



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA
PROTEÍNA DE UNIÓN A CAJA TATA (TBP) DE *Taenia solium*.**

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA

QFB. Oscar Rodríguez Lima

Tutor: Dr. Abraham Landa Piedra

México D.F., 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. Para este trabajo se conto con la asesoría como Comité Tutor de la Dra. Imelda López Villaseñor y el Dr. Ángel Zarain Herzberg.

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

El autor recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Maestría en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, con el número de becario 240037.

Dedicado a la memoria de Rocío Lima Sánchez...

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación que me ha brindado a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Abraham Landa por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todas las enseñanzas brindadas a lo largo de este tiempo.

A mi Comité Tutor de Maestría: la Dra. Imelda López Villaseñor y el Dr. Ángel Zarain Herzberg, por todos los consejos y comentario para este proyecto.

A mis padres: Violeta y Liborio, por seguir impulsándome en la vida, por los ánimos que me dan a diario y por que siempre han estado conmigo cuando más los he necesitado.

A mis hermanos, David y Daniel, por ser las personas más geniales que conozco.

A mi Tía Rocío, por que se que dondequiera que estés... me estas cuidando.

A Laura, por todo este tiempo a mi lado, por consentirme tanto y por animarme a dar siempre lo mejor de mí. En definitiva, la mejor compañera de equipo que he tenido. Y por los años que nos quedan juntos.

A los grandes amigos que tuve el placer de conocer en esta nuestra Universidad: Cecilia, Claudia, David, Goretti, Mariana, Marisol, Mercedes, Ricardo, Roberto, Rolando, Sara, Vera, Zaine.

A Jonathan por quien sabe ya cuantos años de ser amigos.

A mis queridos compañeros de laboratorio, que aunque algunos de ustedes ya no están, se les recuerda con cariño: Alicia, Anayetzin, Aramís, Areli, Felipe, Julián, Lucia, Magda, Marco, Narda, Odín, Omar, Ponciano, Richie, Sergio, Vera, Víctor, Viri.

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

ÍNDICE GENERAL.

Abreviaturas	6
I. Resumen	7
II. Introducción	8
2.1 <i>Taenia solium</i>	8
2.1.1 Ciclo de vida	10
2.2 Transcripción y polimerasas	11
2.2.1 Estructura de un promotor proximal	11
2.2.2 Preinicio de la Transcripción	12
2.2.3 Proteína de unión a caja TATA (TBP)	13
2.2.4 Transcripción en el género <i>Taenia</i> .	14
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos particulares	16
V. Material y métodos	17
VI. Resultados	20
VII. Discusión de resultados	26
VIII. Conclusiones	30
IX. Anexo	31
X. Referencias	32

Abreviaturas.

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

I. Resumen.

Los organismos eucariontes poseen un sistema transcripcional conformado por tres RNA polimerasas (RNAPol): RNAPol I, RNAPol II y RNAPol III. La RNAPol II es la encargada de la transcripción de genes que codifican para proteínas. Para que esta pueda llevar a cabo su función requiere de la formación de un complejo de pre-inicio de la transcripción (PIC). Una de las proteínas importantes para la formación de este complejo, es la proteína de unión a caja TATA (TBP).

La TBP se encarga del reconocimiento de la caja TATA, la cual se encuentra situada en el promotor proximal del gen. Dicho reconocimiento produce el reclutamiento de los Factores de Transcripción Generales (TF's) y la consecuente formación del PIC, lo que da como resultado final la transcripción del gen en cuestión. En *Taenia solium* se sabe poco sobre el proceso de la transcripción y se infiere que es un proceso similar al de otros organismos estudiados.

Este trabajo trata sobre el aislamiento e identificación del gen que codifica para una TBP de *Taenia solium*. La secuencia genómica revela la presencia de 4 intrones y 5 exones. Se aisló el cDNA de una clona que tiene marco abierto de lectura (ORF) de 717 pares de bases (pb) que codifica para una proteína de 238 aminoácidos (aa) con un peso teórico de 26.7 kDa. Los análisis tipo Southern y Northern blot revelaron la existencia de un gen único y la presencia de dos transcritos en el estadio larvario de *T. solium*. Alineamientos múltiples de la TBP de *T. solium* y de otras TBP's de otras especies mostraron una alta identidad en el extremo C-ter, pero no así en el N-ter. Análisis computacionales de la estructura primaria, han identificado los residuos que interactúan con el ADN, así como determinado su estructura secundaria por modelado molecular. Este es el primer estudio sobre una proteína de transcripción en *Taenia solium*.

II. Introducción.

2.1 *Taenia solium*.

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

El cuerpo del gusano adulto, está formado por un cuello (lugar donde se producen los proglótidos) y el estróbilo que está cubierto por el tegumento o epitelio, que le permite absorber los nutrientes del medio en el que habita. El estróbilo está compuesto de segmentos o proglótidos que parten del cuello unido al escólex. Los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, es decir, no han desarrollado los órganos sexuales. Los proglótidos maduros se encuentran en la parte media del estróbilo y presentan sus órganos sexuales diferenciados. Cada proglótido maduro posee genitales masculinos y femeninos (organismo hermafrodita), haciendo de cada uno de estos segmentos una unidad de reproducción (Flisser A., et al., 2006a). Los segmentos mas alejados del estróbilo se conocen como proglótidos grávidos, los cuales presentan ramas uterinas llenas de huevos; generalmente estos proglótidos se desprenden del estróbilo y son liberados en las heces. Aproximadamente un proglótido grávido contiene alrededor de 50,000 huevos (Flisser A., et al., 2006b).

Los huevos (Figura 2A) son esféricos y presentan una apariencia radial (al microscopio óptico), en su interior contienen una oncosfera o embrión con seis pares de ganchos (embrión hexacanto); la capa mas externa que recubre al huevo es el vítelo, seguida del embrióforo. Este último está constituido por bloques de una proteína similar a la queratina, que le da resistencia e impermeabilidad, lo que le permite soportar los drásticos cambios del medio ambiente. Los bloques proteicos están unidos por una proteína cementante sensible a la digestión enzimática del jugo gástrico y a la acción de las sales biliares del intestino, lo que permite la liberación y activación de la oncosfera.

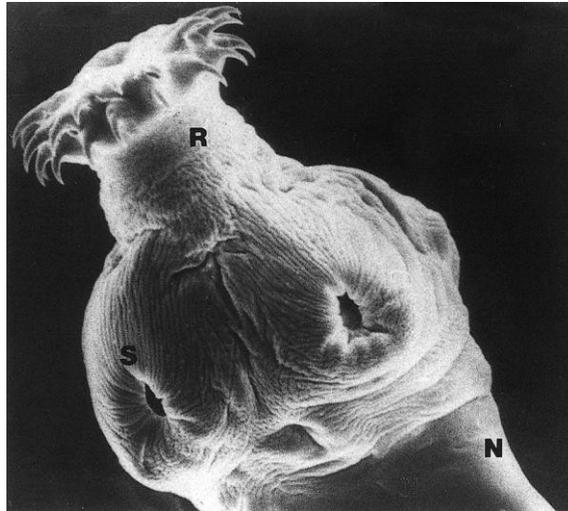


Figura 1. Micrografía electrónica del escólex del parásito adulto de *Taenia solium*, en el cual se puede observar el rostelo (R), con su doble corona de ganchos; ventosas (S) y el cuello (N) (Tomada de Sciutto E., et al., 2000).

