parasites: a review. *Exp. Parasitol.* 37: 469-530.
- Pappas P.W., and Read C.P. 1973. Permeability and membrane transport in the larva of Taenia crassiceps. *Parasitol.* 66: 33-42.
- Pappas P.W., Uglem G.L., and Read C.P., 1973. Mechanisms and specificity of amino acid transport in Taenia crassiceps larvae (Cestoda). *Int. J. Parasitol.* 3: 641-651.
- Pearse V., Pearse J., Bochshaum M., and Buschsham R. 1987. Living invertebrates. California USA. Blackwell Scientific Publ. The Boxwood Press. 242-246.

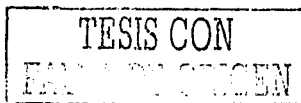


- Pedemonte C.H., and Kaplan J.H. 1990. Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am. J. Physiol.* 258: C1-C23.
- Pedersen P.L., and Carafoli E. 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-150.
- Peng L., Martin-Vasallo P., and Sweadner K.J. 1997. Isoforms of Na,K-ATPase α and β subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.* 17: 3488-3502.
- Pfeiffer R., Spindler B., Loffing J., Skelly P.J., Shoemaker C.B., and Verrey F. 1998. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett.* 439: 157-162.
- Pressley T.A. 1996. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 264-271.
- Puig-Solares M. 1974. Consideraciones clínico-patológicas acerca de la cisticercosis intraocular: cisticerco viable y cisticerco en involución. *Arch. Soc. Española Oftalmol.* 34: 341-364.
- Rabiela M.T., Rivas A., and Flisser A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol. Today.* 5: 57-359.
- Rabiela M.T., Rivas A., Castillo S., and Cancino F. 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, In Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., and Beltran F. (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press. 179-200.
- Ramirez-Bon E., Merchant M.T., Gonzalez-del-Pliego M., and Canedo L. 1982. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*, In Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C. and Beltran F. (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press. 261-280.
- Reeves A.S., Collins J.H., and Schwartz A. 1980. Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1591-1598.

- Repke K.R., and Schon R. 1992. Role of protein conformation changes and transphosphorylations in the function of Na⁺/K⁺-transporting adenosine triphosphatase: an attempt at an integration into the Na⁺/K⁺ pump mechanism. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 67: 31-78.
- Rogers T.B., and Lazdunski M. 1979. Photoaffinity labeling of the digitails receptor in the (sodium + potassium)-activated adenosine triphosphatase. *Biochem.* 18: 135-140.
- Ruiz A., Bhat S.P., and Bok D. 1995. Characterization and quantification of full-length and truncated Na,K-ATPase α 1 and β 1 RNA transcripts expressed in human retinal pigment epithelium. *Gene* 155: 179-184.
- Sachs G., and Munson K. 1991. Mammalian phosphorylating ion-motive ATPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 685-694.
- Sarti E.G., and Gutierrez I.O. 1986. La taeniasis y cisticercosis en México. *Salud Publica Mex.* 28: 556-563.
- Scheiner-Bobis G., and Farley R.A. 1994. Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1193: 226-234.
- Schenone H., Villarroel F., Rojas A., and Ramirez R. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin American, In Flisser A., Willms K., Laclette J.P, Larralde C., Ridaura C., and Beltran F. (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press. 25-38.
- Schmalzing G., Kroner S., Schachner M., and Gloor S. 1992. The adhesionmolecule on glia (AMOG/ β 2) and α 1 subunits assemble to functional sodium pumps in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 20212-20216.
- Schmalzing G., Ruhl K., and Gloor S. 1997. Isoform-specific interactions of Na,K-ATPase subunit are mediated via extracellular domains and carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1136-1141.
- Schmidt J., and Peters W. 1987. Localization of glycoconjugates at the tegument of the tapeworms *Hymenolepis nana* and *H. microstoma* with gold labeled lectins. *Parasitol. Res.* 73: 80-86.



- Schmidt T.A., Hasselbach S., Larsen J.S., Bundgaard H., Juhler M., and Kjeldsen K. 1996. Reduction of cerebral cortical [^3H]ouabain binding site (Na,K-ATPase) density in dementia as evaluated in fresh human cerebral cortical biopsies. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 4: 281-287.
- Schneider B.G., and Kraig E. 1990. Na⁺, K⁺-ATPase of the photoreceptor: selective expression of $\alpha 3$ and $\beta 2$ isoforms. *Exp. Eye Res.* 51: 553-564.
- Schneider B.G., Shyjan A.W., and Levenson R. 1991. Co-localization and polarized distribution of Na,K-ATPase $\alpha 3$ and $\beta 2$ subunits in photoreceptor cells. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 507-517.
- Schwartz A. 1983. Cardioglycosides. In *Current Topics in Membranes and Transport. Structure and Mechanism of the Na/K Pump* (Hoffman, J.F., and Forbush, B. III, eds.), Academic Press, New York 19: 825-855.
- Shamraj O.I., and Lingrel J.B. 1994. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase α subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12952-12956.
- Shull G.E., Greb J., and Lingrel J.B. 1986. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit from rat brain. *Biochemistry* 25: 8125-8132.
- Shyjan A.W., Cena V., Klein D.C., and Levenson R. 1990. Differential expression and enzymatic properties of the Na⁺,K⁺-ATPase $\alpha 3$ isoenzyme in rat pineal glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1178-1182.
- Skelly P.J., Kim J.W., Cunningham J., and Shoemaker C.B. 1994. Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 269: 4247-4253.
- Skou J.C. 1990. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁽⁺⁾-pump. *FEBS Lett.* 268: 314-324.
- Skou J.C., and Esmann M. 1992. The Na, K - ATPase. *J. Bioenergetics Biomem.* 24: 249-261.
- Slais J. 1982. Morphology of the scolex of *Cysticercus cellulosae* in brain cysticercosis, In Flisser A., Willms K., Lacleste J.P. Larralde C., Ridaura C.,



- and Beltran F. (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press. 235-259.
- Sosa A., Giron H., Alva S., and Calzada L. 1977. Presence and nature of a glycocalyx-like coat on the external vesicular membrane of *Cysticercus cellulosae*: A high resolution histochemical study. *Life Science* 21: 1021-1032.
- Sosa A., Gonzalez-Angulo A., Calzada L., and Alva S. 1978. Presence of ATPase on the vesicular membrana of *cysticercus cellulosae*. A high resolution cytochemical study. *Experientia* 34: 175-177.
- Sverdlov E.D., Monastyrskaya N.E., Broude A., Ushkaryov Yu A., Allikmets R.L., Melkov A.M., Smirnov Yu V., Malyshev I.V., Dulobova I.E., and Petrukhin K.E. 1987. The family of human Na⁺,K⁺-ATPase genes. No less than five genes and/or pseudogenes related to the α subunit. *FEBS Lett.* 217: 275-278.
- Sweadner K.J. 1985. Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity, and ion transport stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 260: 11508-11513.
- Sweadner K.J. 1989. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* 988: 185-220.
- Sweadner K.J. 1991. Overview: subunit diversity in the Na,K-ATPase. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 46: 63-76.
- Sweadner K.J. 1992. Overlapping and diverse distribution of Na-K ATPase isozymes in neurons and glia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: S255-S259.
- Sweadner K.J., and Arystarkhova E. 1992. Constraints on models for the folding of the NaK-ATPase. *Ann. NY Acad. Sci.* 671: 217-227.
- Takeda K., Noguchi S., Atsuko S., and Kawamura M. 1988. Functional activity of oligosaccharide-deficient Na,K-ATPase expressed in *Xenopus oocytes*. *FEBS Lett.* 238: 201-204.
- Talla E., de Mendoza R.L., Degand I., Goffeau A., and Ghislain M. 1998. Ca²⁺-ATPase-deficient strains and functions in calcineurin-mediated Ca²⁺ tolerance. *J. Biol. Chem.* 273: 27831-27840.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ten Cate W.J., Curtis L.M., and Rarey K.E. 1994. Na,K-ATPase α and β subunit isoform distribution in the rat cochlear and vestibular tissues. *Heart Res.* 75: 151-160.
- Therien G., Goldshleger R., Karlsh S.J.D., and Blostein R. 1997. Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 32628-32634.
- Threadgold L.T., and Dunn J. 1983. *Taenia crassiceps*: regional variation in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus tegument. *Exp. Parasitol.* 55: 121-131.
- Threadgold L.T., and Dunn J. 1984. *Taenia crassiceps*: basic mechanisms of endocytosis in the cysticercus. *Exp. Parasitol.* 58: 263-269.
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Trejo V. 1986. Caracterización del embríoforo del huevecillo de *Taenia solium*. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Tsang W., and Wilson M. 1995. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitol. Today.* 11: 124-126.
- Tusnády G.E., Simon I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics Applications Note* 17: 849-850.
- Urayama O., and Nakao M. 1979. Organ specificity of rat sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase. *J. Biochem. (Tokyo)* 86: 1371-1381.
- Vasilets L.A., and Schwarz W. 1993 Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* 1154: 201-222.
- Villagran U.J., and Olvera J.E. 1989. Cisticercosis Humana. Estudio clínico y patológico. *Patología* 26: 149-156.
- Vogelstein B., and Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-617.