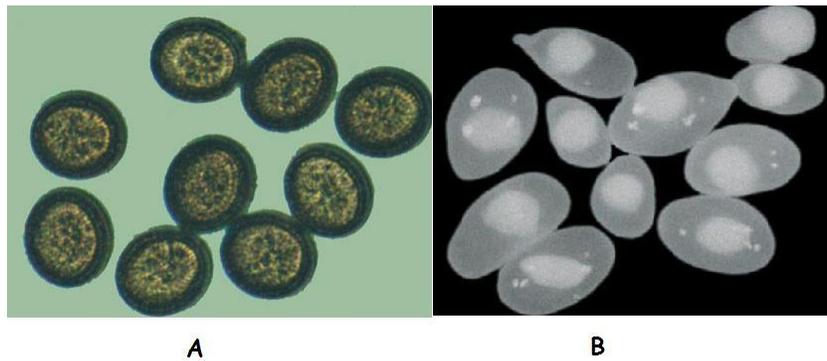


Figura 2. Fotografía tomada a través de microscopio óptico de: (A) huevos y (B) cisticercos de *T. solium* (Tomada de Flisser A., et al., 2006a).

El cisticerco (Figura 2B) es una vesícula ovalada y translúcida, de 0.5 a 2 centímetros de diámetro con un escólex invaginado que al igual que en el parásito adulto posee una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. La pared de la vesícula que contiene al líquido vesicular, está cubierta en su parte externa de un tegumento que le permite la absorción de los nutrientes del hospedero.

2.1.1 Ciclo de vida.

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

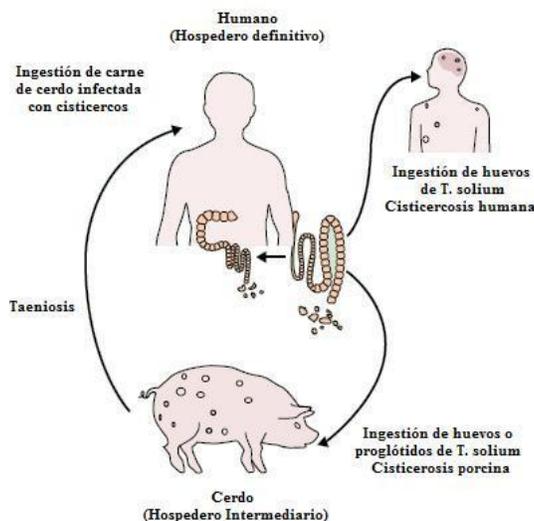


Figura 3. Ciclo de vida de *T. solium*. El humano (hospedero definitivo) adquiere la taeniosis por ingestión de cisticercos presentes en la carne de cerdo. El adulto se aloja en el intestino delgado donde produce huevos que al ser ingeridos por el cerdo (hospedero intermediario) o humano (hospedero accidental)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

El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo insuficientemente cocida infectada con cisticercos, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares participan en la activación y evaginación del escólex del cisticerco que se fija a la pared intestinal. Una vez anclado el parásito crece, madura y se diferencia hasta convertirse en un gusano adulto. La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto es

un factor de riesgo para que los humanos y cerdos adquieran la cisticercosis (Willms K., et al., 2008).

2.2 Transcripción y polimerasas.

En eucariontes la transcripción es mediada por tres RNA Polimerasas (RNAPol): I, II y III. La RNAPol I se encarga de la transcripción de los genes ribosomales (RNAr); la RNAPol II de los genes que codifican para proteínas (RNAm), así como para los genes de los RNA nucleares pequeños (RNAsn), y la RNAPol III para los genes del RNA de transferencia (RNAt), el RNAr 5S y otros RNAsn. Este proceso representa un paso crucial en el flujo de la información a través de la célula.

El proceso de Transcripción de los genes que codifican para proteínas se divide en tres momentos importantes: El inicio, la elongación y la terminación (Figura 5). La iniciación consiste en el reconocimiento de la secuencia iniciadora por parte de la RNAPol II y la formación de los productos abortivos antes de la elongación de la cadena.

Para que la iniciación se lleve a cabo es necesario el reclutamiento de una serie de factores de Transcripción (TF) en el promotor proximal del gen. Esto es conocido como el Pre-inicio de la Transcripción.

2.2.1 Estructura de un promotor proximal.

En el promotor proximal es donde se coloca la maquinaria requerida para que la RNAPol II pueda activarse. Existen ciertas secuencias de ADN que ya se han identificado que interaccionan con los TF's. Estas secuencias son la caja TATA, el elemento de reconocimiento del TF IIB (BRE), la secuencia iniciadora (Inr), el elemento de promotor corriente abajo (DPE). Se sabe que no es necesaria la presencia de todos estos elementos para que la transcripción inicie.

La caja TATA es el sitio de unión de la TBP al DNA. Este fue el primer elemento del promotor mínimo en ser identificado. Fue descubierto en las secuencias de los genes que codifican histonas de *Drosophila* (Goldberg M. L., 1979). Típicamente se encuentra de -25 a -30 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción y tiene la secuencia consenso TATAAAA (Chalkey G. y Verrijzer P., 1999; Juo Z., et al., 1996). Estudios recientes (*in*

silico) sugieren que la caja TATA esta presente en aproximadamente el 10–15% de los promotores mínimos en el humano (Juven-Gershon T., et al., 2006).

El Inr abarca el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Se ha encontrado en promotores mínimos que incluyen caja TATA y los que no la incluyen también. La secuencia consenso para el Inr en células de mamífero es Py-Py-A₊₁-N-T/A-Py-Py. En donde A₊₁ corresponde generalmente al sitio de inicio de transcripción (TSS) (Butler J. E. F. and Kadonaga J. T., 2002).

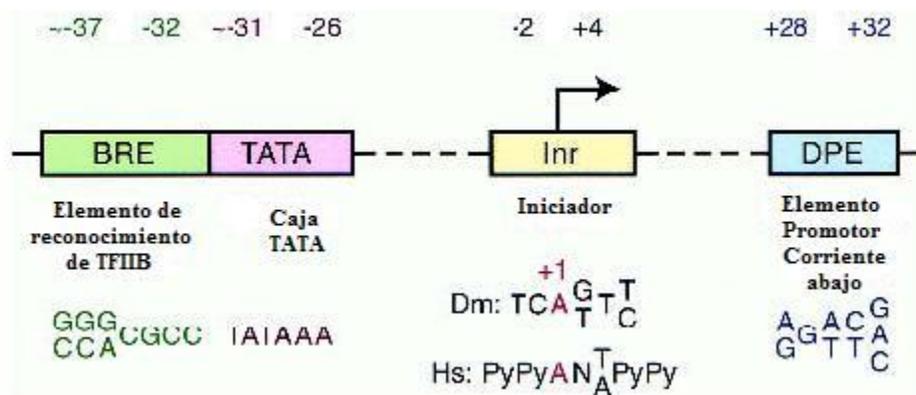


Figura 4. Elementos del promotor mínimo y sus secuencias consenso. Los números de arriba en la figura representan las posiciones de dichos elementos respecto al TSS. Py: Pirimidinas, N: cualquier base, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*. Modificado de Butler J. E. F. and Kadonaga J. T., 2002.

El DPE es un elemento corriente abajo que es requerido para la unión del TFIID en un subconjunto de promotores sin caja TATA. Se localiza en +28 a +32 relativos al TSS, presenta una secuencia consenso de A/G-G-A/T-C/T-G/A/C (Kadonaga J. T., 2002).

El BRE se encuentra inmediatamente corriente arriba de la caja TATA y presenta una secuencia consenso de 7 pares de bases: G/C-G/C-G/A-C-G-C-C. Este motivo no se encuentra en levaduras ni plantas, lo cual sugiere que este elemento no contribuye a la regulación en estos organismos (Smale. S. T. and Kadonaga J. T., 2003) (Figura 4).

2.2.2 Preinicio de la Transcripción.

Estudios *in vitro* han mostrado que el inicio de la transcripción por la RNAPol II requiere de los factores basales de transcripción: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH

(Sikorski T.W. and Buratowski S., 2009). El complejo que se forma de este reclutamiento de factores es conocido como el Complejo de pre-inicio (PIC). En primer lugar se une la TBP a la caja TATA. Esto promueve el reclutamiento de los TFIIA y IIB. Un complejo formado por la RNAPol II y el TFIIF reconocen el sitio y se unen. Por último la unión de TFIIE y TFIIH dan lugar a un complejo cerrado inactivo (Figura 5). El TFIIH con su actividad de cinasa, fosforila al dominio carboxilo terminal (CTD) en la Ser2 de la RNAPol II y promueve la apertura del complejo para dar inicio a la transcripción del gene en cuestión (Hernández N., 1993).

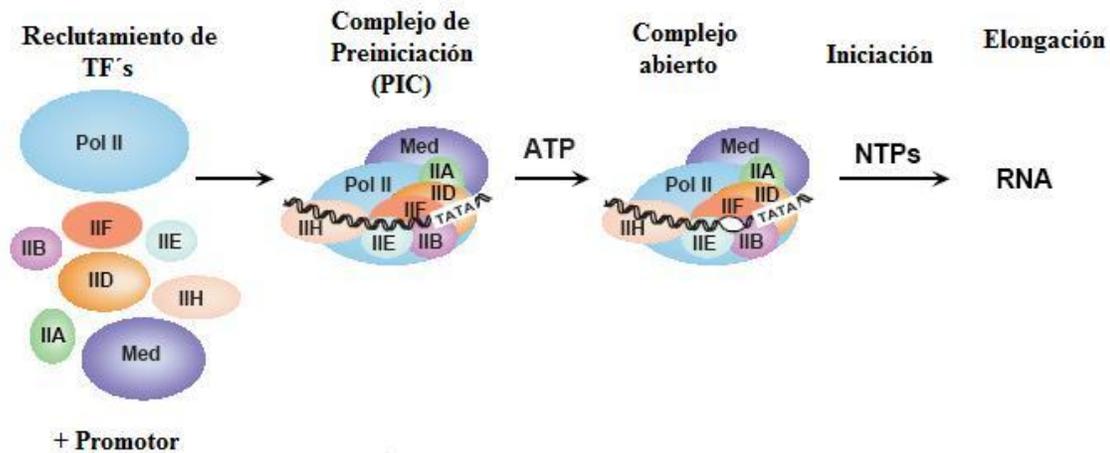


Figura 5. Pasos secuenciales para la formación del PIC, el inicio y la elongación de la transcripción. Modificado de Hahn S., 2004.

2.2.3 Proteína de unión a caja TATA (TBP).

La TBP es una proteína de 26-40 kDa (PDB, 2009), con una estructura de “silla de montar” (Figura 6), con dimensiones aproximadas de 32 Å x 45 Å x 60 Å (Nikolov D. y Burley S., 1994), está compuesta por una estructura simétrica de hélices α y láminas β , con dos dominios estructurales de entre 89 a 90 aminoácidos, los cuales conforman el segmento carboxilo-terminal (C-terminal) altamente conservado (180 aa aproximadamente con un 80% de conservación), y por un segmento amino-terminal (N-terminal) flexible, pero muy variable entre especies que comprende desde 18 a 159 aa, como la TBP de *Arabidopsis thaliana* y el humano, respectivamente (Heard D., et al., 1993).

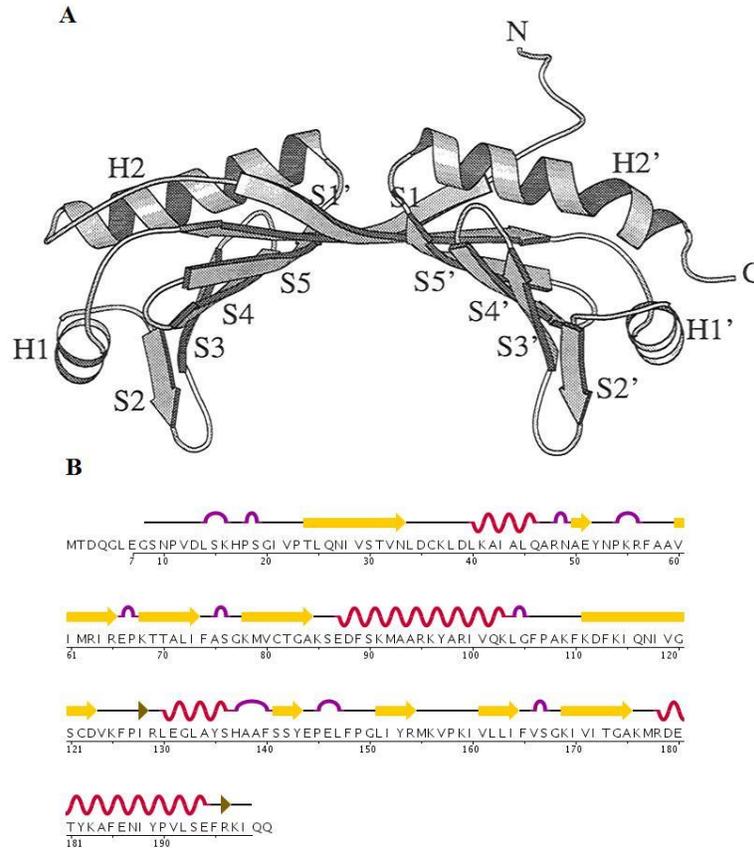


Figura 6. Estructura de la TBP de *Arabidopsis thaliana*. (A) Muestra la estructura terciaria con sus dos dominios: el dominio cóncavo, con el cual se produce la unión al ADN y el dominio convexo, que sirve para interaccionar con otros factores. Se aprecia la conformación de “silla de montar”, las 10 láminas β (S) y las 4 hélices α (H). (B) Muestra la estructura primaria de la TBP, señalando sobre los aminoácidos la estructura secundaria que forman. Modificada de Davidson I., 2003; y de Protein Data Bank, 2009: http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediated_Sequence.do?structureId=1VOK.

La cara cóncava de la estructura de “silla de montar” consiste en diez láminas β anti-paralelas, altamente curvadas, en las cuales se localizan todos los aa implicados en la unión al ADN. La cara convexa, está conformada por cuatro hélices α -anfipáticas, que contienen residuos importantes para la interacción con otros factores de transcripción (Kim J. y Burley S., 1994).

2.2.4 Transcripción en el género *Taenia*.

En este género la transcripción no ha sido estudiada. Existen solo algunos genes secuenciados reportados donde se ha determinado computacionalmente algunos de los elementos del promotor proximal: Se conocen las secuencias de los genes de dos actinas,

pAT5 y pAT6 (Campos A. et al., 1990) y de la paramiosina (Vargas-Parada L. y Laclette J.P., 2003) de *T. solium*; la secuencia del gen de la 2-Cys Peroxirredoxina típica tanto de *T. solium* como de *T. crassiceps* (Vaca-Paniagua F. et. al., 2009). En la Figura 7 se muestra el alineamiento de las secuencias promotores proximales conocidas hasta la fecha en el género *Taenia*. Se puede observar que la A de la secuencia iniciadora (Inr) se conserva en todas ellas y esta a una distancia que va entre 23 y 44 pb con respecto al ATG de inicio de la traducción. Así mismo se observa que la caja TATA de todas ellas no concuerda con la secuencia consenso, pero contiene el motivo de 4pb (TATA) que le da el nombre a esta caja y se encuentra a una distancia entre -30 y -33 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

		TATA	Inr	
pAT5	-30	TATATAAA	CCCGTGGGTCTTCAAGCATCGCAACTTACGACTTGTGCTGTATCTGTATCGGGCTGTCTGCAACATG	44
pAT6	-31	TATAAGAA	CGCTTGGTGGGACACCAGTGGCACACTTGTC	25
TsPrx	-30	TATATTTGGCGGTAAGAGCTGTGCGTGGTGAATTC	CATTGTTTGCCTGTAATG	23
TcPrx	-33	TATATTTGGCGGTAAGGACGCTGTGGCTGTGAATCC	CATTGTCTGCTCGCGTTCAGTGATG	30

Figura 7. Alineamiento de los promotores mínimos de *Taenia* reportados. pAT5 y pAT6 que corresponden a genes de Actina; Ts2-CysPrx que corresponde a 2-Cys Peroxirredoxina de *T. solium*; Tc2-CysPrx corresponde a 2-Cys Peroxirredoxina de *T. crassiceps*. Modificado de Vaca-Paniagua F. et. al., 2009.

Experimentos preliminares realizados en un ensayo de retardamiento con proteínas nucleares de *Taenia solium* mostraron que cuando se utiliza una sonda de ADN que contiene la caja TATA putativa del promotor proximal del gen para la Ts2-Cys-Prx, se observa una banda de retardo; sugiriendo que hay unión de proteínas nucleares al promotor (Vaca-Paniagua F, 2009).

III. Hipótesis.

Taenia solium lleva a cabo la transcripción, donde está involucrada la proteína de unión a caja TATA (TBP) que formación el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC).

IV. Objetivos.

Objetivo general.

- Clonar y caracterizar el gen que codifica para la proteína de unión a caja TATA de *Taenia solium* (TsTBP)

Objetivos Particulares.

- Aislamiento del gene para la TBP de *T. solium* (TsTBP).
- Análisis de gene para la TsTBP.
- Aislamiento y caracterización del ADNc para la TsTBP.
- Análisis Southern Blot para determinar el número de genes de la TsTBP.
- Análisis Northern Blot para determinar el número de transcritos de la TsTBP.

V. Material y Métodos.

Material Biológico.

Las cepas de las bacterias utilizadas pertenecen a la especie *Escherichia coli*, cepas: TOP10 [F⁺ mcrA Δ(mrr-hdsRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 dROS recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG]; C600 hfr- [supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21]; de la casa Invitrogen. Los cisticercos de *Taenia solium* fueron obtenidos del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente, comprados en rastros de la ciudad de México.

Reactivos.

Los oligonucleótidos TBP-X3 y TBP-X2A fueron diseñados a partir de regiones conservadas en las TBPs. Los oligonucleótidos que flanquean la región de clonación del fago λgt10 denominados λgt10F y λgt10R fueron comprados a la casa comercial Pharmacia. Para las reacciones de PCR se utilizó el estuche de la casa Biotecnologías Universitarias. El estuche para la reacción conjunta de la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) fue el Superscript One-Step RT-PCR de la casa Invitrogen. Se utilizó el Estuche Random Prime Labelling System para el marcaje radioactivo de las sondas de la casa comercial GE Healthcare. El isótopo radiactivo ³²P-dCTP con una actividad específica de 250 μCi/mmol (110 TBq/mmol) fue comprado a la casa comercial Amersham Bioscience. Las placas de rayos X y los reactivos para revelar y fijar las placas fueron de la marca KODAK. Las membranas de nylon fueron de la marca Hybon de Amersham Bioscience. Las soluciones para los tamizajes, la preparación de amortiguadores y otras soluciones fueron hechas con reactivos comerciales de la más alta calidad disponibles en el laboratorio.

Tamizaje para el aislamiento del ADNc que codifican para la TBP de *T. solium*.

Se realizó un tamizaje de una biblioteca de ADNc de larva de *Taenia solium* construida en el fago filamentoso λgt10. Alrededor de 45,000 clonas de dicha biblioteca fueron tamizadas con una sonda (TsTBPX3-X2A) marcada radioactivamente con [α-³²P]dCTP (Rodríguez Lima O., 2009) en una solución de hibridación (ver anexo) a una temperatura de 55°C. Las

clonas obtenidas se sometieron a dos rondas más de tamizaje. Las clonas positivas finales se caracterizaron mediante la PCR y digestión con enzimas de restricción *Eco RI*, *Bam HI* y *Hind III*, para determinar el tamaño y la similitud de las clonas. Los productos de PCR de estas placas amplificadas con los oligonucleótidos λ gt10F y λ gt10R se clonaron en el vector pCRII (Invitrogen) y se transformaron en células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Los plásmidos de las clonas positivas se purificaron por el protocolo estándar de lisis alcalina. Las secuencias nucleotídicas contenidas en los plasmidos se obtuvo con el mediante secuenciación automática de DNA usando BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems). Los análisis de estas secuencias, así como la traducción de las mismas a aminoácidos y los alineamientos tipo Clustal se realizaron con el programa PC/GENE.

Aislamiento del gen de la TBP de *T. solium*.

Se realizó un tamizaje de una biblioteca de ADN_g de larva de *Taenia solium* construida en el fago λ ZAP de la misma forma que se describe en el apartado superior, usando una sonda (TsTBP X1-X2) marcada radioactivamente con [α -³²P]dCTP. La clona obtenida se clono en el vector pCRII (Invitrogen) y se transformaron en células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Los plásmidos de las clonas positivas se purificaron por el protocolo estándar de lisis alcalina. Se secuenció y analizó dicha secuencia con el programa PC/GENE.

Análisis de las secuencias encontradas.

El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas en este trabajo se hizo con varios programas computacionales. Para el análisis de las secuencias obtenidas y su traducción a aminoácidos se utilizó el programa PC/GENE. El análisis de alineamientos múltiples se hizo con CLUSTAL X. El análisis de las secuencias promotoras se realizó con el programa TRANSFAC. La construcción de los modelos tridimensionales de la TsTBP se hizo con el programa MOE 2007.8.

Extracción de ADN genómico de *T. solium*.

Se digirieron 1.5 g de cisticercos de *T. solium* con proteinasa K por 2 – 3 h en Tris 50mM, EDTA 1mM y sarcosil 0.5%. La digestión se centrifugo a 3,000 x g por 15 min; se hicieron extracciones con fenol y cloroformo del sobrenadante. La fase acuosa se incubo

con isopropanol por 10 min, se centrifugo a 1,000 x g por 10 min. El precipitado se resuspendio en etanol al 70% y se centrifugó como se menciono anteriormente. Las preparaciones se resuspendieron en TE y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Extracción de ARN total de *T. solium*.

Se adiciono 3mL de TRIZOL a 1.5g de cisticercos de *T. solium* y se homogenizo en un Ultra turrax T-8. Posteriormente se le agregó 600 µL de cloroformo y se deja incubando a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifuga a 13,000 x g. En un tubo estéril se agregaron 3 mL de isopropanol y posteriormente se agregó el sobrenadante del centrifugado anterior. Se agitó en vortex e incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó nuevamente a 13,000 x g por 10 min y se lavo con etanol frio al 75%. La muestra se centrifugó nuevamente a 13,000 x g por 10 min. El sobrenadante se descarta y el pellet se deja secando a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en agua miliQ. Se cuantificó y guardó a -70°C hasta su uso.

Southern y Northern Blot.

El Southern Blot se realizó digiriendo DNA genómico (10µg) de *T. solium* con 4 enzimas de restricción: *Hind III*, *Eco RI*, *Bam HI* y *Bgl II*. Las digestiones se resolvieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se transfirieron a una membrana de nylon (Amersham).

Para el Northern Blot se extrajo con TRIZOL el RNA total del estadio larvario de *T. solium*. Se sometieron 10 µg de RNA a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con formaldehido y se transfirieron a una membrana de nylon (Amersham).

Ambas membranas se fijaron con luz UV y se pusieron a hibridar con una sonda (TsTBP X1-X2) marcada radioactivamente con [α -³²P]dCTP, a 55°C por una noche. Se lavaron 4 veces y se expusieron a placas de rayos X (KODAK).

VI. Resultados.

Se aisló la secuencia del gen que codifica para la TsTBP de una biblioteca de ADN genómico construida en el fago λZAP. Dicha secuencia contiene 1461pb (Figura 8), se identificaron 4 intrones y 5 exones. En los intrones se identificaron las secuencias donadoras yceptoras (GT/ /AG), las cuales cumplen con lo propuesto por Chambon. Así mismo, se realizó un análisis donde se identificaron los sitios putativos de ramificación de cada uno de los intrones, los cuales concuerdan con el consenso en mamíferos (Tabla 1).

Tabla 1. Intrones presentes en la secuencia de ADNg del gen TsTBP.

Intrón	Tamaño (pb)	Secuencia donadora	Punto de ramificación	Secuencia aceptora
I	76	<u>G</u> TAAAGC	CATGA <u>A</u> T	TTTC <u>A</u> G
II	208	<u>G</u> TAAAGA	CGTCA <u>A</u> C	CTTT <u>A</u> G
III	69	<u>G</u> TTTCG	TCTTA <u>A</u> G	CTTT <u>A</u> G
IV	126	<u>A</u> GACAC	TTTTG <u>A</u> T	ACAG <u>G</u> T

Secuencia consenso mamíferos: T/C – N – T/C – T/C – A/G – A – T/C

↑
Sitio de ramificación

El análisis de la secuencia promotora proximal, nos indicó que existen dos posibles cajas TATA y dos secuencias que podrían fungir como sitios de inicio de la transcripción (Figura 8). Otro análisis de comparación de la secuencia promotora de TsTBP con secuencias de genes del género *Taenia* muestra que los dos sitios putativos de inicio de transcripción tienen un cierto parecido con los sitios encontrados en genes de *T. solium* y con la secuencia consenso de mamíferos (Figura 9). También se encontró un sitio para el factor NF1.

		TATA		Inr	
pAT5	-30	TATATAAA	CCGTGGGTCTTCAAGCATCG	GCAACTT	ACGACTTGTGCTGTATCTGTATCGGCTGTCTGCAACATG 44
pAT6	-31	TATAAGAAG	CGCTTGGTGGGACACCAGTGG	GCAACTT	TGTCCAAGGCCAGCAGTATG 25
TsPrx	-30	TATATTT	GGCGGTAAGAGCTGTGCGTGG	TGAATTC	ATTGTTTGGCGTGAATG 23
TcPrx	-33	TATATTT	GGCGGTAAGGACGCTGTGGCTGT	TGAATCC	CATTGTCTGCTCGCGTTTCAGTGATG 30
TsTBP	-42	TTAAAAAT	CCATT//AGCCCTTCGTGGACCCC	GCAACCA	AGCAATGTAAGCATCGG//GGGTTCTGTGCGAGCAGATG 65
TsTBP	-43	TTAAAAAT	TCTTCCTTGTAAATTTG//CCATT	TGATTCC	AACAGCC//AACAGCAACCCTCCGGGTTCTGTGCGAGCAGATG 91

Secuencia consenso mamíferos: Py-Py-A₊₁-N-T/A-Py-Py

T/C – T/C – A₊₁ – N – T/A – T/C – T/C

Figura 9. Análisis de las posibles secuencias de inicio de la transcripción (TSS) de la TsTBP. Se muestran secuencias de genes del género *Taenia* donde se observa la caja TATA y el TSS. pAT5 y pAT6 corresponden a genes de Actina de *Taenia solium*; TsPRX y TcPRX corresponden al gen de la 2-Cys Peroxiredoxina de *T. solium* y *T. crassiceps*, respectivamente. La secuencia de la TsTBP (marcadas en amarillo) muestra las posibles secuencias de TSS (sombreado en verde) y las posibles cajas TATA (sombreado en rojo).

Asimismo se encontraron dos clonas producto del tamizaje de una biblioteca de ADNc de larva de *T. solium* construida en el fago λ gt10, con la sonda un fragmento de ADNc de 576pb que codifica para una región de la TsTBP. La secuencia de ambas clonas fueron idénticas y contienen la secuencia completa que codifica para una TBP. Estas presentaron una secuencia de 919 pb, con un marco abierto de lectura a partir de la base número 37, cuyo triplete codifica para una Metionina, y con un codón de término en la base número 751 (TAA). Posee una región 5'UTR de 36 pb y una región 3'UTR de 168 pb que contiene una cola de poliadenilación de 18 bases. No se encontró una señal de poliadenilación clásica (Figura 8).

Esta secuencia codifica para una proteína de 238 residuos de aminoácidos (aa) con un peso teórico de 26.7 kDa y un pI predictivo de 10.6. En el análisis de la estructura primaria se identificaron los aminoácidos que la literatura reporta presentan interacción con el ADN. Asimismo se encontró que el dominio Amino terminal (N-ter) está conformado por 46 aa, mientras que el Carboxilo terminal (C-ter) por 192 aa. El análisis del alineamiento múltiple (Figura 10) mostró que la TsTBP tiene una identidad de 56.7% con *Arabidopsis thaliana*, 59.6% con *Candida albicans*, 59.2% con *Nicotiana tabacum*, 45% con *Schistosoma japonicum* y 72.7% con *Schistosoma mansoni*.

Se construyó un modelo estructural (*in silico*) de la proteína usando la secuencia primaria obtenida (Figura 11A). La estructura obtenida muestra el plegamiento clásico de una TBP, mostrando las láminas β y las hélices α características de estas proteínas.

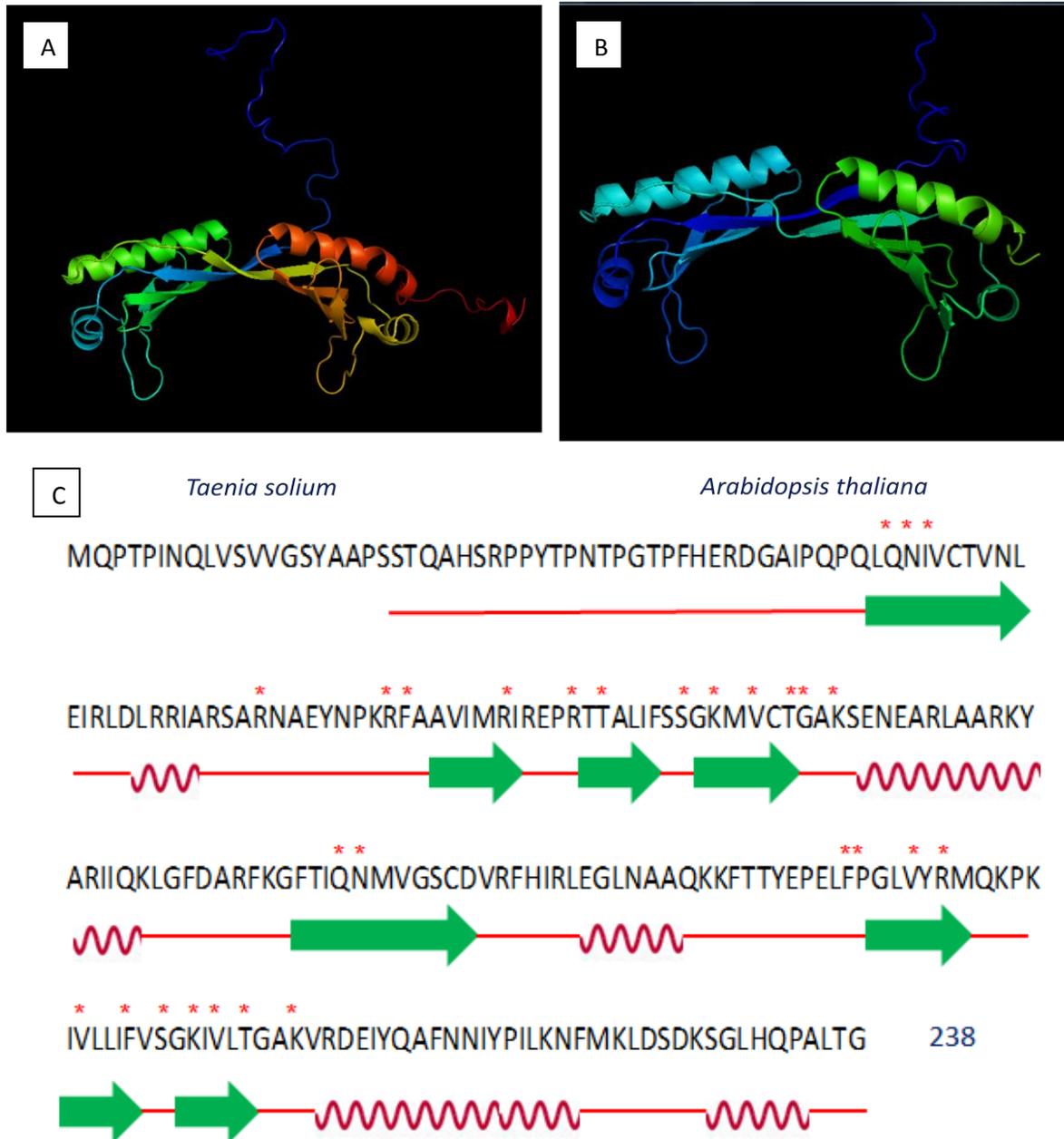


Figura 11. A) Modelo de la estructura terciaria generada *in silico* a partir de la secuencia primaria de la TBPTs. B) Estructura terciaria de la TBP de *Arabidopsis thaliana*. C) Estructura primaria y secundaria de la proteína TsTBP. Las flechas verdes representan las láminas β , mientras las espirales representan las hélices α . Con asterisco están marcados los aa que interaccionan con el ADN.

El análisis de la estructura secundaria muestra la presencia de 8 láminas β y 5 hélices α (Figura 11C). Donde existe una hélice más que en otras TBP's. Esta hélice extra se encuentra en el dominio C-ter. Asimismo se observa que el dominio N-ter es más largo que en la TBP de *Arabidopsis thalian* (Figura 11B).

Los análisis de Southern y Northern Blot muestran un patrón de bandeo simple para cada enzima y la presencia de dos transcritos en el RNA total, de tamaño aproximado de 1.0 Kb y 1.1 Kb (Figura 12).

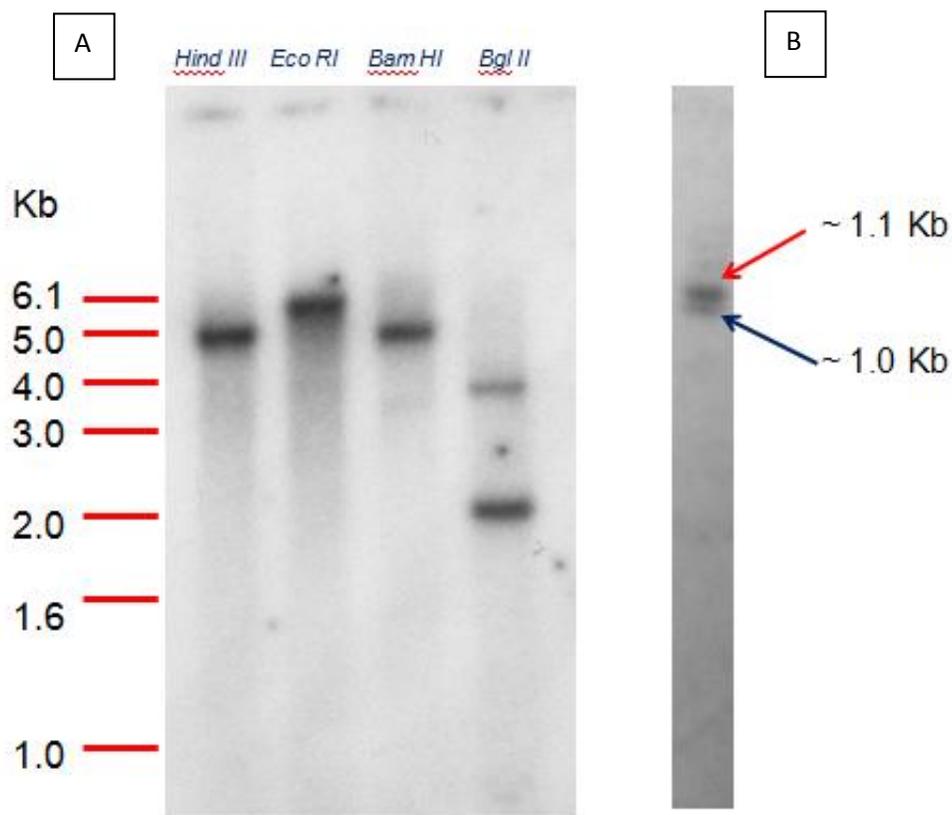


Figura 12. A) Southern Blot con ADN genómico del estadio larvario de *T. solium* digerido con las enzimas de restricción *Hind III*, *Eco RI*, *Bam HI* y *Bgl II*. B) Northern Blot usando RNA total del estadio larvario de *T. solium*.

VII. Discusión.

En México la prevalencia de las enfermedades causadas por parásitos son muy altas, y *Taenia solium* continua siendo un gran problema económico y de salud pública en el país (Flisser A, 1988). Este parásito causa la taeniosis y la cisticercosis, siendo esta última la forma más grave, y de gran importancia médica cuando se aloja en el Sistema Nervioso Central (SNC, Flisser A., et al., 2006). Las malas condiciones higiénicas con la que se trata a los cerdos (hospedero intermediario), la pobre educación e infraestructura para la salud humana del país, la carencia de un método diagnóstico efectivo para encontrar a los portadores humanos del adulto (hospedero definitivo) y la resistencia a los dos medicamentos utilizados en contra del parásito, así como al nulo desarrollo de nuevos medicamentos, han hecho que sea difícil su erradicación (Correa M., et al., 1994). Estos factores hacen que los investigadores se centren en la búsqueda de nuevas estrategias para combatir esta parasitosis.

En este trabajo se encontró que *Taenia solium* posee al menos una TBP. La secuencia genómica encontrada de 1461pb revelo la presencia de 4 intrones y 5 exones (Figura 8), en donde los intrones presentan tamaños que van de 69 a 208 pb, los cuales difieren en número y tamaño de intrones de los genes encontrados para TBP en *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*. Donde el gen del humano posee 6 intrones de aproximadamente 2.5 Kb (Chalut C., et al., 1995), mientras que en *Drosophila* solamente hay un intrón de 64 pb (Mira-DeVitto L M., et al., 1995). Lo cual está relacionado con el proceso de evolución de cada uno de estos organismos.

Al hacer un análisis de las secuencias intrónicas se observó que los sitios putativos para los puntos de ramificación de cada uno de estos, son similares al consenso presentado en mamíferos (Tabla 1). Asimismo se encontraron las secuencias donadoras yceptoras para llevar a cabo splicing correspondientes a los sitios putativos de reconocimiento del ARNsn U1 y ARNsn U2 respectivamente, lo cual cumple la regla de Chambon y mostrando que pertenecen al tipo III.

El análisis de la región promotora mostró que dos secuencias podrían fungir como sitios de inicio de la transcripción (Figura 9) cuando se comparan con la secuencia consenso de mamífero y las secuencias iniciadoras de algunos genes del género *Taenia* (Vaca-Paniagua F., et al., 2009). Sin embargo, esto tiene que ser verificado experimentalmente. Asimismo se encontró una posible caja TATA para cada uno los sitios putativos de inicio de la Transcripción, las cuales son secuencias ricas en A/T pero sin tener la secuencia consenso que ha sido ampliamente reportada en la literatura. Asimismo la distancia desde el posible sitio de inicio de la transcripción hacia la posible caja TATA es de 42 y 43 bases en cada uno de los casos, aunque esta no es la distancia adecuada, puede haber diferencias sutiles que aun así, permitan el reconocimiento por parte de los factores de transcripción. También se identifico un sitio de posible interacción con el factor NF1 el cual ha sido descrito y tiene la capacidad de interactuar con los miembros de la maquinaria transcripcional TFIIB y TBP (Xiao H., et al, 1994). Definitivamente se podrá hacer un mejor análisis de este promotor proximal en cuanto podamos determinar el TSS de este gen, aún así las especulaciones que se menciona en este trabajo están basadas en los análisis computacionales realizados con el programa computacional TRANSFAC.

En un inicio pudimos identificar un ADNc que codifica para la TBP en el estadio larvario del parásito. Esto se hizo mediante el escrutinio de una biblioteca de ADNc del estadio larvario construida en el fago λ gt10. Este análisis produjo como resultado la identificación de dos clonas de las 45,000 analizadas, por lo cual se puede ver que este transcrito está representado en aproximadamente un 0.005%. Esta se puede considerar una baja representación del transcrito cuando se compara con los encontrados para otras enzimas como GST, TPI o la familia de las actinas en *Taenia solium*.

La secuenciación de las dos clonas positivas obtenidas mostró que poseen una secuencia nucleotídica idéntica, diferenciándose únicamente en que una tiene una cola de Poli A más grande que la otra. La secuencia de ADNc encontrada de 919 pb codifica para una proteína de 238 aa con un peso teórico de 26.7 kDa y un pI predictivo de 10.6 (Figura 8) que es idéntica a la que codifica el gen obtenido. El pI esta dentro de lo esperado, puesto que a pH

fisiológico dicha proteína tendría una carga positiva, la cual es la que se necesita para unir al ADN.

Usando la secuencia primaria de aa de la TsTBP se construyó un modelo *in silico* en el programa MOE 2007.8 para observar su conformación tridimensional (Figura 11). Se uso como modelo la TBP de *Arabidopsis thaliana*, puesto que es una de las más estudiadas y su estructura tridimensional ya ha sido resuelta por difracción de rayos X (Kim J. & Burley S., 1994). El resultado del análisis mostró que la TsTBP presenta la estructura clásica de “silla de montar”. Una de las principales diferencias encontradas es una pequeña hélice α extra en el extremo C-Ter y un extremo N-Ter más largo, lo que sugiere la interacción con factores específicos para este organismo.

La secuencia primaria de la TBP presenta los aminoácidos que la literatura reporta tienen interacción con el ADN (Figura 11, Burley S. K., 1996). Asimismo, la estructura secundaria reveló que la mayoría de los aminoácidos caen en zonas de conformación de laminas β o muy cercanas a ellas, datos que concuerdan con la estructura obtenida por difracción de rayos X de la TBP de *A. thaliana*, asimismo se encontró que todos los aminoácidos que tienen la interacción con el ADN están en la zona cóncava conformada por las 8 láminas β antiparalelas. Un alineamiento múltiple reveló que hay una identidad de 56.7% con *Arabidopsis thaliana*, 59.6% con *Candida albicans*, 59.2% con *Nicotiana tabacum*, 45% con *Schistosoma japonicum* y 72.7% con *Schistosoma mansoni* (Figura 10), (Hernandez N., 1993; Heard D., et al., 1993; Juo Z., et al., 1996). En donde la mayoría de las identidades están en el dominio C-Ter, el cual tiene la función de unir al ADN, mientras que el dominio N-Ter estas identidades son menores al 10%. El N-Ter de 46 aa de la TsTBP se encuentra dentro de lo reportado en la literatura, puesto que la TBP de *A. thaliana* tiene 19 aa y la de humano 152 aa en dicho dominio. Lo cual sugiere que este dominio podría tener interacciones con factores transcripcionales específicos para *T. solium*. Lo que es interesante ya que podría ser usado para el desarrollo de inhibidores específicos y con ello poder frenar el ciclo de vida del parásito.

Los análisis Southern y Northern blot sugieren la presencia de al menos un gene para TBP en el genoma de este parásito y la presencia de dos mensajeros en el RNA total del estadio larvario de *T. solium* (Figura 12), lo que sugiere que los transcritos pueden ser el producto de splicing alternativo o de sitios distintos de inicio de la transcripción de este gene. Por el tamaño del ADNc aislado es probable que este corresponda al ARNm de 1.0 kb.

Este es el primer trabajo sobre el proceso de transcripción en este parásito y los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad de estudiar este proceso, el cual puede ser un blanco importante para el desarrollo de nuevos fármacos para la eliminación del parásito.

VIII. Conclusiones.

- Se obtuvo la secuencia del gen que codifica para la TBP de *Taenia solium*.
- Se obtuvo el ADNc completo que codifica para la TBP de *Taenia solium*.
- El modelado molecular reveló que la TBP de *Taenia solium*:
 - a) Conserva la estructura de silla de montar característica de las TBPs.
 - b) Un N-terminal corto y específico para *T. solium*
- Se sugiere la posibilidad de splicing alternativo, no descrito en *T. solium*.

IX. Anexo.

Soluciones.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

X. Referencias.

1. Aguilar-Díaz H, Bobes R. J., Carrero J. C., Camacho-Carranza R., Cervantes C., Cevallos M.A., Dávila G., Rodríguez Dorantes M., Escobedo G., Fernández J.J., Fragoso G., Gaytán P., Garciarubio A., González V.M., González Lorena., José M.V., Jiménez L., Laclette J.P., Landa A., Larralde C., Morales-Montor J., Morett E., Ostoa-Saloma P., Sciutto E., Santamaría R.I., Soberón X., de la Torre P., Valdés V., Yáñez J. (2006). “The genome Project of *Taenia solium*”. *Parasitology International* 55: S127 – S130.
2. Butler J. E. F., Kadonaga J. (2002). “The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression”. *Genes and Development* 16: 2583 – 2592.
3. Burley S. K. (1996). “X-ray crystallographic studies of eukaryotic transcription factors”. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 351: 483 – 489.
4. Campos A., Bernard P., Fauconnier A., Landa A., Gómez E., Hernandez R., Willms K., Laclette J.P. (1990). “Cloning and sequencing of two actine genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 40(1): 87 – 93.
5. Chalkley G., Verrijzer P. (1999). “DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF_{II}250 – TAF_{II}150 complex recognizes the initiator”. *The EMBO J* 18(17): 4835 – 4845.
6. Chalut C., Gallois Y., Poterszman A., Moncollin V., Egly J M. (1995). “Genomic structure of the human TATA-box-binding protein (TBP)”. *Gene* 161: 277 – 282.
7. Correa M., Flisser-Steinbruch A., Sarti-Gutiérrez E. (1994) “Teniasis y cisticercosis”. En: Valdespino-Gómez J., Del Río-Zolezzi A., Velasco-Castrejón D., Escobar A., Ibañez-Bernal S., Magos-López E., ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México, D.F.: *Secretaría de Salud* 8:335-345.
8. Davidson I. (2003). “The genetics of TBP and TBP-related factors”. *Trends in Bio Sci* 28(7): 391 – 398.
9. Flisser A (1988). “Neurocysticercosis in Mexico”. *Parasitology Today* 4(5): 131 – 137.
10. Flisser A., Vargas-Parada L., Laclette P. (2006). “*Taenia solium*: un parásito cosmopolita”. *Investigación y Ciencia* 24-33.
11. Flisser A., Rodríguez-Canul R., Willingham III A. (2006). “Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments”. *Veterinary Parasitology* 139: 283–292.
12. Garat B., Esperón P., Picón M., Ehrilch R. (1998). “*Echinococcus granulosus*: preparation of protein extracts from protoscolex nuclei for mobility – shift assays”. *Parasitol Res* 84: 598 – 600.
13. García H., Gonzalez A., Evans C., Gilman R. (2003). “*Taenia solium* cisticercosis”. *The Lancet* 361 (8): 547 – 556.
14. Gazdag E., Rajkovic A., Torres-Padilla M E. y Tora L. (2007). “Analysis of TATA-binding protein 2 (TBP2) and TBP expression suggests different roles for the two proteins of gene expression during oogenesis and early mouse development”. *Reproduction* 134: 51 – 62.
15. Goldberg M. L. (1979). Tesis de doctorado, Universidad de Stanford. Stanford California. USA.

16. Hahn S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery". *Nature Structural & Molecular Biology* 11(5): 394 – 403.
17. Heard D., Kiss T., Filipowicz W. (1993). "Both Arabidopsis TATA binding protein (TBP) isoforms are functionally identical in RNA polymerase II and III transcription in plant cells: evidence for gene specific changes in DNA binding specificity of TBP". *The EMBO J* 12(9): 3519 – 3528.
18. Hernandez N. (1993). "TBP, a universal eukaryotic transcription factor?". *Genes & Development* 7: 1291 – 1308.
19. Herrera L., Benitez-Bibriesca L., Sotelo J., Ostrosky-Wegman P. (1999). "La quimioterapia de la cisticercosis. Revisión acerca de su farmacocinética y toxicología". *Gac Med Mex* 136 (5): 477-489.
20. Juo Z., Chiu T., Lieberman P., Baikalov I., Berk A., Dickerson R. (1996). "How proteins recognize the TATA box". *J Mol Biol* 261: 239 – 254.
21. Juven-Gershon T., Hsu J. Y., Kadonaga J.T. (2006). "Perspectives on the RNA polymerase II core promoter" *Biochemical Society Transactions* 34(6): 1047 – 1050.
22. Kadonaga J. T. (2002). "The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II". *Experimental and Molecular Medicine* 34 (4): 259 – 264.
23. Kim J., Burley S. (1994). "1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG". *Structural Biol* 1(9): 638 – 653.
24. Nikolov D., Burley S. (1994). "2.1 Å resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP)". *Structural Biol* 1(9): 621 – 637.
25. Lira-DeVitto L M., Burke T. W., Kadonaga J. T. (1995). "Structure of the genes encoding transcription factor IIB and TATA box-binding-protein from *Drosophila melanogaster*". *Gene* 153: 203 – 207.
26. Rodríguez Lima O. (2009). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
27. Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Laclette J., Sotelo J., Aluja A., Vargas L., Larralde C. (2000). "Taenia solium disease in human and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions". *Microbes and Infections* 2: 1875 – 1890.
28. Sikorski T. W., Buratowski S. (2009). "The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors". *Current Opinion in Cell Biology* 21: 344 – 351.
29. Smale S. T., Kadonaga J. T. (2003). "The RNA polymerase II core promoter". *Annu. Rev. Biochem.* 72: 449 – 479.
30. Vaca-Paniagua F. (2009). Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Vaca-Paniagua F., Parra-Unda R., Landa A. (2009). "Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*". *Parasitol Res* 105(3): 781-787.
32. Vargas-Parada L., Laclette J.P. (2003) "Gene structure of *Taenia solium* paramyosin". *Parasitol Res* 89(5): 375 – 378.
33. Villalobos-Perozo R. (2003). "Clinical manifestations in the presentation of neurocysticercosis". *Kasmera* 31(2): 80 – 85.

34. Willms K., Vargas-Parada L., Laclette J. “Biología del parásito” en: Larralde C., De Aluja A. “Cisticercosis guía para profesionales de la salud” (2008). Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura económica. 19 - 40.
35. Xiao H., Lis JT., Xiao H., Greenblatt J., Friesen JD. (1994). “The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share common element involved in transcriptional activation”. *Nucleic Acids Res.* 22: 1966 – 1973.