- White A.C., Tato P., and Molinari J.L. 1992. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Agen. Disease* 1: 185-193.
- Willms K., and Merchant M.T. 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. *Parasite Immunol.* 2: 261-275.
- Willms K., Merchant M.T., Arcos L., Searley M., and Díaz de León L. 1980. Immunopathology of cysticercosis: In: Larralde C., Willms K., Seal M. eds. *Molecules, cells, and parasites in immunology*. New York: Academic Press 145-162.
- Wortman P.D. 1991. Subcutaneous cysticercosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 25: 409-414.
- Yingst D.R., Yang S.Y., and Schiebinger R. 1998. Purification of active Na⁺-K⁺-ATPase using a new ouabain-affinity column. *Am. J. Physiol.* 275: C1167-C1177.
- Yoshino K. 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part I. On the hatching of eggs of *Taenia solium*. *J. Med. Ass. Formosa.* 32: 139-141. a
- Yoshino K. 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part II. On the migratory course of the oncosphaera of *Taenia solium* within the intermediate host. *J. Med. Ass. Formosa.* 32: 155-158. b
- Yoshino K. 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part III. On the development of cysticercus cellulosae within the definite intermediate host. *J. Med. Ass. Formosa.* 32: 166-169. c
- Zahler R., Brines M., Kashgarian M., Benz E.J., and Gilmore-Hebert M. 1992. The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 99-103.
- Zahler R., Gilmore-Hebert M., Sun W., and Benz E.J. 1996. Na,K-ATPase isoform gene expression in normal and hypertrophied dog heart. *Basic Res. Cardiol.* 91: 256-266.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Zamofing D., Rossier B.C., and Geering K. 1988. Effects of tunicamycin on the cellular expression and structural arrangement of Na K-ATPase. *Prog. Clin. Biol. Res.* 268: 163-168.
- Zamofing D., Rossier B.C., and Geering K. 1989. Inhibition of N-glycosylation affects transepithelial Na⁺ but not Na⁺-K⁺-ATPase transport. *Am. J. Physiol.* 256: C958-C966.
- Zlokovic B.V., Mackic J.B., Wang L., McComb J.G., and McDonough A. 1993. Differential expression of Na,K-ATPase α and β subunit isoforms at the blood-brain barrier and the chroid plexus. *J. Biol. Chem.* 268: 8019-8025.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN