



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR



**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DE
Taenia solium PROCESADAS POST-TRANSCRIPCIONALMENTE
MEDIANTE *TRANS-SPLICING***

Trabajo de Grado presentado ante el área de Postgrado de la Universidad de Carabobo
para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, Mención Bioquímica y
Biología Molecular.

Presentado por la Lcda. Oswgladys Garrido.

Bajo la tutoría de la Dra. Elizabeth Ferrer.

Maracay, Noviembre 2016



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Asuntos Estudiantiles
Postgrado- Sede Aragua



ACTA DE VEREDICTO
TRABAJO DE GRADO

Nosotros miembros del jurado designado para la evaluación del Trabajo de Grado titulado:

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DE *Taenia solium* PROCESADAS
POST-TRANSCRIPCIONALMENTE MEDIANTE *TRANS-SPLICING***

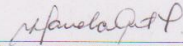
Presentado por **OSWGLADYS MARÍA GARRIDO AZUAJE** Cédula de identidad: **14.998.320**, para optar al Título de: **MAGISTER SCIENTIARUM EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

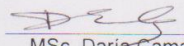
Una vez leído el trabajo por cada miembro del jurado, se fijó el día viernes 11 de noviembre de 2016 a las 2 pm., para la presentación pública. Estimamos que el mismo cumple con lo establecido en el Capítulo X, Sección Cuarta en su artículo 130 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, el cual reza: "El trabajo de grado es el resultado del estudio que demuestra la capacidad crítica, analítica, constructiva en un contexto sistémico y de dominio teórico y metodológico de la investigación aplicada en la respectiva área del conocimiento del cursante", por lo cual es: **APROBADO.**

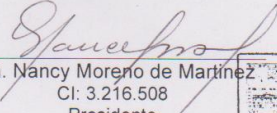
Consideramos que este trabajo representa aportes importantes en el área de Parasitología Molecular de *Taenia solium*, específicamente en el mecanismo de *Trans-splicing*, en consecuencia se otorga Mención **HONORÍFICA.**

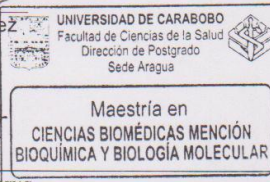
En Maracay, a los once días del mes de noviembre de 2016.

La tutora fue la Dra. Elizabeth Ferrer CI: 7.101.850


Dra. Lellys Mariela Contreras
CI: 10.146.766
Miembro Externo


MSc. Daria Camacho
CI: 9.831.961
Miembro


Dra. Nancy Moreno de Martínez
CI: 3.216.508
Presidente



..... *Luz de una tierra inmortal*

Final Av. Leonardo Ruiz Pineda, la Morita II / Sede Aragua
Teléfono: (0243) 2710569-2710296 Ext. 207

Este trabajo fue realizado en la Sección Parasitología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED) de la Facultad de Ciencias de la Salud Sede Aragua, Universidad de Carabobo, con la colaboración de la Dra. Teresa Gárate, Jefa del Laboratorio de Helmintos del Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda-Madrid). Financiado por el proyecto CDCH-UC-010610-2008.

ÍNDICE GENERAL

	Página
CAPÍTULO I	
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo General.....	3
1.2.2 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Definición de teniasis y cisticercosis.....	4
2.2. Morfología de los ténidos.....	5
2.3. Metabolismo de los ténidos.....	6
2.4. Ciclo biológico.....	7
2.5. Patología y sintomatología de la cisticercosis.....	8
2.6. Clasificación de neurocisticercosis.....	9
2.7. Epidemiología.....	9
2.8. Diagnóstico de cisticercosis.....	11
2.8.1 Diagnóstico clínico epidemiológico.....	11
2.8.2 Diagnóstico parasitológico.....	12
2.8.3 Diagnóstico por imágenes.....	12
2.8.4 Diagnóstico inmunológico.....	12
2.8.5 Diagnostico por tecnología molecular.....	14
2.10 Vacunas en cisticercosis como medida de control.....	16
2.10. Mecanismos post transcripcionales en <i>Taenia</i> sp.....	18
CAPÍTULO III	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Material biológico	21
3.1.1 Genoteca de expresión.....	21
3.1.2 Vectores de clonación.....	21
3.1.2.1 Fagos.....	21
3.1.2.2 Plásmidos.....	21
3.1.3 Cepas Bacterianas.....	21
3.2 Medios de cultivos y soluciones	22
3.2.1 Medios de cultivo de bacterias y células.....	22
3.2.3 Soluciones y tampones.....	22
3.3 Métodos	22
3.3.1 Cribado de las genotecas de expresión de cisticerco de <i>Taenia solium</i> mediante “Reacción en cadena de la Polimerasa” (PCR).....	22

3.3.2 Extracción y purificación de los productos de la PCR.....	23
3.3.3 Preparación de células competentes.....	24
3.3.4 Ligación de los productos de PCR en el plásmido de mantenimiento pGEM [®] -T-Easy.....	24
3.3.5 Transformación de las células competentes <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'.....	24
3.3.6 Selección de las células transformadas.....	25
3.3.7 PCR de colonias para verificar los fragmentos clonados y estimar el tamaño de los mismos.....	25
3.3.8 Extracción y purificación de los plásmidos recombinantes.....	26
3.3.9 Secuenciación.....	26
3.3.10 Análisis bioinformático de las secuencias.....	27

CAPÍTULO IV

RESULTADOS	28
4.1. Cribado de las genotecas de expresión de cisticerco de <i>Taenia solium</i> mediante PCR.....	28
4.2. PCR de colonias para verificar los fragmentos clonados y estimar el tamaño de los mismos.....	28
4.3. Secuenciación de los fragmentos clonados. Análisis y comparación de las secuencias con las secuencias de los bancos de datos.....	29
4.4. Caracterización Molecular.....	32
4.4.1. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°1.....	32
4.4.2. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°2.....	36
4.4.3. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°3.....	40
4.4.4. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°4.....	45
4.4.5. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°5.....	48
4.4.6. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°6.....	52
4.4.7. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°7.....	56
4.4.8. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°8.....	59
4.4.9. Análisis de la secuencia N°9.....	63
4.4.10. Análisis de la secuencia N°10.....	67
4.4.10. Análisis de la secuencia N°11.....	71
4.4.10. Análisis de la secuencia N°12.....	74
4.4.11. Análisis de la secuencia N°13.....	79
4.4.12. Análisis de la secuencia N°14.....	80

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN	81
5.1 Estrategia de clonación.....	81
5.3 Análisis bioinformático de las secuencias de los ADNc clonados..	82

CAPÍTULO VI	
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	98

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Página
1. Cebadores a utilizar en el cribado de las genotecas de expresión por PCR.....	23
2. Cebadores utilizados en la PCR de colonias.....	25
3. Clones aislados de las genotecas de expresión de metacestodos de <i>T. solium</i> mediante PCR- <i>Spliced Leader</i>	30
4. Similitud de la secuencia del grupo N° 1 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	35
5. Similitud de la secuencia del grupo N°2 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	38
6. Similitud de la secuencia del grupo N°3 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	42
7. Similitud de la secuencia del grupo N°4 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	46
8. Similitud de la secuencia del grupo N°5 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	50
9. Similitud de la secuencia del grupo N°6 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	54
10. Similitud de la secuencia del grupo N° 7 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank)	57
11. Similitud de la secuencia del grupo N° 8 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	61
12. Similitud de la secuencia N° 9 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).	65
13. Similitud de la secuencia N°10 con la depositada en los bancos de datos (GenBank).....	70
14. Similitud de la secuencia N°11 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	73
15. Similitud de la secuencia N°12 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	77
16. Similitud de la secuencia N°13 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank).....	78
18. Identificación de las secuencias	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Página
1. Escólex de <i>T. solium</i> y de <i>T. saginata</i>	5
2. Proglótides grávidas de <i>T. saginata</i> y de <i>T. solium</i>	6
3. Huevo de <i>Taenia sp.</i>	6
4. Cisticercos de <i>T. solium</i>	6
5. Ciclo biológico de las especies del género <i>Taenia</i>	8
6. Diferente ubicación de cisticercos en el sistema nervioso central.....	9
7. Endemicidad de <i>T. solium</i> en el mundo	11
8. Glicoproteínas de bajo peso molecular.....	14
9. Mecanismo de <i>trans-splicing</i>	19
10. Representación de la ubicación de los cebadores SL-D y T7 en el vector Uni-ZAP XR	23
11. Representación esquemática del vector de mantenimiento pGEM [®] -T-Easy, y esquema de la ligación de los productos de PCR en el vector pGEM [®] -T Easy.....	24
12. Productos de PCR del cribado de la genoteca de expresión mediana de cisticerco de <i>T. solium</i>	28
13. Identificación por PCR de las colonias recombinantes	29
14. Alineamiento múltiple de secuencia de ADNc del grupo N°1.....	33
15. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°1.....	34
16. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°1.....	34
17. Estructura secundaria del grupo N°1	35
18. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°1 con los homólogos más cercanos.....	36
19. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°2.....	37
20. Ubicación del dominio DUF 2615 en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°2.....	37
21. Aminoácidos susceptibles a fosforilación y a N-glicosilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N° 2.....	38
22. Estructura secundaria del grupo N°2.....	39
23. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°2 con los homologas cercanos.....	40
24. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°3.....	41

25. Aminoácidos susceptibles a fosforilación y a N-glicosilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N° 3.....	41
26. Topografía del dominio de familia de proteínas receptores de renina de la proteína deducida del grupo N°3.....	41
27. Predicción de segmento transmembrana en la secuencia aminoacídica deducida del clon N°3	42
28. Estructura secundaria del grupo N°3	42
29. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°3 con los homologas cercanos.....	44
30. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°4.....	45
31. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°4,.....	46
32. Topografía del dominio de familia de proteínas RhoGAP en la proteína deducida del grupo N°4.....	46
33. Predicción de segmento transmembrana en la secuencia aminoacídica deducida del clon N°4	46
34. Estructura secundaria del grupo N°4.....	47
35. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°4 con los homologas cercanos.....	48
36. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°5.....	49
37. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5.....	49
38. Ubicación del dominio KOW_RPL26 en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5.....	50
39. Estructura secundaria del grupo N°5 '.....	50
40. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5 con los homologas cercanos.....	51
41. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°6.....	52
42. Aminoácidos potenciales a fosforilación y a N-glicosilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°6.....	53
43. Ubicación del Dominio YjeF_N en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°6.....	53
44. Estructura secundaria del grupo N°6	54
45. Estructura tridimensional de la proteína truncada deducida N°6.....	54
46. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°6 con los homologas cercanos.....	55
47. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°7.....	56
48. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°7.....	57
49. Ubicación del dominio NDK en la secuencia aminoacídica	

deducida del grupo N°7.....	57
50. Estructura secundaria de la proteína deducida del grupo N°7	57
51. Estructura tridimensional de la proteína deducida N°7.....	58
52. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°7 con los homologas cercanos.....	59
53. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc del grupo N°8.....	60
54. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°8.....	60
55. Predicción de segmento transmembrana y péptido señal en la secuencia aminoacídica del grupo N°8.....	61
56. Estructura secundaria de la proteína deducida del grupo N°8.....	61
57. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°8 con los homologas cercanos.....	62
58. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc de la secuencia N°9	64
59. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°9.....	65
60. Ubicación de los Dominios HEAT en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°9,.....	65
61. Estructura secundaria de la proteína deducida de la secuencia N°9..	65
62. Estructura tridimensional de la proteína deducida N°9.....	66
63. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°9 con los homologas cercanos.....	67
64. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc de la secuencia N°10.....	68
65. Aminoácidos potenciales a fosforilación y a N-glicosilación en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°10.....	69
66. Predicción de segmento transmembrana en la secuencia aminoacídica de la secuencia N°10.....	69
67. Estructura secundaria de la proteína deducida de la secuencia N°10	70
68. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°10 con los homologas cercanos.....	71
69. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc de la secuencia N°11.....	72
70. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°11.....	72
71. Predicción de segmentos transmembrana en la secuencia aminoacídica de la secuencia N°11.....	72
72. Estructura secundaria de la proteína deducida de la secuencia N°11	73
73. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°11 con los homologas cercanos.....	74
74. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc N°12...	75
75. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc N°12..	76
76. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia	

aminoacídica deducida N°12.....	76
77. Ubicación del dominio COQ9 en el extremo carboxilo de la secuencia aminoacídica deducida N°12.....	76
78. Estructura secundaria de la proteína deducida N°12.....	77
79. Modelo de posible estructura tridimensional de la proteína deducida N°12.....	77
80. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°12 con los homólogos cercanos.....	78
81. Secuencia nucleotídica del ADNc de la secuencia N°13.	79
82. Secuencia nucleotídica de ADNc de la secuencia N°14.....	80

Tabla de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADNc	ADN complementario
ADNr	ADN ribosomal
AgB	Antígeno B
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> , siglas en inglés
CAG	Antígeno circulante
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
E/S	Excreción Secreción
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
ITS1	Espaciador intergénico 1, del inglés <i>Intergenic Transcribed Spacer</i>
LB	Luria Bertani
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NCC	Neurocisticercosis
NDK	Nucleosido Difosfato Kinasa
OPS	Organización Panamericana de la salud
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
RhoGAP	de proteína activadoras de GTPasa asociada a Rho
RMN	Resonancia magnética nuclear
SL	Spliced Leader
SNC	Sistema nervioso central
OMS	Organización mundial de la salud
TAC	Tomografía axial computarizada
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

RESUMEN

La neurocisticercosis es una enfermedad neurológica causada por la presencia de cisticercos de *Taenia solium* en el sistema nervioso central. En *T. solium*, ocurre un mecanismo alternativo en el procesamiento de algunos ARNm, denominado *trans-splicing*, en el cual una pequeña molécula de ARN (*Spliced Leader*, SL) es añadida al extremo 5' de una molécula de pre-ARNm, formando diferentes ARNm maduros que contienen un extremo 5' común. El objetivo de este trabajo fue clonar y caracterizar moléculas de cisticercos de *T. solium* procesadas post-transcripcionalmente mediante *trans-splicing*, para conocer sobre este mecanismo post-transcripcional en *T. solium*, cuáles moléculas lo llevan a cabo y la posible relación entre ellas y como podrían intervenir en la relación parásito-hospedador. Para ello, se realizó un cribado mediante PCR a partir de genotecas de expresión de cisticerco de *T. solium* utilizando como cebador directo SL y como reverso T7 que hibrida con la secuencia del vector posterior al sitio de policlonaje. Se obtuvieron diferentes ADNc, que fueron clonados en el plásmido pGEM-T-*easy*, secuenciados y analizados mediante diversos programas bioinformáticos, además de ser comparados con las bases de datos existentes (GenBank/EMBL/DDBJ). Un total de 14 moléculas diferentes fueron obtenidas, las cuales muestran similitud con proteínas de parásitos cercanos evolutivamente, de diferentes especies de los géneros *Taenia*, *Echinococcus*, *Hymenolepis* y *Schistosoma*. Se obtuvieron transcritos completos que codifican una variedad de proteínas que forman parte de la biología propia de organismos vivos como enzimas, transportadores, proteínas estructurales, etc. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que este mecanismo pudiese haberse originado de un ancestro común, además el análisis de las secuencias permitió describir las diferentes distancias existente entre la secuencia del cebador SL y el ATG de inicio, y conocer que aparentemente el proceso de *trans-splicing* en *T. solium* no está asociado a genes específicos, ni a familias multigénicas, ni a localización subcelular, ni a estadios de vida específicos, tal y como ha sido reportados en otros platelmintos.

Palabras clave: bioinformática, clonación, secuenciación, *spliced leader*, *T. solium*.

CLONING AND CHARACTERIZATION OF *Taenia solium* MOLECULES POST-TRANSCRIPTIONALLY PROCESSED BY TRANS-SPLICING

ABSTRACT

Neurocysticercosis is a neurological disease caused by the presence of cysticerci of *Taenia solium* in the central nervous system. *T. solium*, an alternative mechanism occurs in the processing of some mRNAs, called trans-splicing, in which a small RNA molecule (Spliced Leader, SL) is added to the 5' end of one molecule of pre-mRNA, forming different mature mRNAs containing a common 5' end. The aim of this work was to clone and characterize molecules of cysticerci of *T. solium* processed post-transcriptionally by trans-splicing, to know about this post-transcriptional mechanism in *T. solium*, which molecules carry it out and the possible relation between them and how they could intervene in the parasite-host relationship. For this purpose, a PCR screening was performed from *T. solium* cysticercos expression libraries using as a direct primer SL and as a reverse primer T7 which hybridizes to the sequence of the vector following the polyclination site different cDNAs, which were cloned into the pGEM-T-easy plasmid, were sequenced and analyzed through various bioinformatic programs, in addition to being compared with existing databases (GenBank / EMBL / DDBJ). A total of 14 different molecules were obtained, which show similarity to proteins of evolutionarily close parasites, of different species of the genus *Taenia*, *Echinococcus*, *Hymenolepis* and *Schistosoma*. Complete transcripts were obtained that encode a variety of proteins that are part of the proper biology of living organisms such as enzymes, transporters, structural proteins, etc. All these results support the hypothesis that this mechanism could have originated from a common ancestor, in addition the analysis of the sequences allowed to describe the different distances existing between the sequence of the primer SL and the ATG initiation, and to know that apparently the process of trans-splicing in *T. solium* is not associated to specific genes, nor to multigenic families, nor to subcellular localization, nor to specific stages of life, as it has been reported in other flatworms.

Key words: bioinformatics, cloning, sequencing, spliced leader, *T. solium*.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La teniasis es una infección parasitaria intestinal producida por la fase adulta de *Taenia saginata* o *Taenia solium* en la cual el hombre es el único hospedador definitivo. La cisticercosis ocurre como consecuencia de la infección por el estado larvario del parásito (cisticerco o metacestode) en hospedadores intermediarios. El cisticerco de *T. saginata* (*Cysticercus bovis*) provoca la cisticercosis bovina y el cisticerco de *T. solium* (*Cysticercus cellulosae*) causa la cisticercosis porcina y humana, ya que el hombre también puede accidentalmente convertirse en hospedador intermediario de *T. solium* cuando ingiere accidentalmente los huevos (Botero y Restrepo, 2012).

Cuando los cisticercos invaden el Sistema Nervioso Central (SNC) del hombre produce una enfermedad denominada neurocisticercosis (NCC), que en la actualidad representa un serio problema de salud pública, no solo en países en desarrollo de América, África y Asia, sino también en los Estados Unidos de América y en algunas naciones europeas que, como España, han experimentado un movimiento migracional masivo de personas proveniente de áreas endémicas (Giménez-Roldán y col., 2003). En Venezuela, existen pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad; sin embargo los últimos datos publicados señalan que la transmisión se encuentra activa en algunas zonas rurales del país (Ferrer y col., 2002, 2003a, 2005; Cortez y col. 2010)

El diagnóstico de la Teniasis se realiza generalmente por métodos coprológicos, pero estas técnicas presentan baja sensibilidad y especificidad, ya que no siempre están presentes los huevos en el material fecal y son morfológicamente iguales en ambas especies (*T. solium* y *T. saginata*) por lo que no se puede realizar distinción a través de la observación de los huevos (Ferrer, 2006). Las técnicas de neuroimágenes, tales como Tomografía Axial Computarizada (TAC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), son útiles para el diagnóstico de neurocisticercosis, pero la infección puede pasar desapercibida cuando el número de cisticercos es bajo o las imágenes no son concluyentes. Por otro lado, estas técnicas son muy costosas y de difícil acceso en la mayoría de las áreas donde la cisticercosis es endémica (Del Brutto y col., 2001)

Las técnicas de inmunodiagnóstico incluyen la detección de antígenos circulantes del parásito y de anticuerpos anti-cisticerco tanto en suero como en líquido céfalo-raquídeo (LCR) y resultan de gran utilidad para la identificación de cisticercosis (Del Brutto, 2005); sin embargo, estas pruebas carecen de la adecuada sensibilidad y especificidad debido a la gran reactividad cruzada con otras parasitosis (Gottstein y col., 1987). Con base a esto se ha trabajado con antígenos purificados, como las glicoproteínas, exhibiendo muy buena sensibilidad y especificidad (Tsang y col., 1989), al igual que con los antígenos de excreción/secreción (E/S) de cisticercos de *T. solium* (Ng y Ko, 1994), pero la purificación de éstos antígenos requiere gran cantidad de material parasitario, de difícil obtención, y de equipos sofisticados y técnicas laboriosas, por lo que se ha recurrido a la tecnología de ADN recombinante para la clonación de las moléculas de interés diagnóstico (Ferrer, 2007).

En *T. solium*, al igual que en otros parásitos, ocurre un mecanismo alternativo en el procesamiento de algunos ARNm, denominado *trans-splicing*, en el cual una pequeña molécula de ARN conocida como *Spliced Leader* (SL) es añadida al extremo 5' de una molécula de pre-ARNm, formando diferentes ARNm maduros que contienen un extremo 5' común (Martínez-Calvillo y col., 2010).

Debido a las limitaciones que presenta el diagnóstico, además del interés en el estudio de este mecanismo y de cuales moléculas lo poseen, en el presente trabajo se clonó y caracterizó moléculas que utilizan este procesamiento post-transcripcional mediante la búsqueda en una genoteca de expresión de *T. solium* empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), utilizando como cebador la secuencia *Spliced Leader* y una secuencia específica del vector, a fin de proporcionar mediante técnicas de ADN recombinante, moléculas nuevas; con potencial para ser empleadas como antígenos en ensayos inmunoenzimáticos o que provean información sobre moléculas desconocidas hasta ahora, involucradas en la relación parásito-hospedador. Otra posible utilidad, sería identificar probables blancos terapéuticos por estar involucrados en vías metabólicas claves para el parásito y diferentes a las del humano, en el cual no ocurre esta modificación post-transcripcional. Además, la clonación de estas moléculas puede contribuir al estudio sobre la identificación de las características en común que presentan los ARNm que utilizan esta modificación post-transcripcional.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar moléculas de cisticercos de *Taenia solium* procesadas post-transcripcionalmente mediante el mecanismo de *Trans-Splicing*.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar selectivamente ADN complementarios (ADNc) a partir de genotecas de expresión de cisticerco de *T. solium*, mediante PCR usando como cebador la secuencia *Spliced leader*.
- Clonar las secuencias de ADNc amplificadas en la PCR-SL.
- Obtener ADN plasmídico de alta pureza a partir de los clones aislados de la genoteca de expresión de cisticerco de *T. solium* mediante PCR-SL.
- Secuenciar los ADNc de los clones purificados.
- Analizar las secuencias obtenidas empleando métodos bioinformáticos.
- Comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de datos (GenBank) de parásitos evolutivamente relacionados.

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1. Definición de teniasis y cisticercosis

La teniasis y la cisticercosis son patologías causadas por parásitos del *Phylum Plathyhelminthes*, clase *Cestoidea*, del género *Taenia* especies *solium* y *saginata*. El estadio adulto de estas especies son los responsables de la parasitosis intestinal en el hospedador definitivo (hombre) mientras que la forma larvaria ocasiona la cisticercosis en los hospedadores intermediarios (cerdo o ganado bovino). Un aspecto de suma importancia es que el hombre también puede comportarse como hospedador intermediario al ingerir por accidente, los huevos de *Taenia solium* en alimentos y aguas contaminadas; lo cual puede llegar a ocasionar una patología de mayor importancia médica si el cisticerco o metacestodes se ubica en el sistema nervioso central (SNC), conocida como neurocisticercosis (NCC) (Apt, 2013).

En estudios epidemiológicos realizados en el sureste de Asia se encontró una nueva *Taenia* infectando a aborígenes taiwaneses, por lo que fue llamada *Taenia taiwanesa*, ésta fue considerada por mucho tiempo *Taenia saginata*, pues era la especie predominante, pero fue Fan en 1988 quien notó pequeñas diferencias morfológicas y biológicas con respecto a *T. saginata*. Posteriormente, se conoció por análisis de variación de secuencias de los genes 28S ribosomales y Citocromo C Oxidasa I (COI) mitocondrial y por análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de secuencias provenientes de productos de PCR del espaciador intergénico 1 (ITS1, del inglés, *Intergenic Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal (ADNr) y COI que *T. asiática* es genéticamente distinta pero estrechamente relacionada con *T. saginata* (Bowles y McManus, 1994). *T. asiática* es morfológica y molecularmente muy similar a *T. saginata*, por lo que algunos investigadores la proponen como subespecie de *T. saginata* (Fan y col., 1995; Loos-Frank, 2000) pero biológicamente utiliza, por lo general, al cerdo como hospedador intermediario y pocas veces al ganado bovino, por lo que algunos investigadores consideran que *T. asiática* debería ser una especie aparte (de Queiroz y Alkire, 1998; Hoberg y col., 2000, Hoberg, 2002), sin embargo, su

clasificación aún es incierta y se le denomina *T. saginata asiatica*. Además, no existe ningún estudio experimental que compruebe que *T. asiática* pueda causar cisticercosis en humanos (Galán-Puchades y Fuentes, 2000).

2.2. Morfología de los ténidos

Los vermes adultos de *T. solium* pueden medir de 4 a 6 m de longitud y de 6 a 12 m los de *T. saginata*. Están conformados por tres regiones:

Escólex: es la porción anterior del parásito que le permite fijarse a la mucosa intestinal por medio de estructuras de fijación, las cuales en el caso de *T. solium* está formada por cuatro ventosas y un róstelo de doble corona de ganchos y de solo cuatro ventosas en *T. saginata* (Figura 1).

Cuello: es la región que continúa al escólex y su longitud depende de la edad del ténido, aquí ocurre el crecimiento del vermes ya que posee células germinales que originan continuamente proglótides, proceso conocido como estrobilación.

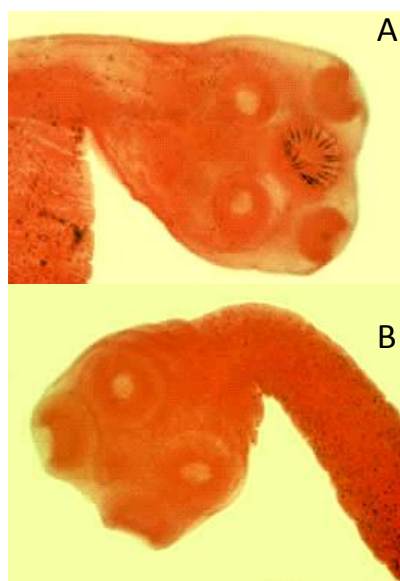


Figura 1. (A) Escólex de *T. solium*
(B) Escólex de *T. saginata*
Fuente: DPDx-imagen library

Estróbilo: también llamado cuerpo, está formado por segmentos o anillos llamados proglótides, las cuales son de tres tipos, con ubicación y características diferentes: *Proglótides jóvenes*, ubicadas cercana del cuello, son más anchas que largas y los órganos genitales están inmaduros, *Proglótides maduros*, se ubican en el medio del cuerpo, de forma más o menos cuadradas y presentan los órganos genitales maduros, con ovarios trilobulados en *T. solium* mientras que en *T. saginata* es bilobulado y *Proglótides grávidos* se encuentran en la parte posterior del cuerpo, con forma rectangular, los órganos genitales se encuentran atrofiados por el útero lleno de huevos. Se eliminan por las heces y permiten hacer la diferenciación de las especies. Las de *T. solium* son más pequeñas que las de *T. saginata* y presentan entre 5 y 13 ramificaciones uterinas, mientras que *T. saginata* más de 15 ramificaciones (Figura 2).

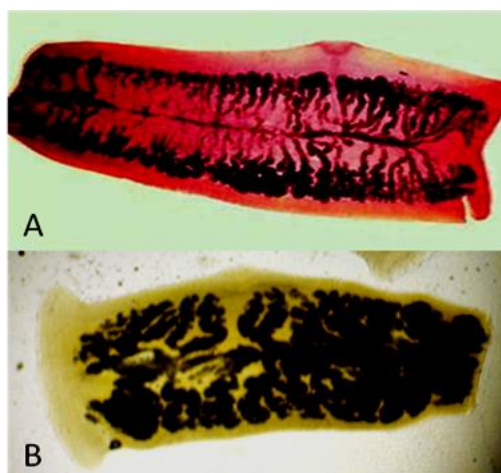


Figura 2. Proglótides grávidas de (A) *Taenia saginata* (B) *Taenia solium*. Fuente: DPDx-imagen library

Los **huevos** de estos ténidos son liberados juntos con las heces al medio exterior, solos o dentro de las proglótides. Son pequeños (30 – 40 μm), de forma esférica, de color caoba y formado por un contenido granuloso con tres pares de ganchos, que constituye el embrión hexacanto u oncósfera y una cáscara gruesa o embrióforo que rodea la oncósfera con un aspecto de corona radiada. Los huevos de ambos tenidos son morfológicamente indistinguibles; por lo que solo son llamados huevos de *Taenia sp* (Figura 3).

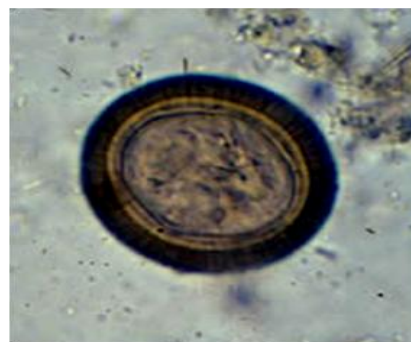


Figura 3. Huevo de *Taenia sp*
Fuente: DPDx-imagen library

El **cisticerco** o metacestode constituye la fase larvaria de los tenidos en tejido. Son quistes con forma ovalada de color blanco transparente, lleno de líquido donde se encuentra el escólex invaginado (Rey, 1993; Botero y Restrepo, 2012) Figura 4.

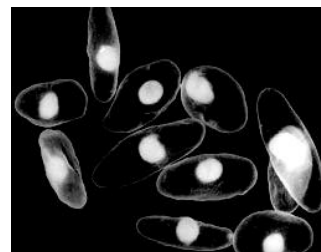


Figura 4. Cisticercos de *Taenia solium* (Laclette y Willms; página web de UNAM)

2.3. Metabolismo de los ténidos

Los ténidos al no poseer sistema digestivo deben tomar los nutrientes a partir del hospedador por medio de la absorción a través del tejido tegumentario que rodea toda la superficie de estos parásitos. La glucosa, principal fuente de energía de los ténidos, se absorbe y se almacena en forma de glucógeno principalmente en el escólex y cuello, aunque también se encuentra activa su absorción a lo largo de todo del tegumento estrobiliano. Las larvas por su parte toman los nutrientes del hospedador principalmente por medio del proceso de endocitosis (Willms y col., 2005).

El metabolismo del estadio adulto es principalmente anaeróbico debido a la ubicación de estos en el intestino donde las concentraciones de oxígeno son bajas, a diferencia de las larvas que presentan un metabolismo principalmente aeróbico, por lo tanto, el metabolismo energético de los céstodos varía de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno de su hábitat (Vinaud y col., 2007).

En los casos de concentraciones bajas de glucosa, ya sea por la baja concentración en el hospedador o por acción de algunos fármacos antihelmínticos, los ténidos presentan rutas metabólicas alternas que permiten la supervivencia del parásito. Principalmente, se encuentra como fuente de energía alterna la proveniente de la oxidación de los ácidos grasos (Vinaud y col., 2009) y la obtenida de la oxidación de la molécula de fosfato de creatina con la subsecuente producción de creatinina. De igual modo, se ha descrito en el cisticerco la producción de urea, ruta importante en la eliminación de desechos tóxicos como el amoníaco (Fraga y col., 2012).

2.4. Ciclo biológico

El ciclo evolutivo de *T. solium* y *T. saginata* es heteroxeno, siendo los hospedadores intermediarios el cerdo y ganado bovino, respectivamente, y el hospedador definitivo el hombre. El estadio adulto habita en el intestino delgado (yeyuno) del hombre, allí se desprenden los proglótidos grávidos repletos de huevos los cuales salen al medio exterior con las heces, contaminando de esta forma suelos, pastizales y aguas, de donde el cerdo y el ganado bovino se infecta al ingerirlos y una vez en el intestino eclosionan dejando libre al embrión hexacanto, que penetra la mucosa intestinal y alcanza la circulación, por la que son transportados a diferentes tejidos, entre ellos; músculos masticadores, lengua, corazón, ojos, diafragma, cerebro,

entre otros. En estos tejidos el embrión se invagina y forma la estructura conocida como *Cysticercus cellulosae* en el caso de *T. solium* y *Cysticercus bovis* en el caso de *T. saginata*. El hombre al ingerir la carne del animal infectado con cisticercos viables adquiere teniasis pero también puede desarrollar cisticercosis; cuando ingiere huevos de *T. solium* de alimentos y aguas contaminadas o por autoinfección (Ferrer y Gárate, 2014) (Figura 5).

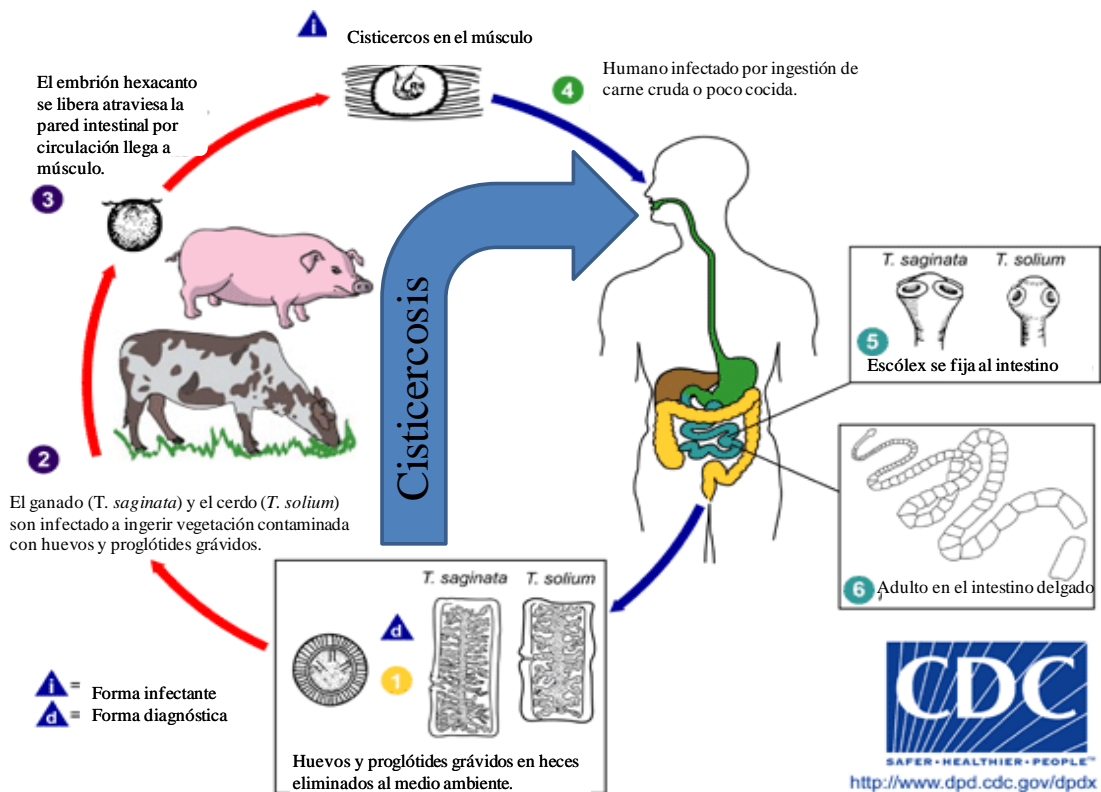


Figura 5. Ciclo biológico de las especies del género *Taenia*. Fuente: CDC (www.dpd.cdc.gov/dpdx).

2.5. Patología y sintomatología de la cisticercosis

La gravedad de la cisticercosis humana depende de la localización y número de cisticercos y de la respuesta inmunológica del hospedador. Cuando se ubica en el tejido subcutáneo o en el músculo esquelético, ocasiona nódulos que no provocan patología importante; cuando se encuentra en ojo y anexos puede llegar hasta la ceguera (Botero y Restrepo, 2012). Sin embargo, es en el SNC donde mayormente se ubica el cisticercos, causando NCC. Las principales manifestaciones clínicas de la NCC son convulsiones, pérdida de conciencia, parálisis, hipertensión intracraneana, cefalea, vómitos, ataques

epilépticos, etc; llegando en algunos casos hasta la muerte (Wallin y Kurtzke y col., 2004).

2.6. Clasificación de neurocisticercosis

La NCC ha sido clasificada en varias formas de acuerdo a la información obtenida con el uso de técnicas de neuroimágenes:

Según la viabilidad del cisticerco: Se clasifica en *NCC activa*, cuando el metacestode está vivo; *NCC transicional*, cuando el metacestode está en vías de degeneración; *NCC inactiva*, cuando está calcificado y *NCC mixta*, cuando se encuentra una mezcla de los estados anteriores en un paciente (Del Brutto, 2005).

Según la ubicación pueden ser: *Parenquimal* de tamaño pequeño y localización más frecuente; se ubican en el parénquima cerebral principalmente en la corteza cerebral y ganglios basales debido a la gran vascularización de estas áreas y *Extraparenquimal* que incluye espacio subaracnoideo principalmente ubicado en los surcos ventriculares o en las cisternas del LCR, sistema ventricular localizado de preferencia en el IV ventrículo o flotando libremente en las cavidades ventriculares y médula espinal o parénquima medular (Mao y col., 2015) (Figura 6).

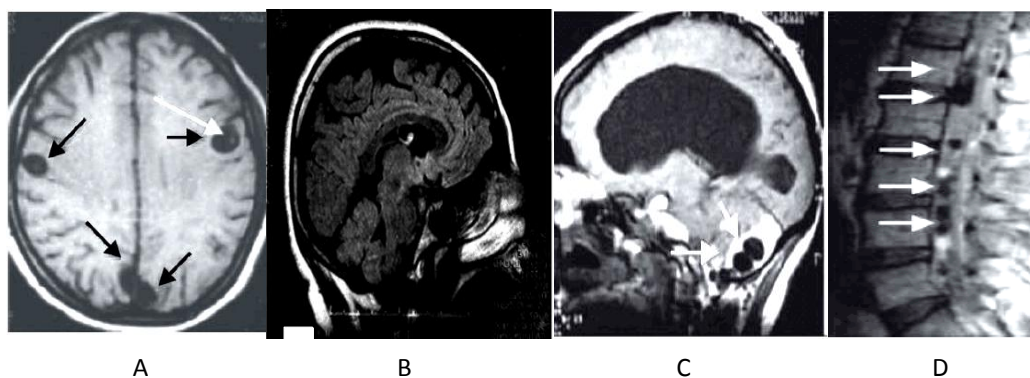


Figura 6. Diferente ubicación de cisticercos en el sistema nervioso central. (RMN) (A) Parenquimal (B) En el espacio subaracnoideo (C) En el sistema ventricular (D) En la médula espinal (Malagón Valdez, 2009).

2.7. Epidemiología

La teniasis y la cisticercosis son endémicas en áreas rurales de muchos países de Latinoamérica, Asia y África donde las condiciones socioeconómicas y sanitarias no son adecuadas (Figura 7) (Sarti y col., 1997; García y col., 2001; Takayanagui y Leite 2001; Ferrer y col., 2002, 2003a, 2005) y donde existen mayores factores de riesgos

para contraer estas enfermedades. En una revisión publicada en un artículo en el 2015, tomando en cuenta 39.271 participantes, provenientes de 19 países de África, Asia y Latinoamérica se encontraron seroprevalencias de 17,4 %, 15,7 % y 13 % respectivamente, lo que demuestra la elevada distribución mundial de la enfermedad (Coral-Almeida y col., 2015). Además de los problemas de salud que ocasiona la cisticercosis, ésta provoca importantes pérdidas económicas en la industria porcina y bovina de estas regiones (González y col., 2003; Flisser y col., 2003).

En varios países de Europa y en los Estados Unidos la cisticercosis se ha vuelto un problema de salud, debido a la creciente inmigración de personas provenientes de áreas endémicas, los cuales pueden llevar el parásito hasta nuevos lugares donde la enfermedad no existía o estaba controlada (Gimenez-Roldán y col., 2003; Schantz y Tsang, 2003; Zammarchi y col., 2013; Valadas y col., 2015, Bock y col., 2015).

T. saginata asiática ha sido encontrada generalmente países asiáticos, tales como: Filipinas, Korea, China, Japón, Indonesia, Taiwán y Tailandia (Eom y col., 2009) y aun se investiga sobre la posibilidad de que cause cisticercosis humana (Galán-Puchades y Fuentes, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima 50 millones de personas afectadas y más de 50.000 muertes al año debida a neurocisticercosis en el mundo (Figura 7) y es considerada la principal parasitosis del sistema nervioso central y la causa principal de epilepsia adquirida (Román y col., 2000). El hecho de no ser obligatorio denunciar los casos de Teniasis/Cisticercosis en muchos países latinoamericanos, unido la escasa atención de la comunidad médica hacia esta parasitosis y la falta de disponibilidad de recursos diagnósticos en los servicios médicos rurales, origina un marcado sub-registro de casos. En la actualidad, la cisticercosis significa un serio obstáculo para el desarrollo socioeconómico y la calidad de vida en países endémicos por lo que ha sido incluida dentro de las *Neglected Diseases*. (OMS, 2002, 2015, 2016).

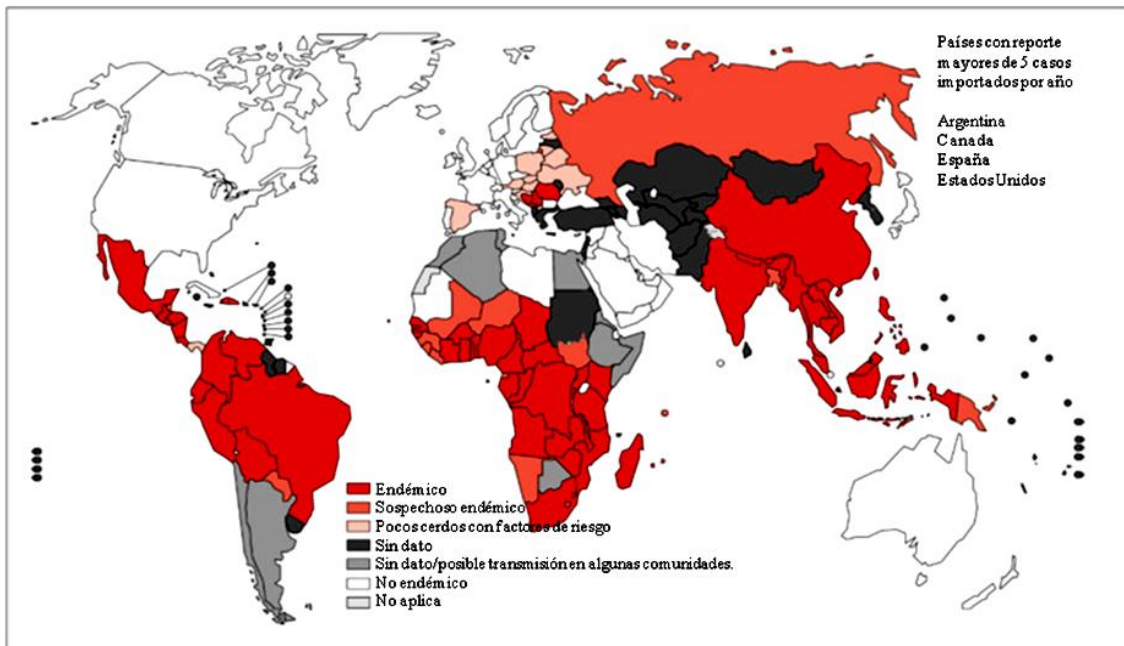


Figura 7. Endemicidad de *T. solium* en el mundo (OMS, 2015).

En Venezuela se han realizado pocos estudios epidemiológicos que permitan conocer la prevalencia real de la enfermedad. Debido a los diferentes estudios de los diversos grupos de investigación en el área, se sabe que el binomio teniasis/cisticercosis se encuentra en varias comunidades (principalmente rurales) de los estados Lara, Cojedes, Carabobo, Yaracuy, Mérida, Táchira, Sucre, Amazonas, Zulia y Anzoátegui (Alarcón de Noya y Colmenares 2002; Ferrer y col., 2002, 2003a, 2005; Guzmán y col., 2004; Meza y col., 2005; Villalobos-Perozo y col. 2007; Cortez y col., 2010; Freitas y col., 2015; Toquero y col., 2016) con seroprevalencias que van desde 3,3 % hasta 79% indicando que estas áreas la transmisión se encuentra activa y probablemente en muchas otras comunidades del país, por lo que existe la necesidad de establecer programas tanto de diagnóstico, como control de estas enfermedades.

2.8. Diagnóstico de cisticercosis

2.8.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico

En el diagnóstico de la cisticercosis hay que tener en cuenta la clínica del paciente y sus antecedentes epidemiológicos, sin embargo el diagnóstico clínico generalmente se ve limitado ya que los síntomas no son específicos. Los antecedentes epidemiológicos del paciente son importantes, sin embargo, no se descarta el riesgo de

la enfermedad si el paciente no es de áreas endémicas ya que se ha demostrado la infección en personas que nunca han estado en estas zonas (Bock y col., 2015).

2.8.2. Diagnóstico parasitológico

La demostración directa del parásito generalmente se realiza por hallazgos ocasionales en autopsias y por medio de biopsias, que es un procedimiento invasivo (Schantz y col., 1992). Los cisticercos localizados en el globo ocular pueden observarse mediante un examen oftalmológico; mientras que en el músculo esquelético y tejido subcutáneo puede identificarse por la palpación de los nódulos (Becerril, 2011).

2.8.3. Diagnóstico por imágenes

Las técnicas de neuroimágenes como la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) son las técnicas recomendadas, debido a que ofrecen gran información sobre el número, ubicación y estado de viabilidad de los cisticercos, y también sobre el grado de inflamación del área afectada. Sin embargo, las imágenes muchas veces no son concluyentes y la infección puede pasar desapercibida cuando el número de cisticercos es bajo. Por otro lado, la poca accesibilidad y el alto costo reducen su aplicación en zonas rurales, en donde por lo general, la cisticercosis es endémica (García y Del Brutto, 2003; Del Brutto, 2005).

2.8.4. Diagnóstico inmunológico

Los ensayos de inmunodiagnóstico han cobrado importancia, sobre todo en áreas endémicas donde las técnicas de neuroimágenes son generalmente inaccesibles. El avance en la producción de distintas técnicas inmunodiagnósticas ha contribuido enormemente a obtener resultados seroepidemiológicos más confiable (Dorny y col., 2003). Se han desarrollado diferentes ensayos basados en la captura de antígenos o en la detección de anticuerpos anti-cisticerco, en suero o en LCR (Larralde y col., 1990; Proaño-Narvaez y col., 2002). Una prueba de inmunodiagnóstico positiva puede confirmar una imagen sugestiva de neurocisticercosis, un caso sospechoso por sintomatología compatible o datos epidemiológicos que indique el contacto de la persona con el parásito (Del Brutto y col., 2001; Del Brutto, 2005). Entre las técnicas utilizadas se han descrito:

- *Captura de antígeno circulante del parásito*

En 1989, Harrison y col. crearon una prueba de ELISA usando un anticuerpo monoclonal contra glicoproteínas de superficie y secreción de *T. saginata*. Esta técnica ha sido utilizada en estudios epidemiológicos en nuestro país (Ferrer y col., 2002, 2003a). Igualmente se evaluó un anticuerpo monoclonal contra antígeno circulante (CAg) de *T. solium*, en un ensayo de ELISA y empleando LCR de pacientes con neurocisticercosis; obteniéndose buenos resultados. CAg no fue encontrado en las muestras de LCR de pacientes con cisticercos calcificados ni con otras enfermedades, permitiendo el diagnóstico de cisticercosis activa (Wang y col., 1992). También se evaluó la reactividad de un anticuerpo monoclonal contra el fluido vesicular de *Taenia crassiceps*, demostrando que existe reacción cruzada del anticuerpo contra antígenos de 8-12, 14 y 18 kDa de *T. solium* (Espíndola y col., 2000).

- *Detección de anticuerpos anti-cisticerco*

La detección de anticuerpos indica exposición a la infección y no necesariamente una infección activa, ya que los anticuerpos persisten por años luego que el parásito ha muerto. (Harrison y col., 1989; García y col., 1997). En zonas endémicas, la población puede mantenerse seropositiva por cierto tiempo y no presentar la enfermedad activa, por lo cual no se refleja en los ensayos inmunológicos basados en la captura de anticuerpos, la verdadera prevalencia de la enfermedad (García y col., 2001).

Entre los antígenos más usados para el diagnóstico están el extracto crudo y fluido vesicular del parásito (Espinoza y col., 1986; Larralde y col., 1986), sin embargo, suelen presentar baja especificidad ya que existe reacción cruzada con otros helmintos (*Echinococcus*, *Hymenolepis*, *Schistosoma* y *Filarias*) y la sensibilidad depende del número de cisticercos presentes en el sistema nervioso de las personas; ya que se ha demostrado que la sensibilidad aumenta en sueros de personas con múltiples cisticercos en comparación con los sueros de pacientes con un único cisticerco en el SNC (Gottstein y col., 1987). Por ello, se ha buscado la purificación de antígenos específicos del parásito que puedan mejorar la especificidad diagnóstica; entre los que se les atribuye mejores resultados están: los antígenos de bajo peso molecular de cisticerco de *Taenia solium*, la molécula de Paramiosina, glicoproteínas y antígenos de E/S (Ferrer, 2006).

En 1986 Flisser y col. demuestran que el antígeno B (AgB) de cisticerco de *T. solium* es el de mayor reconocimiento por sueros de pacientes con neurocisticercosis. Posteriormente Laclette y col., en 1991, demuestran que este AgB es homólogo con la proteína Paramiosina de *Schistosoma mansoni*, y además sueros preparados contra AgB reconocen epitopos en la proteína recombinante Paramiosina de *S. mansoni*.

La Organización Panamericana de La Salud (OPS) recomienda como método inmunológico para el diagnóstico de neurocisticercosis el ensayo de EITB usando siete glicoproteínas de metacestodes de *T. solium* (GP50, GP42-39, GP24, GP21 GP18, GP14 y GP13) (Figura 8) purificadas por cromatografía de afinidad, con el uso de estos, los ensayos obtuvieron 98% de sensibilidad y 100% de especificidad y la sensibilidad no se vio afectada por la localización del cisticerco en el SNC (Tsang, y cols. 1989). Este ensayo ha sido muy usado por diferentes investigadores (Rodríguez-Canul y col., 1997; Restrepo y col., 2001; Gomes y col., 2007).

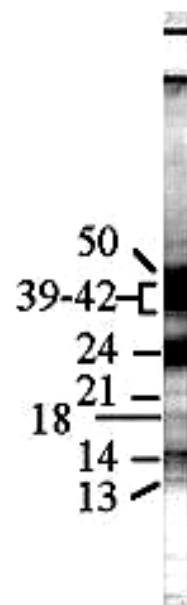


Figura 8.
Glicoproteínas de bajo peso molecular.

Aunque se han desarrollados numerosos antígenos purificados, como los mencionados anteriormente, con muy buena especificidad, el proceso de purificación de estos requiere equipos sofisticados, técnicas laboriosas y una gran cantidad de material parasitario que es de difícil obtención. Por ello se han utilizado antígenos recombinantes para ser usados en ensayos inmunológicos (Ferrer, 2007).

2.8.5. Diagnóstico por tecnología molecular

- *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

En el año 2006 Almeida y col., demuestran por primera vez que el ADN del parásito se puede encontrar en LCR y que se puede amplificar por PCR, empleando esta técnica para el diagnóstico molecular de neurocisticercosis. Posteriormente, se ha utilizado la técnica semi-nested PCR basada en la amplificación de la secuencia HDP2 usando como muestra LCR, para el diagnóstico de neurocisticercosis (Hernández y col., 2008). Además, la técnica de PCR en tiempo real ha permitido la confirmación y el

seguimiento de casos de neurocisticercosis (Yera y col., 2011). En un estudio comparando diferentes técnicas de diagnóstico empleando LCR, se encontró una mayor sensibilidad (95,9%) en la técnica de PCR basada en la amplificación de la secuencia repetitiva Tsol9 de *T. solium* (Michelet y col., 2011).

- *Antígenos recombinantes*

Son proteínas que se han obtenido tras su expresión por técnicas de ingeniería genética en un organismo heterólogo. La obtención de proteínas recombinantes constituye uno de los pilares de la biotecnología ya que se pueden obtener proteínas biológicamente activas, incluso modificadas a voluntad y en cantidades suficientes para diferentes fines (Luque y Herráez, 2001).

En los últimos años se han caracterizado, expresado y evaluado diferentes antígenos recombinantes que han tenido muy buenos resultados tanto de sensibilidad como de especificidad, entre ellos los más importantes son los que pertenecen a una familia multigénica de antígenos de 8 kDa (Chung y col., 1999; Hubert y col., 1999; Greene y col., 2000; Sako y col., 2000, Ferrer y col., 2007). Estos antígenos presentan características en común que han permitido agruparlos; son antígenos de E/S, de bajo peso molecular (7 a 18 kDa) y la mayoría de ellos son glicoproteínas que presenta alta conservación de aminoácidos que define un dominio funcional, llamado antígenos de la familia *Taeniidae* (Hancock y col., 2003; Ferrer y col., 2007, 2009, 2012).

- *Péptidos sintéticos*

Son pequeñas proteínas de secuencia determinada que se producen in vitro. Su uso evitaría la necesidad de purificación de los antígenos recombinantes y puede asegurar la reproducibilidad de los ensayos. Greene y col. en 2000, sintetizaron dos péptidos con secuencia aminoacídica completa de las glicoproteínas de metacestodes de *T. solium* (TS14 y TS18) y los evaluaron en el inmunodiagnóstico, obteniendo una sensibilidad baja pero 100% de especificidad. Por otro lado en 2003, Hancock y col., sintetizaron químicamente nueve péptidos distintos y se utilizaron en ELISA para el inmunodiagnóstico de cisticercosis; uno de estos péptidos, TsRS1, mostró 100% de sensibilidad y especificidad cuando fueron probados con sueros de pacientes con cisticercosis, enfermedades diferentes e individuos sanos.

De igual modo, se evaluaron seis péptidos sintéticos de oncósfera de *T. saginata* encontrando tres (HP6-2, TEG-1 y Ts45S-10) con relevancia en el diagnóstico de cisticercosis bovina (Ferrer y col. 2003b). Fleury y col. en el mismo año, estudiaron cinco péptidos sintéticos (HP6-3, Ts45W-1, Ts4W-5, Ts45S-10, TEG-1) de oncósfera de *T. saginata* para el diagnóstico de NCC por la técnica de ELISA usando LCR, cuya sensibilidad (93%) y especificidad (85%) más alta fueron obtenidas con los péptidos HP6-2 y Ts45W-1, respectivamente. En 2005 fueron utilizados estos cinco péptidos en el diagnóstico de la enfermedad usando sueros de personas provenientes de tres zonas geográficas de Venezuela, encontrándose buena sensibilidad y especificidad, pero observándose la existencia de patrones de reconocimientos de algunos péptidos en las distintas zonas, por lo que se sugiere realizar un pool de péptidos (Ferrer y col., 2005).

2.10. Vacunas en cisticercosis como medida de control

Como medida de control de la teniasis/cisticercosis se ha propuesto el tratamiento en masa de las poblaciones humanas. Sin embargo, esta estrategia no controla la fuente de las infecciones de tenia, la cisticercosis en los cerdos, y la transmisión del parásito puede continuar debido a la cobertura incompleta del tratamiento o a la migración de los portadores fuera de las zonas de control. Por ello, se han desarrollado posibles vacunas contra la cisticercosis en el ganado ovino, bovino y porcino y se ha propuesto una nueva estrategia para la erradicación de *T. solium*, basada principalmente en un enfoque combinado de la quimioterapia de los portadores de *Taenia* y la vacunación de los cerdos en riesgo de infección (Lightowers, 1999). Se han empleado como vacunas extractos crudos y antígenos purificados, pero debido a la dificultad en la obtención del material parasitario, se han probado vacunas recombinantes, péptidos sintéticos y vacunas de ADN.

La primera vacuna recombinante antiparasitaria efectiva fue desarrollada en el modelo oveja/*T. ovis* a través de la clonación de un gen, 45W, de una genoteca de expresión de oncosferas del parásito. El antígeno 45W mostró poseer propiedades protectoras (94%) en ensayos con ovejas (Johnson y col., 1989). En 1996, mediante cribado de una genoteca de expresión de oncosferas de *T. ovis* con suero de ovejas inmunizadas con antígenos de 16 y 18 kDa, se aislaron dos antígenos recombinantes (16k y 18k) que también fueron utilizados en ensayos de vacunación en ovinos. Estos antígenos indujeron alto nivel de inmunidad en los animales tratados (Harrison y col.,

1996). Por otra parte con el fin de desarrollar una vacuna similar a 45W contra la cisticercosis bovina, se clonaron dos ADNc de oncosferas de *T. saginata* (TSA-9, TSA-18). Estos dos genes codifican proteínas que presentan similitud con 45W (Johnson y col., 1989), 18k (Harrison y col., 1996) y HP6 (Benítez y col., 1996).

Estudios con la molécula HP6 de *T. saginata* que tiene homología con las moléculas 45W y TSA-18 utilizadas en ensayos de protección, demostraron que se trataba de una molécula de adhesión presente en la superficie y secreciones de oncosferas activadas del parásito (Bonay y col., 2002). Por otro lado, un estudio con la molécula HP6 de *T. saginata* demostró protección completa ante una infección experimental en bovinos (Harrison y col., 2005). Posteriormente, se obtuvo el homólogo en *T. solium* (Tsol18/HP6-Tsol), demostrando que compartía las mismas propiedades de HP6 (Parkhouse y col., 2008). En otro trabajo, evaluo la eficacia de dos antígenos recombinantes de oncosferas de *T. solium* (Tsol18 y Tsol45-1A), donde obtuvieron 100% de protección con ambos antígenos en 3 protocolos de vacunación independientes llevados a cabo en México y Camerún (Flisser y col., 2004). Además TSOL16, TSOL45-1A y TSOL45-1B fueron utilizados en inmunización de cerdos, obteniéndose con TSOL16 alto grado de protección (Gauci y col., 2013).

Se han realizado también varios estudios de protección utilizando péptidos sintéticos. En el modelo *T. ovis*/oveja (45WNT y 45WCT) (Dadley-Moore y col., 1999), en el modelo *T. crassiceps*/ratón (KETc1, KETc12 y KETc7, GK1, GK2 y GK3) (Toledo y col., 1999; Manoutcharian y col., 2004) obteniendo buenos resultados con los péptidos individuales o en combinaciones. Varios trabajos han demostrado que la combinación de péptidos GK1, KETc1 y KETc12, llamada S3Pvac no solo protege efectivamente contra la cisticercosis porcina, sino que también posee capacidad terapéutica reduciendo la carga parasitaria y la viabilidad de los cisticercos. Además, variaciones de S3Pvac se han evaluado en otros modelos demostrando protección (de Aluja y col., 2005; Sciutto y col., 2013).

Igualmente, se ha probado el uso de vacunas de ADN como alternativa para la inducción de inmunidad en diversos organismos. En cisticercosis, en 1998, Rosas y col, realizaron experimentos de vacunación en el modelo ratón/*T. crassiceps* con el ADNc de KETc7 en pcDNA3 y confirmaron que la inmunización confería protección.

Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de vacunación con los ADNc de los genes 45W, 18K y 16K de *T. ovis*, Tsol18 y paramiosina provocando porcentajes de protección importantes en los diferentes modelos evaluados (Drew y col., 2000; Guo y col., 2007; Wang y col., 2015).

Todos estos trabajos señalan que se han identificado un grupo de moléculas con capacidades protectoras presentes en las diferentes especies de *Taenia*, lo cual evidencia la posibilidad del uso de vacunas para el control del binomio Teniasis/Cisticercosis a corto plazo.

2.11. Mecanismos post-transcripcionales en *Taenia* sp.

Para la maduración de los preARNm de una célula eucariota se requieren varias modificaciones post-transcripcionales, entre las que se encuentra el mecanismo de *cis-splicing* o comúnmente llamado corte y empalme, donde son eliminados los intrones y unidos los exones. En este mecanismo intervienen ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn, *ribonucleoproteins small nuclear*) (U1, U2, U4, U5 y U6), factores de empalme y una sola molécula de ARN, la cual va a sufrir la modificación. Sin embargo hace más de 20 años se descubre un nuevo mecanismo de *splicing* en parásitos del género tripanosomas (Lenardo y col., 1985) y posteriormente en nematodos (Bektesh y Hirsh, 1988) trematodos (Rajkovic y col., 1990) y cestodos (Brehm y col., 2000) que coexiste con el *cis-splicing* en los organismos capaces de llevarlo a cabo, este mecanismo recibe el nombre de *trans-splicing*.

El *trans-splicing* es un mecanismo de procesamiento de algunos ARNm durante el cual una pequeña molécula de ARN (39-41 nt) conocida como *spliced leader* (SL) o mini-exón es añadido al extremo 5' de una molécula de preARNm, formando diferentes ARNm maduros que contiene un extremo 5' común. En el proceso de *trans-splicing* ocurren dos reacciones de *trans*-esterificación, similar al *cis-splicing* pero que se lleva a cabo entre dos moléculas distintas de ARN y que genera una estructura intermediaria en forma de Y en lugar de un bucle donde se elimina una secuencia del ARNm llamada outrón (Martínez-Calvillo y col., 2010).

Para que ocurra el proceso de *trans-splicing* debe producirse el ensamblaje del ayustosoma, donde participan RNPsn, factores de empalme, el pre-ARNm y el ARN-

SL, este conjunto de moléculas reconocen secuencias altamente conservadas que reciben el nombre de tracto de polipirimidina, punto de ramificación, sitio de empalme 3`AG (localizados en el pre-ARNm) y sitio de empalme 5`GU (ubicado en el ARN-SL) (Figura 9) (Liang y col., 2003).

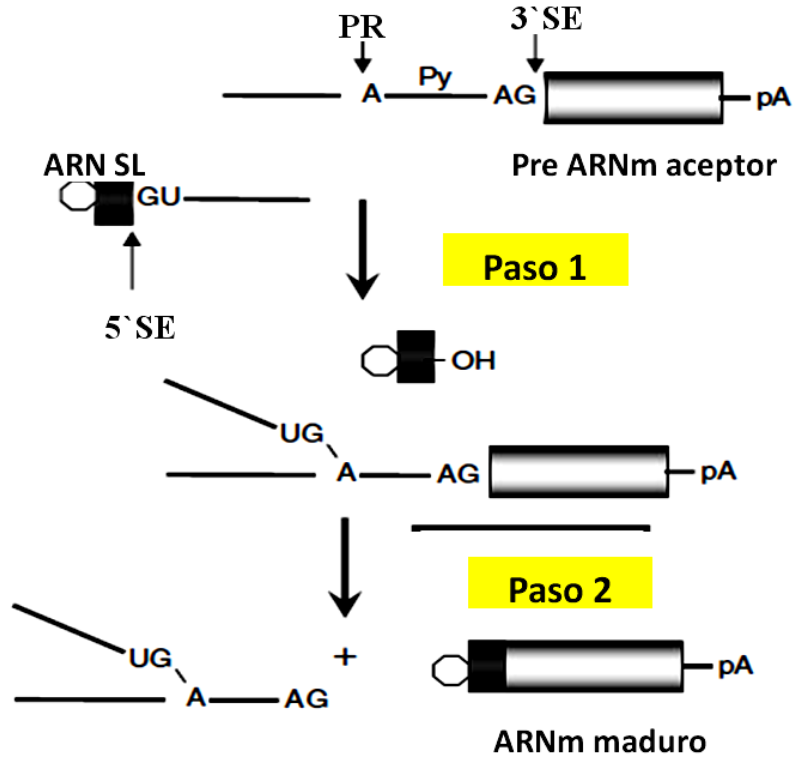


Figura 9. Mecanismo de *trans-splicing*. La reacción requiere la mayoría de los componentes del ayustosoma y ocurre en 2 pasos. El sitio de empalme 5` en ARN SL (5`SE), el sitio de empalme 3` en el ARNm aceptor (3`SE) y el punto de ramificación (PR) se indican con flechas. PR, punto de ramificación; Py, tracto de polipirimidina; pA, sitio de poliadenilación; hexágono blanco, estructura de caperuza 5` (Liang y col. 2003).

A pesar de la falta de similitud de secuencia, el SL-ARN de diferentes organismos exhiben una similitud impresionante en la estructura secundaria de pequeños ARN nucleares, que son componentes del spliceosoma y participan activamente en todos los mecanismos de empalmes (Hastings, 2005). Entonces, en todos los casos descritos hasta ahora la molécula donadora del SL es un ARNsn con estructura similar al U1 ARNsn convencional de un empalme *cis*; tiene una estructura secundaria caracterizada por tres tallos-asas separadas por regiones de cadena sencilla. A pesar que esta estructura se ha conservado a lo largo de la evolución, la secuencia y el tamaño varía de una especie a

otra. Una característica común en todos los SL es la presencia del casquete 7-metilguanosa en el extremo 5' de la molécula (Liang y col., 2003).

En el año 2002, Brehm y col. identificaron y caracterizaron el gen SL de cisticerco de *Taenia solium* mediante una PCR utilizando cebadores degenerados dirigidos contra secuencias conservadas y previamente caracterizadas 5' y 3' SL-ARNs de *Echinococcus* y trematodes, de esta forma se logró conocer la existencia y la secuencia de mini-exón de cisticercos de *T. solium*.

Dicho mecanismo puede ser de gran provecho para ser empleado como una estrategia de cribado de moléculas de ADNc completas (desde el extremo 5' SL hasta el extremo 3' poliA) mediante PCR, utilizando genotecas de expresión como ADN molde y la clonación posterior de los genes amplificados. Estos genes podrían ser utilizados para estudios mediante secuenciación, que permitan la caracterización de los genes y estudios de homologías entre especies, identificación de mutaciones, entre otros. De igual forma, se podrían utilizar para otros objetivos, tales como; expresión de proteínas recombinantes con diferentes finalidades, para diagnóstico, protección, estudios de blancos terapéuticos, estudios inmunológicos, entre otros.

Es de resaltar que el uso de este mecanismo para fines de aislamiento de moléculas de genotecas proporciona grandes ventajas al permitir la obtención de moléculas completas de forma rápida y sencilla, ya que los métodos de cribado convencional son largos, complejos y laboriosos y se pueden obtener moléculas truncadas.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Genoteca de expresión

- Genoteca de expresión de metacestode de *T. solium*

Se trabajó con una genoteca de expresión de metacestodes de *T. solium* construida en el vector Uni-ZAP XR[®] (Stratagene) mediante clonación dirigida *EcoRI* (extremo 5') y *XhoI* (extremo 3'). Según los tamaños de los ADNc clonados, se utilizaron dos genotecas amplificadas con el siguiente título (ufp, unidad formadora de placa):

Genoteca de ADNc H: $2,35 \times 10^{10}$ ufp/ml (ADNc grandes)

Genoteca de ADNc M: $2,01 \times 10^{10}$ ufp/ml (ADNc medios)

3.1.2. Vectores de clonación

3.1.2.1. Fagos

-Uni-λZAP[®] XR (Stratagene): es el vector empleado en la construcción de las genotecas de expresión de metacestodes de *T. solium*. Con este vector se puede clonar fragmentos entre 0,1 y 10 Kb. El fago Uni-λZAP[®] XR se utilizó para la clonación dirigida *EcoRI/XhoI* de los ADNc de metacestodes de *T. solium*.

3.1.2.2. Plásmidos

-*pGEM[®]-T-Easy* (Promega): Es un vector diseñado para el clonaje directo de productos de PCR purificados. Contiene los promotores T7 y SP6, limitando la región de policlonaje. Tiene un tamaño de aproximado de 3015 Kb y como marcador el gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de los clones recombinantes mediante la actividad de la β-galactosidasa.

3.1.3. Cepas bacterianas

-*E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene): Esta cepa se utilizó para la propagación y mantenimiento de todos los plásmidos recombinantes.

3.2. Medios de cultivos y soluciones

3.2.1. Medios de cultivo de bacterias y células

El medio utilizado para el cultivo de las bacterias fue LB (Luria Bertani) (Sambrook y Russel, 2001). En el caso de bacterias transformadas se le añadió el antibiótico de selección adecuado.

- Medio LB líquido: 10g/l triptona, 5g/L extracto de levadura, 5g/l NaCl, pH 7,5 (Sambrook y Russel, 2001).
- Medio LB sólido: la misma composición del medio LB líquido suplementado con 15 g/Lde agar (Sambrook y Russel, 2001).

3.2.2. Soluciones y tampones

- TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8 (Sambrook y Russel, 2001).
- TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH8 (Sambrook y Russel, 2001).
- Tampón de carga 10X: glicerol 5%, azul bromofenol 0,42% y xileno-cianol 0,42% (Sambrook y Russel, 2001).
- Solución de lisis I: ARNasa A 40 µg/ml, EDTA 10mM, Tris HCl 50 mM, pH 8.
- Solución de lisis II: NaOH 200 mM, SDS 1%.
- Solución de Neutralización: acetato de potasio 3M, pH 5.
- Tampón de desfosforilación: Tris-HCl 50mM pH 9,3; MgCl₂ 1mM, ZnCl₂ 1mM y Espermidina 1 mM.
- Tampón de ligación: Tris-HCl 30 mM pH 7,8; MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, Polientilenglicol 5% y ATP 1 mM.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Cribado de las genotecas de expresión de cisticerco de *Taenia solium* mediante “Reacción en cadena de la Polimerasa” (PCR)

En un ensayo de PCR se utilizó como cebador directo SL-D, específico del SL de *T. solium* diseñado previamente por Brehm y col. en el 2002 y como cebador reverso T7 específico del vector Uni-λZAP[®] XR (Tabla 1, Figura 10) y se utilizó como ADN molde diluciones de las genotecas de expresión de cisticercos de *T. solium* (Ferrer, 2003). Las reacciones de amplificación se realizaron en las siguientes condiciones: MgCl₂ (1,5 mM), desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) (0,2 mM), cebadores (0,5 µM), *Taq* Polimerasa Promega[®] 1U, incubados en Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM pH 9,0.

Como control positivo se utilizó la molécula M21a que contiene la secuencia SL (GenBank: AM412593.1) y como control negativo agua desionizada estéril. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (C1000, Bio-Rad) utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 52°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 5 minutos y extensión final a 72°C por 10 minutos.

Tabla 1. Cebadores utilizados en el cribado de las genotecas de expresión por PCR

Cebador	Secuencia	Tamaño	Tm
SL-D	5'-GGTCCCTTACCTTGCAATTTTGT-3'	23 nt	65,7°C
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'	21 nt	52,0 °C

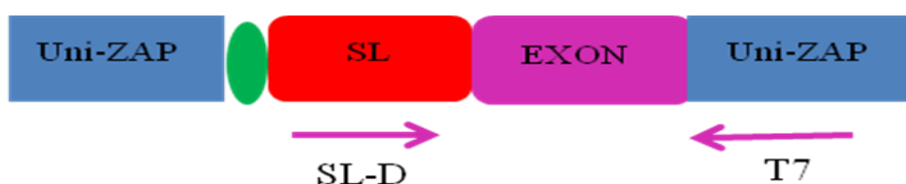


Figura 10. Representación de la ubicación de los cebadores TSSL-DW2 y T7 en el vector Uni-ZAP XR®

Posteriormente los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE y fueron teñidos con bromuro de etidio (0,1 ug/ml) (Ogden y Adams, 1987) para luego ser visualizados por el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 de Bio-Rad®.

3.3.2. Extracción y purificación de los productos de la PCR

El conjunto de bandas que se observaron producto de la PCR en el gel de agarosa fueron cortadas con ayuda de un trans-iluminador y un bisturí estéril en tres fracciones: fracción 1 (F1) las moléculas más grandes, fracción 2 (F2) las moléculas de tamaño mediano y fracción 3 (F3) las de tamaño pequeño. Luego fueron purificadas utilizando el estuche comercial Wizard® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Después el ADN eluido y solubilizado en 25 µL de agua libre de nucleasas, fue congelado a -20°C, para su posterior ligación en el plásmido de mantenimiento.

3.3.3. Preparación de células competentes

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russel (2001). A partir de las placas de LB agar/antibiótico de *E. coli* de la cepa XL1-Blue MRF' (Stratagene), se cultivó una colonia en 50 ml de LB, a 37°C y 200 rpm, hasta una OD_{600nm} de 0,5-0,7. Después se centrifugaron las células por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C, y se resuspendió el sedimento en 10 ml de CaCl₂ 100 mM a 4°C. Se centrifugaron por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 4 ml de solución CaCl₂ 100 mM más glicerol 15% a 4°C. Finalmente se colocaron 200 µl de células competentes en microtubos y se congelaron rápidamente a -80°C, hasta su uso.

3.3.4. Ligación de los productos de PCR en el plásmido de mantenimiento pGEM®-T-Easy

El vector pGEM®-T-Easy (Promega) permite la subclonación directa de los productos de PCR. Cada una de las tres fracciones de los productos de PCR una vez purificados se ligaron con el vector en la proporción 1:3 (vector:inserto) con una unidad de T4 ADN ligasa (Promega), bajo un tampón adecuado y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, durante toda la noche a 4°C. Después las células XL1-Blue MRF' fueron transformadas con la mezcla de ligación.

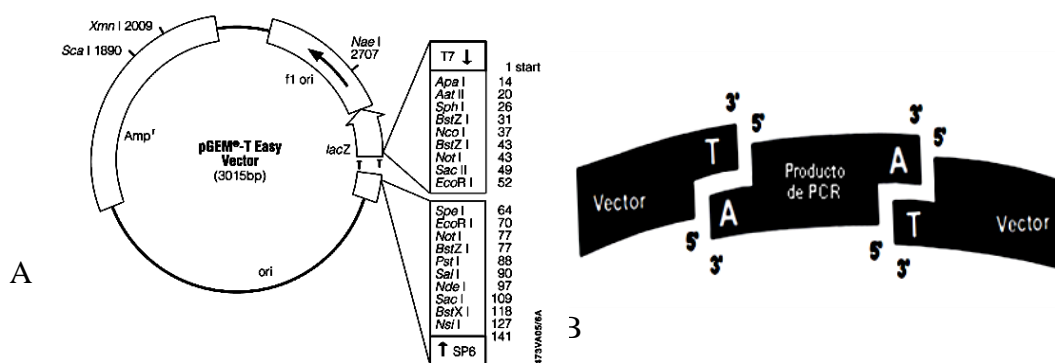


Figura 11. (A) representación esquemática del vector de mantenimiento pGEM®-T-Easy, donde se observa los cebadores T7 y SP6 delimitando la región de policlonaje, el gen de resistencia a ampicilina, el operón LacZ y el origen de la replicación. (B) Esquema de la ligación de los productos de PCR en el vector pGEM®-T Easy (manual de técnica Promega N°042).

3.3.5. Transformación de las células competentes *E. coli* XL1 Blue MRF'

Se descongelaron las células competentes y se colocaron 100 µl de las células en cada tubo de 15 ml, se añadieron los 10 µl de cada mezcla de ligación a las diferentes alícuotas de células competentes y se incubó en hielo por 30 minutos. Después se incubaron en baño de María a 42 °C, durante 60 segundos, y posteriormente en hielo

durante 2 minutos. Luego se añadieron 900 µl de medio LB precalentado a 42°C, y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación (200 rpm) (Sambrook y Russel, 2001).

3.3.6. Selección de las células transformadas

Las células transformadas fueron seleccionadas luego de agregar entre 100-300 µl del cultivo sobre una placa de agar LB/ampicilina (100µg/ml) como indicador de transformación, mas isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG, 40 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (X-Gal, 8 mg/ml) como indicador de recombinación por la identificación fenotípica de colonias blanco/azul, y se mantuvo a 37°C por toda la noche (Sambrook y Russel, 2001).

3.3.7. PCR de colonias para verificar los fragmentos clonados y estimar el tamaño de los mismos

Para verificar los fragmentos clonados en pGEM[®]-T-Easy se realizó una PCR de colonias empleando los cebadores específicos del vector SP6 y T7 (Tabla 2). Las reacciones de amplificación se realizaron bajo las siguientes condiciones: MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), cebadores (0,25 µM) y *Taq* Polimerasa Promega[®] 1U, luego se sumergió aproximadamente 10 veces una punta estéril con el contenido de la colonia blanca seleccionada como ADN molde en la mezcla de reacción (Sheu y col., 2000). Posteriormente, esta misma punta se utilizó para sembrar las bacterias de cada colonia en placas *Master* de agar LB/ampicilina (100µg/ml), para el mantenimiento de las mismas. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (C1000, Bio-Rad[®]) utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 50°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 2 minutos, y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR de colonias.

Cebador	Secuencia	Tamaño	Tm
T7-D	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	20 nt	50,8 °C
SP6-R	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'	19 nt	45,3 °C

Posteriormente los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,1 ug/ml) para luego ser visualizados por medio de un por el sistema de fotodocumentación Gel Doc 1000 de Bio-Rad[®].

3.3.8. Extracción y purificación de los plásmidos recombinantes

Para la extracción del ADN plasmídico, se realizó el protocolo de lisis alcalina “minipreparación” descrito por Sambrook y Russel en 2001, con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. Las colonias donde hubo amplificación de bandas en la PCR, se inocularon en 5 ml de medio LB/Ampicilina a 37°C durante toda la noche. Antes de hacer la extracción de ADN plasmídico, se tomaron 800 µl de cada uno de los cultivos para criopreservar las bacterias con 200 µl de glicerol estéril (proporción 1:5) y se congelaron a -80°C. El resto de cultivo se utilizó para concentrar las células por centrifugación y posteriormente realizar la lisis alcalina.

Los 4,2 ml restantes del cultivo se centrifugaron y el sedimento bacteriano se resuspendió en 200 µl de solución de lisis I, luego se añadieron 250 µl de solución de lisis II se mezcló y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 200 µl de solución de neutralización, se mezcló e incubó en hielo por 5 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugó a 14.000 rpm y se separó el sobrenadante, al cual se colocó ARNasa A (40 µg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 500 µl de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25/24/1 respectivamente, se agitó fuertemente durante 1 minuto y se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm. Luego, se separó la fase acuosa y se añadió 1 ml de etanol absoluto frío para la precipitación del plásmido y se dejó incubando a -20°C por lo menos 30 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm. Posteriormente, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó nuevamente y se secó el precipitado en el Speed Vac. Para finalizar el precipitado se resuspendió en 25µl de agua estéril y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% tenido con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) para estimar la cantidad y evaluar la calidad de los plásmido obtenidos para posteriormente ser secuenciados.

3.3.9. Secuenciación

La secuenciación de los insertos clonados en el vector pGEM[®]-T-*easy* se realizó mediante el método enzimático (Sanger y col., 1977), a partir de ADN plasmídico extraído y purificado, utilizando los cebadores universales correspondientes al vector SP6 y T7 (Tabla 2) y siguiendo el protocolo de reacción *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (ABI-3130XL, Applied Biosystems). La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

3.3.10. Análisis bioinformático de las secuencias

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en los bancos de datos GenBank/ algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990), EMBL/ algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y SWISS-PROT (Boeckman y col., 2003). Para la búsqueda del marco abierto de lectura se utilizaron los programas GENSCAN (Burge y Karlin, 1998) y Editseq del paquete DNASTar (Lasergene®), para la identificación de dominio funcionales se usaron los programas CD-Search del NCBI (Marchler-Bauer y col., 2011), InterPro del EMBL (Mulder y col., 2003) y Motif Scan de ISB-ISREC (Pagni y col., 2001). Para la identificación de péptido señal en las secuencias se empleó el programa SignalP 4.0 Server (Petersen y col., 2011). Para la identificación de proteínas de membrana se usó “DAS”-*Transmembrane Prediction server* (Cserzo y col., 1997) y TM-pred (Hofmann y Stoffel, 1993).

Los sitios potenciales de fosforilación, miristilación, acetilación y glicosilación fueron predichos por los programas NetPhos3.1 server (Blom y col., 1999), Myristoylator (Bologna y col., 2004), NetAcet 1.0 server (Kiemer y col., 2005) y NetNGlyc 1.0 server (Chauhan y col., 2013) respetivamente. La alineación múltiple de secuencias se llevó a cabo utilizando el programa ClustalW del EMBL (Thompson y col., 1994) y la edición de los mismo con el programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999). La predicción de la estructura secundaria de las proteínas deducida se realizó con el programa Protean del paquete DNASTar (Lasergene®) y la estructura tridimensional con el programa Swiss-Model (Biasini y col., 2014).

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Cribado de las genotecas de expresión de cisticerco de *Taenia solium* mediante PCR.

Como producto de la PCR en ambas genotecas de expresión (mediana y grande) de cisticercos de *T. solium* se obtuvo un conjunto de bandas de diversos tamaños que oscilan de 150 a 1500 pb aproximadamente. En la figura 12 se observa el patrón electroforético de los productos de PCR provenientes de la genoteca de expresión mediana, cuyo patrón electroforético es similar al obtenido en la amplificación a partir de la genoteca de expresión grande (imagen no mostrada). Cada una de estas bandas corresponde a productos amplificados de ARNm diferentes que presentan un extremo 5' común correspondiente a la molécula *Spliced Leader*.

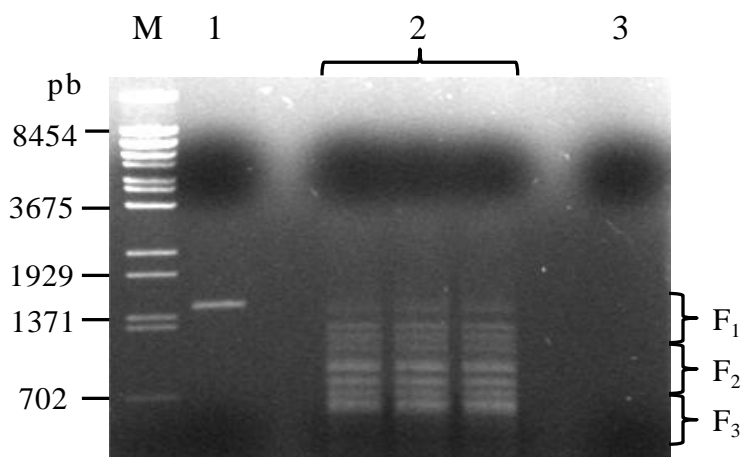


Figura 12. Productos de PCR del cribado de la genoteca de expresión mediana de cisticerco de *T. solium*. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en el que se observa el conjunto de bandas productos de la PCR *spliced leader*. (M) Marcador de Tamaño molecular λ BstEII (Roche), (1) Control Positivo (Molécula M21a de 1443 pb), (2) productos de amplificación (3) control negativo.

4.2. PCR de colonias para verificar los fragmentos clonados y estimar el tamaño de los mismos

Como resultado de la transformación de las células competentes con el producto de la ligación de los fragmentos en el vector *pGEM[®]-T Easy* se obtuvo un total de 86 colonias blancas (recombinantes), las cuales fueron verificadas mediante PCR de colonias. Se seleccionaron las colonias color blanco empleando el método de selección fenotípica basado en la presencia de colonias blanco/azul. Se obtuvo un total de 56

colonias recombinantes. En la figura 13 se observa el producto de amplificación de varias colonias recombinantes (carriles 2-4,8-9,12-13,15-18) a partir de una PCR de colonias, donde se evidencia una amplia gama de insertos incorporados, cuyos tamaños varían entre 150 a 1200 pb aproximadamente; también se muestra en los carriles 1, 5-7, 10-11 y 14 la ausencia de producto PCR correspondiente a las colonias no recombinantes. Se obtuvieron 9 recombinantes de la fracción MF₁, 7 de la fracción MF₂, 30 de la fracción MF₃, 4 de la fracción HF₁, 6 de la fracción HF₂ y ninguno de la fracción HF₃, para un total de 56 fragmentos clonados.

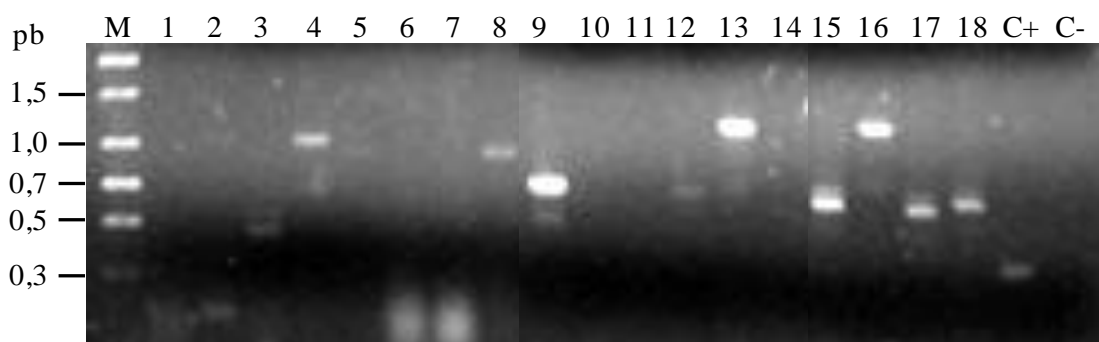


Figura 13. Identificación por PCR de las colonias recombinantes. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en el que se observan los productos de una PCR colonias. (M) Marcador de ADN 1 Kb (Axygen), (1, 5-7,10-11 y 14) no hubo amplificación de insertos en esas colonias, (2-4,8-9,12-13,15-18) productos amplificados de los insertos clonados, (C+) control positivo, (C-) control negativo.

4.3. Secuenciación de los fragmentos clonados. Análisis y comparación de las secuencias con las secuencias de los bancos de datos

De los 56 clones con los que se contaba, se lograron secuenciar 33, de los cuales, 3 fueron secuencias de β galactosidasa de la región lacZ del vector pGEM[®]-T *easy*, por lo que no fueron tomadas en cuenta para efecto de este estudio. Al resto de las secuencias de ADNc obtenidas (30) se les realizó alineamiento múltiple de secuencias, encontrándose 14 moléculas distintas, ya que algunas moléculas estaban repetidas (varios clones idénticos que formaron grupos de la misma secuencia). El primer grupo formado por 6 clones idénticos (Figura 14), el segundo por 5, el tercero por 3, del 4 al 8 estaban formados por dos clones idénticos, y las siguientes moléculas correspondían a clones únicos (Tabla 3). En cuanto al número de nucleótidos de las secuencias clonadas, se obtuvieron moléculas entre 309 y 1190 nucleótidos (nt), con marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) entre 201 y 1077 nt, que codifican proteínas entre 66 y 358 aminoácidos (aa) (Tabla 3).

De los grupos se obtuvieron las secuencias consenso, las cuales se analizaron al igual que las secuencias individuales. Se pudo observar que las secuencias de 10 moléculas se encuentran completas desde la región SL hasta la señal de poliadenilación (ver tabla 3), en las cuales se pudo determinar la ubicación del marco abierto de lectura y la secuencia aminoacídica deducida. En 4 moléculas las secuencias se encontraban truncadas en algunos de los extremos 5` o 3` e incluso ambos (en dos de ellas faltó la parte media de la secuencia por lo que no se pudo determinar el ORF), en otro caso, aunque la secuencia se encontraba completa desde la región SL hasta la secuencia poliA no se encontró ORF. Sin embargo, se encontró una característica común en todas las secuencias consensos y únicas y es que en todos los casos inmediatamente posterior a la secuencia del cebador TSSL-DW2 se encuentra un codón ATG (SL-ATG) y que funciona en alguno de los casos como codón de inicio (SL-ATGi) (Tabla 3).

Tabla 3. Clones aislados de las genotecas de expresión de metacestodos de *T. solium* mediante PCR-*Spliced Leader*.

Nº	Código de los clones (secuencias)	Nº de nt	Marco abierto de lectura (nt)	Nº de aa	Distancia SL-ATGi
1	1MF3a, 3MF3a, 4MF3a, 5MF3a, 6MF3c, 36MF3c	529	288	95	0
2	22MF3c, 41MF3c, 43MF3c, 47MF3c, 9MF3c	523	267	88	5
3	50MF3c, 53MF3c, 10MF3c	436	201	66	0
4	5HF1b, 8HF2b	831	210	69	0
5	15HF2b, 57HF2c	877	636	211	0
6	2MF2d, 4MF2d	311*	*	96*	0
7	29MF1b, 7MF2d	617	492	163	7
8	2MF3a, 22MF1b	605	327	108	16
9	30MF1b	1190	1077	358	5
10	20MF3c	560	315	104	0
11	37MF3c	371	216	71	55
12	23MF1b	903*	*	253*	14
13	12MF3c	938	**	**	**
14	3HF1b	309	**	**	**

nt= nucleótidos aa= aminoácidos * = secuencia incompleta. **=sin ORF

Tras analizar los resultados y atendiendo a los objetivos fijados en el presente trabajo, se procedió a continuar con la caracterización de todas las moléculas obtenidas.

4.4. Caracterización Molecular

4.4.1. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°1

En la figura 14, se observa el alineamiento múltiple de secuencias del grupo más grande formado (6 clones). Cada clon está compuesto por 529 nucleótidos (nt), y se puede observar la presencia en el extremo 5` de la secuencia SL y el extremo 3` la cola de poli- A.

La secuencia aminoacídica deducida se observa en la figura 15, el codón de inicio se ubica en la posición 24 inmediatamente después de la secuencia SL de 23 nt en el extremo 5`; el marco abierto de lectura está conformado por 288 nt seguido de una región no traducible de 218 pb. La cola de poli-A esta formada por 22 nt y comienza en la posición 508.

La proteína deducida es de 95 aminoácidos con un peso molecular de 9,69 kDa y un punto isoeléctrico de 3,719. Posee 12 sitios potenciales de fosforilación según el programa NetPhos 2.0 (Figura 16), en la posición S29 se ubica un posible sitio de fosforilación por casein quinasas 1, según resultados del programa Motif-Scan.

No se encontraron sitios de miristilaciones, acetilaciones ni de glicosilaciones, tampoco se encontraron resultados de existencia de péptido señal, segmento transmembrana ni de dominio funcional.

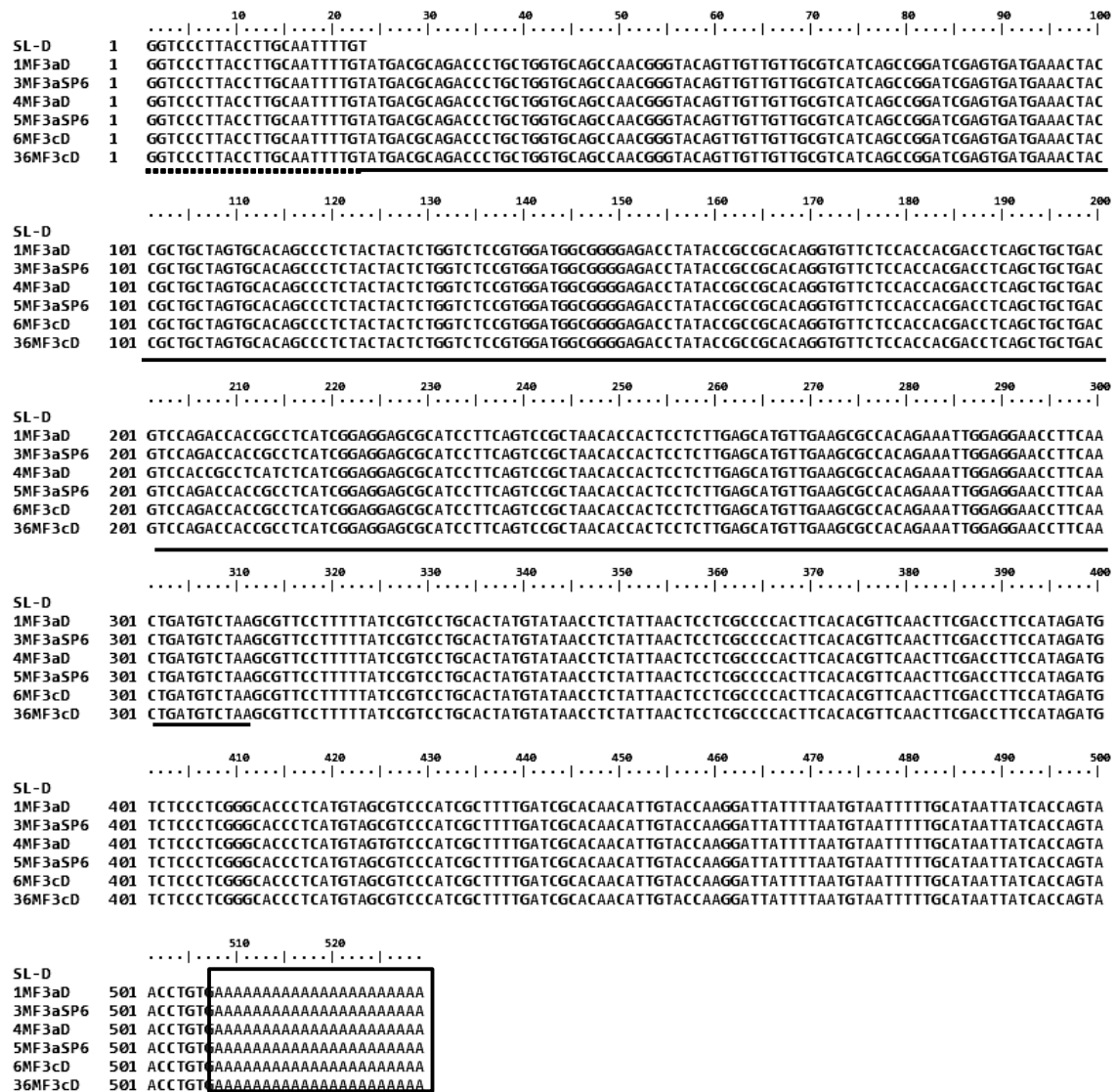


Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencia de ADNc del grupo N°1. Subrayado en línea punteada se encuentra la secuencia TSSL-DW2, subrayado en línea continua se indica el marco abierto de lectura y dentro del cuadro la cola de poli A.

La estructura secundaria fue predicha por el programa Protean del paquete bioinformático Lasergene®. En la figura 17 se puede observar regiones con conformación β , otras en hélices α , igualmente se observa pocas regiones expuesta en superficie e hidrofílicas, pero si un alto índice antigénico y regiones flexibles en algunas zonas de la proteína.

No se encontró un posible modelo molecular según el programa Swiss-Model.

ggccttaccttgcaat														47	
M T Q T L L V Q														8	
CCA	ACG	GGT	ACA	GTT	GTT	GTT	GCG	TCA	TCA	GCC	GGA	TCG	AGT	GAT	92
P	T	G	T	V	V	V	A	S	S	A	G	S	S	D	23
GAA	ACT	ACC	GCT	GCT	AGT	GCA	CAG	CCC	TCT	ACT	ACT	CTG	GTC	TCC	137
E	T	T	A	A	S	A	Q	P	S	T	T	L	V	S	38
GTG	GAT	GGC	GGG	GAG	ACC	TAT	ACC	GCC	GCA	CAG	GTG	TTC	TCC	ACC	182
V	D	G	G	E	T	Y	T	A	A	Q	V	F	S	T	53
ACG	ACC	TCA	GCT	GCT	GAC	GTC	CAG	ACC	ACC	GCC	TCA	TCG	GAG	GAG	227
T	T	S	A	A	D	V	Q	T	T	A	S	S	E	E	68
CGC	ATC	CTT	CAG	TCC	GCT	AAC	ACC	ACT	CCT	CTT	GAG	CAT	GTT	GAA	272
R	I	L	Q	S	A	N	T	T	P	L	E	H	V	E	83
GCG	CCA	CAG	AAA	TTG	GAG	GAA	CCT	TCA	ACT	GAT	GTC	TAA	gcgttc	317	
A	P	Q	K	L	E	E	P	S	T	D	V	*			95
cttttatcctgctcactatgtataacctctattaactcctcgccccacttcacacgt														377	
tcaacttcgaccttccatagatgtctccctcgggcacctcatgttagcgtcccatcgctt														437	
ttgatcgacacacattgtaccaaggattattttaatgtaatttttgataattatcacca														497	
gtaacctgtgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa														529	

Figura 15. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°1. En azul se resalta la secuencia SL seguido en verde del codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

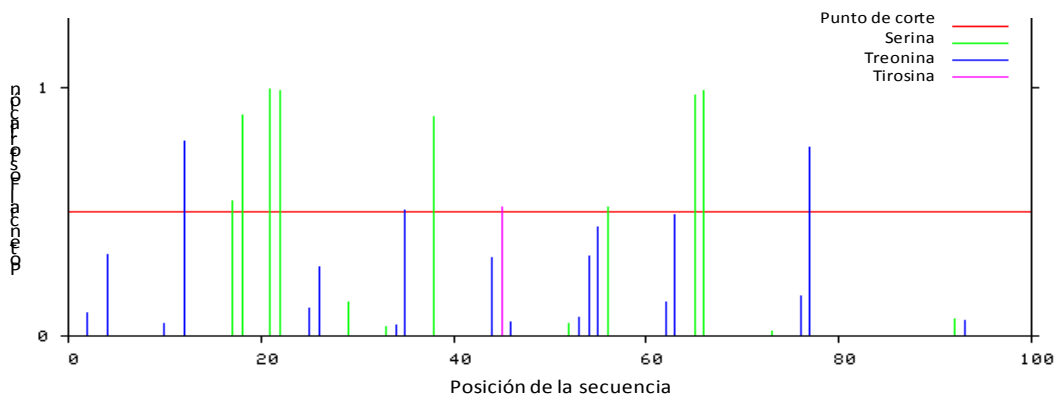


Figura 16. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°1, según el programa NetPhos 2.0.

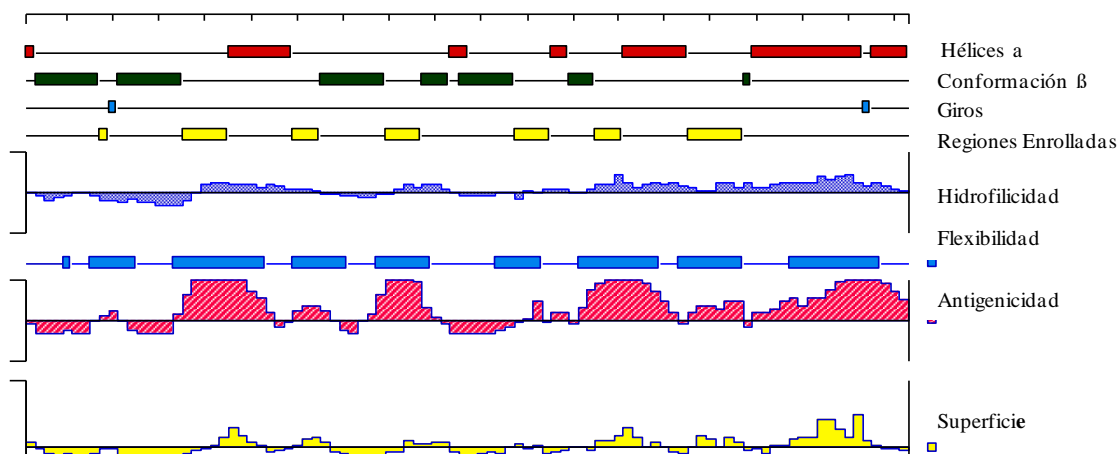


Figura 17. Estructura secundaria del grupo N°1 donde se observa las regiones α -hélices, conformación β y regiones flexibles, así como también la hidrofilicidad, el índice antigénico y la probabilidad de estar en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

Los alineamientos de la secuencia con las de los bancos de datos (GenBank) mostraron similitud de la secuencia del grupo N°1 con factores de transcripción nuclear γ de organismos evolutivamente cercanos, así como también con un factor de ribosilación ADP unido a proteína de *E. granulosus* (Tabla 5). El alineamiento múltiple de la secuencia del grupo N°1 con sus homólogos, muestra que son proteínas conservadas, aunque la proteína deducida del grupo N°1 es mucho más pequeña que las de sus homólogos más cercanos (Figura 18).

Tabla 4. Similitud de la secuencia del grupo N°1 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Factor de transcripción nuclear γ	<i>T. asiatica</i>	(OCK27529.1)	98	98
Factor de transcripción nuclear γ	<i>T. saginata</i>	(OCK36212.1)	96	96
Factor de transcripción nuclear γ	<i>E. granulosus</i>	(CDS19297.1)	85	85
Factor de transcripción nuclear γ	<i>E. multilocularis</i>	(CDS37349.1)	83	83
Factor de ribosilación ADP	<i>E. granulosus</i>	(EUB60404.1)	83	83
Factor de transcripción nuclear γ	<i>H. microstoma</i>	(CDS28392.1)	51	52

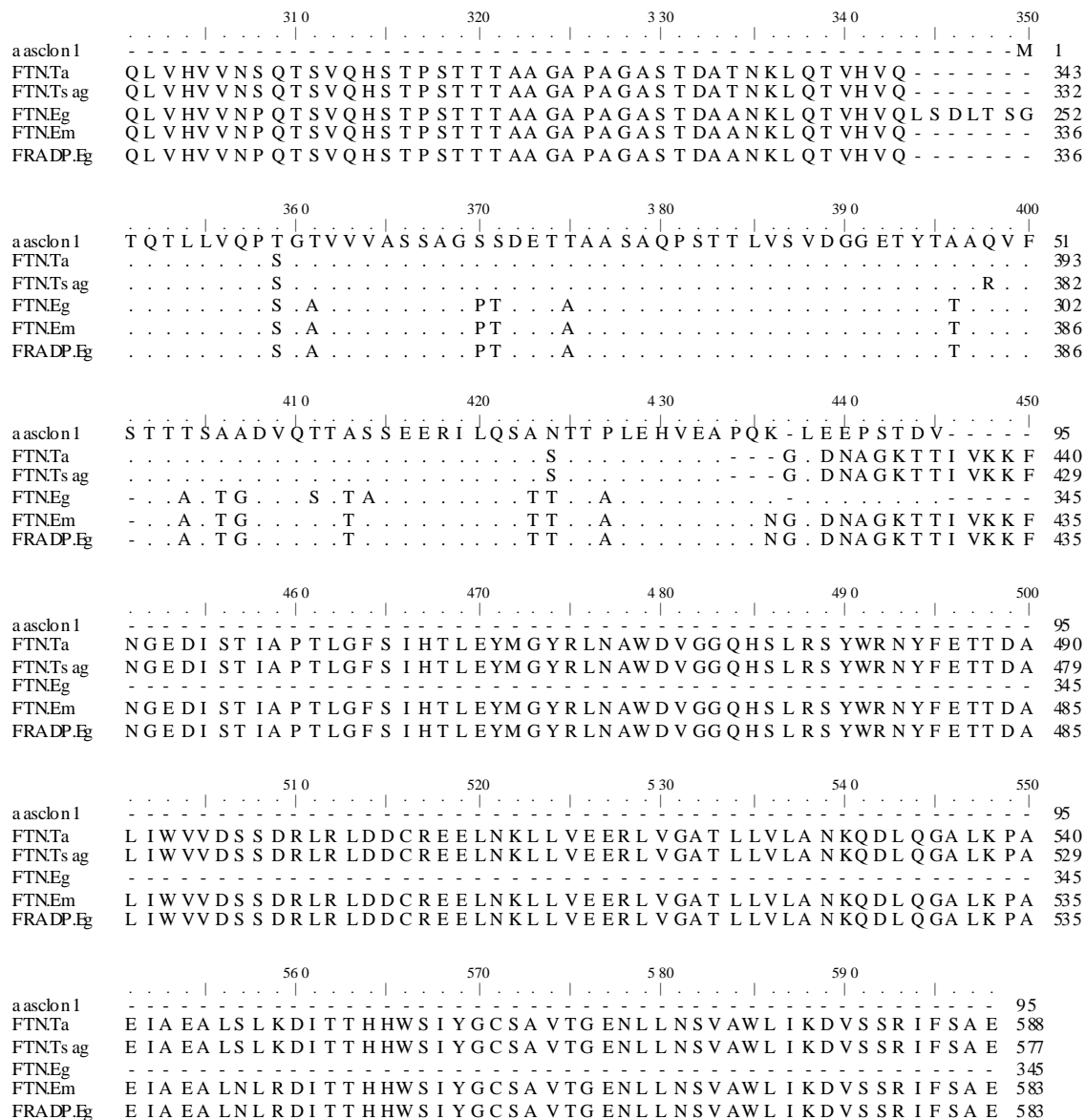


Figura 18. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°1, con las proteínas factor de transcripción nuclear γ de *T. asiatica* (OCK27529.1)(FTN.Ta), *T. saginata* (OCK36212.1)(FTN.Tsag), *E. granulosus* (CDS19297.1) (FTN.Eg), *E. multilocularis* (CDS37349.1) (FTN.Em) y el factor de ribosilacion del ADP de *Echinococcus granulosus* (EUB60404.1)(FRADP.Eg).

4.4.2. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°2

La secuencia aminoacídica deducida del grupo N°2 se observa en la figura 19, donde también se observa el codón de inicio en la posición 29 que se ubica 5 nt después de la secuencia SL de 23 nt en el extremo 5'; el marco abierto de lectura está conformado por 267 nt seguido de una región no traducible de 228 pb. La cola de poli-A está formada por 19 nt y comienza en la posición 505. La proteína deducida es de 88 aminoácidos con un peso molecular de 10,28 kDa y un punto isoeléctrico de 6,062.

Posee un dominio en el extremo amino-terminal (2-39aa), llamado DUF2615, de función desconocida que conforma a una superfamilia de proteínas denominada DUF2615 (Figura 20). Además, se encontraron cinco sitios potenciales de fosforilación y un sitio de N-glicosilación según los programas NetPhos 2.0 y NetNGlyc 1.0 respectivamente (Figura 21). No posee sitios potenciales a miristilación, acetilación ni péptido señal ni segmento transmembrana.

ggtc ccttaccttgcaattttgt atggc	ATG	GCA	GAT	GGT	TTT	GAC	46
	M	A	D	G	F	D	6
TGT GAG TGC ATT TAC AAT CAC GAA	ACG	TCG	ATG	CAG	CGG	CTC	91
C E C I Y N H E	T	S	M	Q	R	L	21
ACC ATG CTG CGA CAG TCG CAA ACC	TAC	TGT	AAT	GAC	GTA	GTG	136
T M L R Q S Q	T	Y	C	N	D	V V	36
CAA AGC AAC CAA TCT AAC TCG ATT	ATG	AAC	CAG	AGC	AAC	AGC	181
Q S N Q S N S	I	M	N	Q	S	N S	51
ACT CGT GCC GAA TTC GGC ACG AGC	TCG	TGC	CGA	ATT	CGG	CAC	226
T R A E F G T	S	S	C	R	I	R H	66
TTT CAT TAT TTC AAT GAA ATT AGG	ATC	TTA	AGT	ATA	GAT	TAT	271
F H Y F N E I	R	I	L	S	I	D Y	81
GTT AAG TTA CCC CAG GGA	TAA	cagtgtgataattaataagagatctta	322				
V K L P Q G *			88				
aattaattgtttgccacctcgatgttgacttaggttagaatttaggtgtagtagctt	382						
tttatggtcgttcgaccgtattgacctcatgagttgagttaagaccggtgtgagc	442						
gtcgttcttatctattgtagaagtttatcagtacgaaaggatagtaagctttttta	502						
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	523						

Figura 19. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°2. En azul se resalta la secuencia SL, en verde el codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.



Figura 20. Ubicación del dominio DUF 2615 en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°2, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

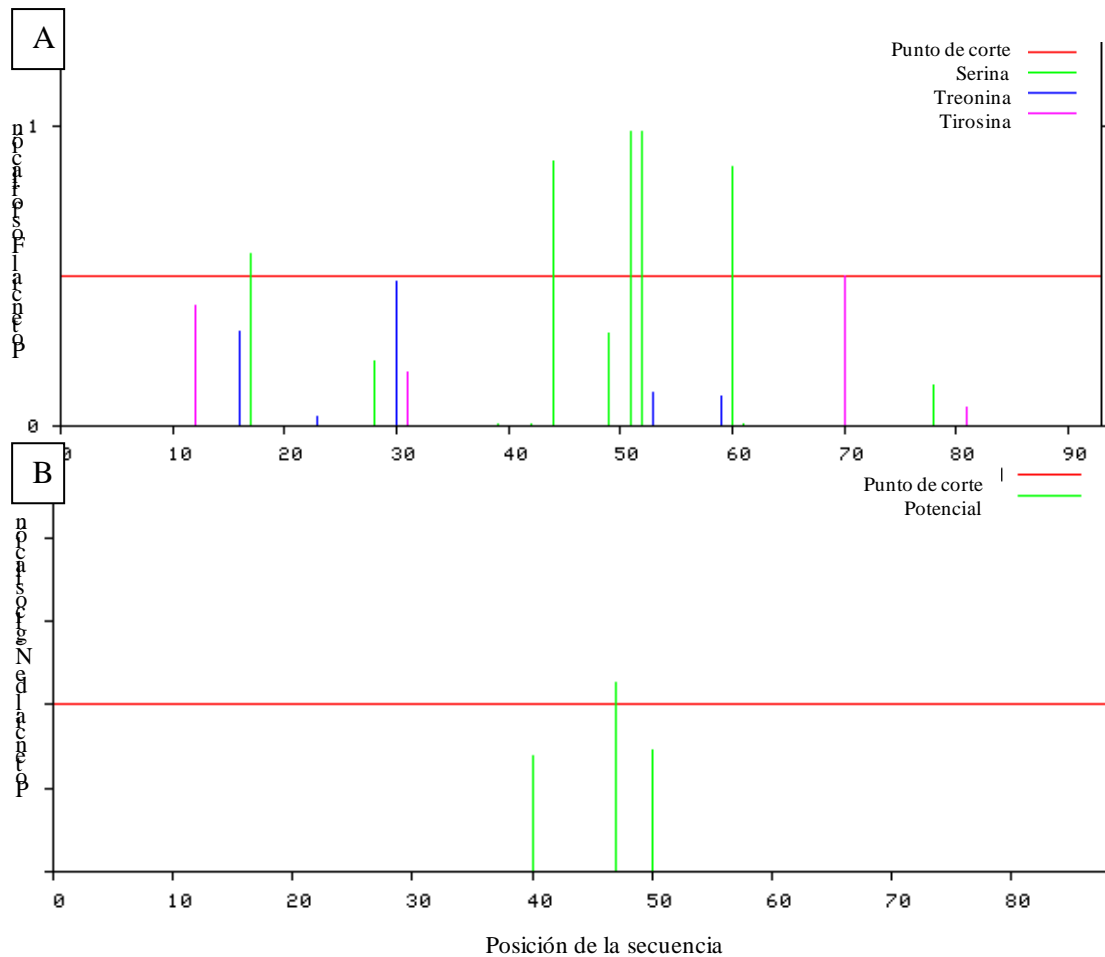


Figura 21. Aminoácidos susceptibles a fosforilación (A) y a N-glicosilación (B) en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N^o2, según los programa NetPhos 2.0 y NetNGlyc 1.0 respectivamente.

La estructura secundaria de la proteína predicha por el programa Protean del paquete Lasergene®, en la figura 22 permite observar que toda la molécula está conformada por regiones β , algunas regiones conectoras en giros sin regiones en hélices α , igualmente se observa la regiones de alta flexibilidad, que coinciden con un alto índice de antigenicidad sobre todo en los primeros 65 aas. Se buscó un posible modelo molecular de la proteína con el programa Swiss-Model pero no hubo coincidencia con moléculas similares cuyos modelos moleculares estén depositadas en la bases de datos.

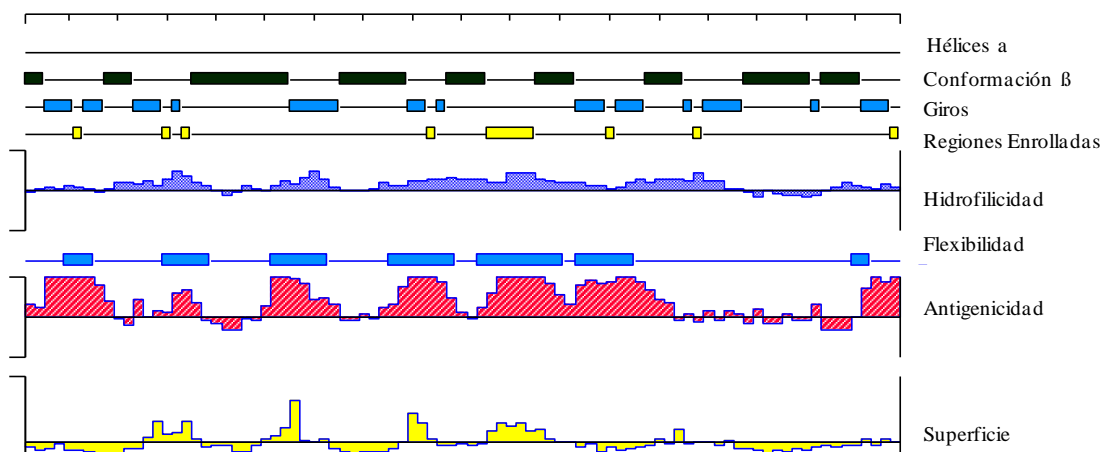


Figura 22. Estructura secundaria del grupo N°2 donde se observa las regiones, conformación β , giros y regiones flexibles, así como también la hidrofilicidad, el índice antigénico y la probabilidad de estar en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

Al comparar la secuencia del grupo N°2 con las secuencias depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ, ésta mostró similitud con proteínas hipotéticas de *T. solium* (CDA21531.1), de *T. saginata* (OCK38132.1) y de *T. asiatica* (OCK23231.1), así como también con una familia de proteínas sin caracterizar denominadas CD034/YQF4 de *E. multilocularis* (CD034/YQF4.Em) (CDS41865.1) y *E. granulosus* (CD034/YQF4.Eg) (CDS16843.1) (Tabla 6). El alineamiento múltiple de la secuencia del grupo N°2 con sus homólogos, evidencia que existe mayor conservación de las secuencias en el extremo aminoterminal, que forma parte del dominio DUF2615, encontrándose mayor variación de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (Figura 23).

Tabla 5. Similitud de la secuencia del grupo N°2 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencias de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Proteína hipotética, función desconocida	<i>T. solium</i>	(CDA21531.1)	100	95
Proteína hipotética	<i>T. saginata</i>	(OCK38132.1)	95	88
Proteína hipotética	<i>T. asiatica</i>	(OCK23231.1)	95	86
Familia de proteína CD034/YQF4, sin caracterizar	<i>E. multilocularis</i>	(CDS41865.1)	86	80
Familia de proteína CD034/YQF4, sin caracterizar	<i>E. granulosus</i>	(CDS16843.1)	86	80
Pequeña proteína integral	<i>T. canis</i>	(KHN88344.1)	69	69

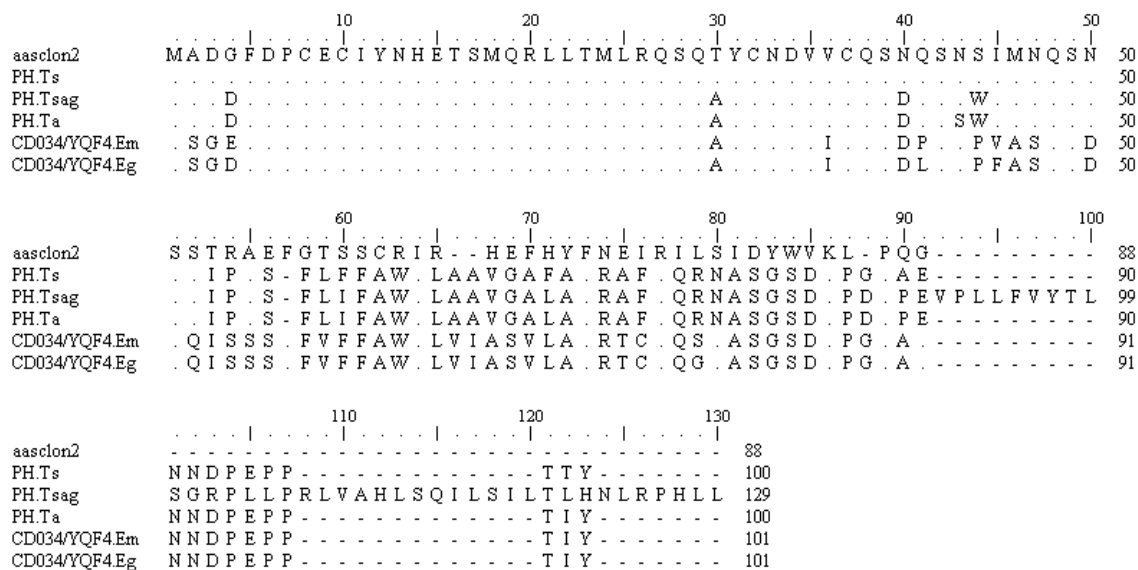


Figura 23. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°2, con las proteína hipotética de *T. solium* (PH.Ts), de *T. saginata* (OCK38132.1) (PH.Tsag), de *T. asiatica* (OCK23231.1) (PH.Ta) familia de proteína CD034/YQF4 de *E. multilocularis* (CD034/YQF4.Em) (CDJ04583.1) y de *E. granulosus* (CD034/YQF4.Eg) (CDS16843.1).

4.4.3. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°3

El ADNc clonado del grupo N°3 está conformado por 436 nt, presenta en extremo 5` la secuencia SL de 23 nt seguida por el codón de inicio en la posición 24, el marco abierto de lectura está conformado por 201 nt, seguido se encuentra una región no traducible de 210 nt donde se encuentra la cola de poli-A de 26 nt en el extremo 3` (Figura 24).

La proteína deducida contiene 66 aa, con un peso molecular de 7,49 kDa y un punto isoelectrico de 4,302; presenta tres sitios potenciales a fosforilación y un sitio potencial a N-glicosilación (Figura 25). Además de la presencia de un dominio funcional de la familia de proteína receptores de renina (10-64 aa) y una posible región transmembrana en el centro de la proteína (25-45 aa) (Figura 26 y 27). No posee sitios potenciales a miristilación, acetilación ni péptido señal.

```

gggcccttaccttgcaatttgt ATG GCT AAT TCA TCG CTA GAA AGT 47
M A N S S L E S 8
ATC AAC GTA GGG CCT GAG GTG GAT CCC GAG TAC GCA GCG TGG TTT 92
I N V G P E V D P E Y A A W F 23
CAG TTG ACT TTT TGG TTC GTT GTG GTC TTC GCA ACG GTC GTT TGG 137
Q L T F W F V V V F A T V V W 38
GTG GTG TGT TGC TCG CTC TGG AAC ATG GAT CCA GGC CGC GAT GGT 182
V V C C S L W N M D P G R D G 53
ATT ATC TAC CGC CTG AGT GTT ACC AAG CCG AAG TCA GAG TAG ggc 227
I I Y R L S V T K P K S E * 66
tgtgtgtgtgtgcacgttttgcagtcacttaaatacaacaattccttccttgctcgtct 285
tatatttcctgtgttttcttgatctatgtgtactcttctcggtggcattgcgcacac 343
catcccttcacgtttctcgctgactccaccatgacaaggta tgcgcaatgcattatat 401
cgccattctttgagc aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 436

```

Figura 24. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°3. En azul se resalta la secuencia SL seguido en verde del codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A. Subrayado en línea punteada se destaca la región potencial transmembrana.

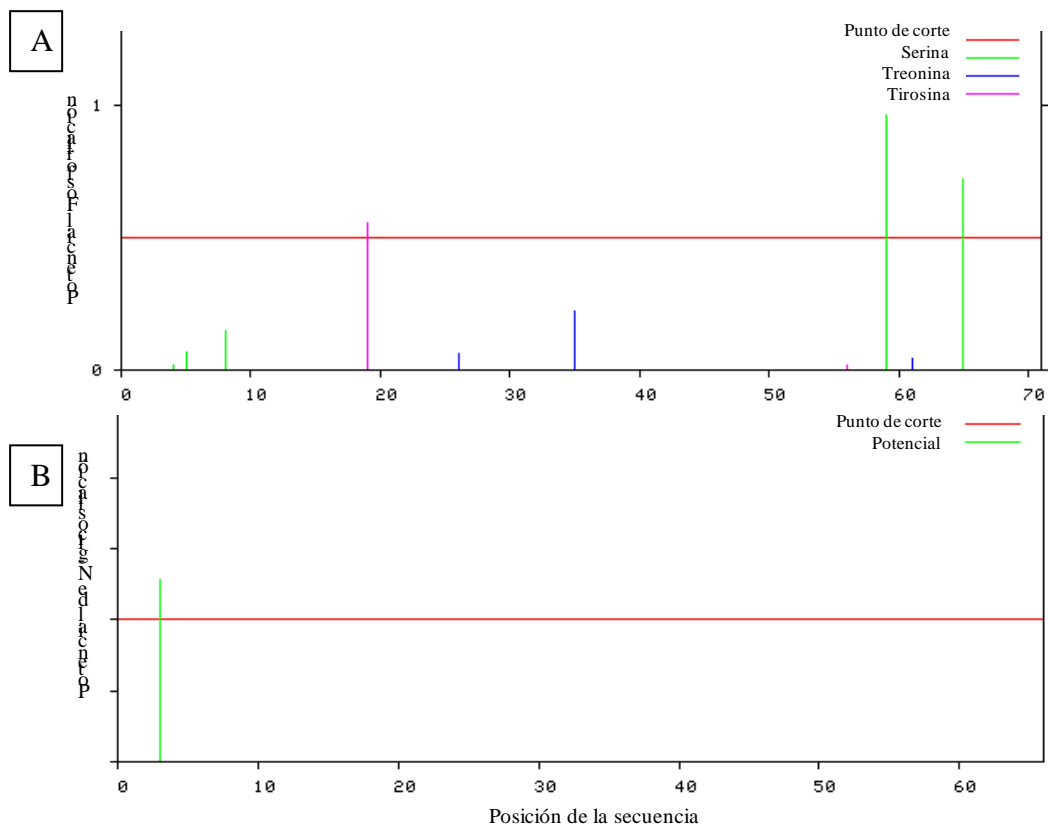


Figura 25. Aminoácidos susceptibles a fosforilación (A) y a N-glicosilación (B) en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°3, según el programa NetPhos 2.0 y NetNGlyc 1.0.



Figura 26. Topografía del dominio de familia de proteínas receptores de renina de la proteína deducida del grupo N°3, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

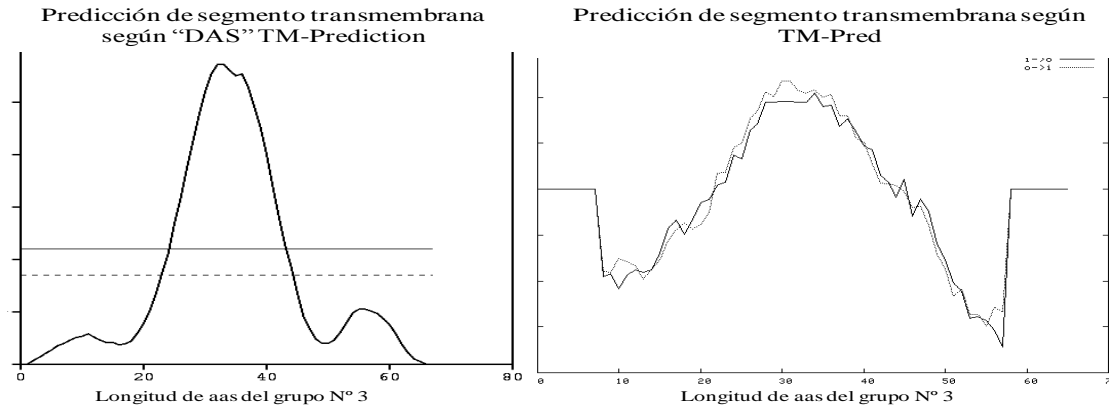


Figura 27. Predicción de segmento transmembrana en la secuencia aminoacídica deducida del clon N°3 según los programas "DAS" *TM-Prediction* y *TM-Pred*.

La estructura secundaria de la proteína se puede observar en la figura 28 donde abundan las conformaciones β y solo una hélices α , existiendo algunas regiones conectoras en giros, del mismo modo se observa menor hidrofiliidad en el centro de la molécula, que se corresponde con la región transmembrana, y un elevado índice antigénico en los extremos. Se buscó la posible estructura terciaria de la proteína con el programa *Swiss-Model* pero no se encontró ningún resultado.

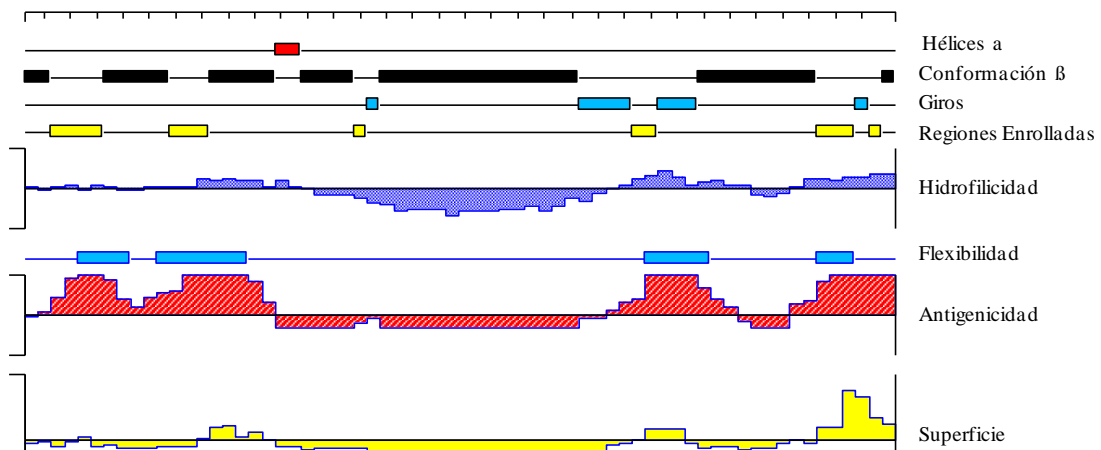


Figura 28. Estructura secundaria del grupo N°3 donde se observa las regiones α -hélices, conformación β y regiones flexibles, así como también la hidrofiliidad, el índice antigénico y la probabilidad de estar en superficie. Programa *Protean* (Lasergene®).

Al realizar la comparación de la secuencia consenso del grupo N°3 con las secuencias depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ, esta presenta similitud con proteína hipotética asociada a ATPasa de membrana de *T. solium* (CAD21533.1), intersectina-2 de *T. asiatica* (OCK19161.1), de *T. saginata* (OCK40497.1), proteína asociada a GTPasa de membrana (dinamina) de *E. multilocularis* (CDI96500.1), intersectina-1 de *E. granulosus* (EUB57437.1) y en menor grado con una subunidad M8.9 asociada a ATPasa de *D. melanogaster* y de *H. sapiens*, lo cual indica que el clon N°3 puede tratarse de una proteína de membrana asociadas a enzima consumidoras de energía (Tabla 8). El alineamiento múltiple de secuencia se realizó con los dos primeros homólogos mencionados anteriormente y la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°3, ya que fueron con las que presentó mayor similitud tanto de secuencia de aminoácidos como de tamaño de la molécula, porque aunque con el homologo intersectina-1 de *E. granulosus* tuvo alta similitud de secuencia de aminoácidos, la diferencia de tamaño fue muy grande (1689 aas) y con las proteínas M8.9 de *D. melanogaster* y de *H. sapiens* ocurrió lo contrario, aunque eran muy similares en tamaño, variaban mucho las secuencias aminoacídicas. El alineamiento de las secuencias evidencia que existe gran conservación entre los miembros que conforman esta familia de proteínas receptores de renina (Figura 29).

Tabla 6. Similitud de la secuencia del grupo N°3 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Proteína hipotética asociada a ATPasa de membrana	<i>T. solium</i>	(CAD21533.1)	98	98
Intersectina-2	<i>T. saginata</i>	(OCK40497.1)	100	100
Intersectina-2	<i>T. asiatica</i>	(OCK19161.1)	100	100
Proteína asociada a GTPasa de membrana (dinamin)	<i>E. multilocularis</i>	(CDI96500.1)	92	92
Intersectina-1.	<i>E. granulosus</i>	(EUB57437.1)	93	93
Putativa proteína M8.9 asociada al sector membrana de ATPasa vacuolar	<i>H. sapiens</i>	(CAA76984.1)	33	33


```

      1610      1620      1630      1640      1650
aasclon 3      . . . . . M A N S S L E S I N V G P E V D P E Y A A W F Q L T F W F V V V F 33
PasocATPasa.Ts . . . . . M A N S S L E S I N V G P E V D P E Y A A W F Q L T F W F V V V F 33
Inters2.Tsag   A I L P L A L T D C D A M G A S I T . . . . . 1650
Inters2.Ta     A V L P L A L T D C D A M G A S I T . . . . . 1650
PasocGTPasa.Em . . . . . E P . . . . . V . . . . . 54

      1660      1670      1680      1690      1700
aasclon 3      A T V V W V V C C S L W N M D P G R D G I I Y R L S V T K P K S E . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . E . . . . . 66
Inters2.Tsag   . . . . . F N K R E E D F E I Y N L S N D V 1700
Inters2.Ta     . . . . . F N K R E E D F E I Y N L S N D V 1700
PasocGTPasa.Em . S . . . . . W . . . . . G . . . . . 87

      1710      1720      1730      1740      1750
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   D V D K T R K F I E Q Y K K D N K D I I K R N R K K Q S S C A E F Y E R E L E Q E R V L R E R R A E 1750
Inters2.Ta     D V D K T R K F I E Q Y K K D N K D I I K R N R K K Q S S C A E F Y E R E L E Q E R V L R E R R A E 1750
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      1760      1770      1780      1790      1800
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   V Q A A D E A A D L Q R R K R L H A G R T L Q G F L C G A A A I P L P E E P Q P K I D S K P N P P P 1800
Inters2.Ta     V Q A A D E A A D L Q R R K R L H A G R T L Q G F L C G A A A I P L P E E P Q P K I D S K P N P P P 1800
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      1810      1820      1830      1840      1850
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   S D Y F I P S T V P S S T M L E S K H R F L P P P S A A L F Q R S V P L S T V S R W S G V P L T P V 1850
Inters2.Ta     S D Y L I P S T V P S S T M L E S K H R F L P P P S A A L F Q R S V P L S T V S R W S G V P L T P V 1850
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      1860      1870      1880      1890      1900
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   S A M G G I S Q L L P P P P P S A S S W A T S V E H H S V V I P P P S T T R S G E Q T D T V V L S R 1900
Inters2.Ta     S A M G G I S Q L L P P P P P S A S S W A T S V E H H S V V I P P P S T T R S G E Q T D T V V L S R 1900
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      1910      1920      1930      1940      1950
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   S H A A K S S S S L L S S S A K A T A E V T R S L E E W L E P Y R P E L C G P H P P S P S N G P R 1950
Inters2.Ta     S H A A K S S S S L L S S S A K A T A E V T R S L E E W L E P Y R P E L C G P H P P S P S N G P R 1950
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      1960      1970      1980      1990      2000
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   W E A L E A V Y L E A V V K P T T K E V L S I L R L L L R N P N C F Y H S F K K F F F F P R I P S T 2000
Inters2.Ta     W E A L E A V Y L E A V V K P M T K E V L S I L R L L L R N P N C F Y H S F K K F F F F P R I P S T 2000
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      2010      2020      2030      2040      2050
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   S Y S Q F R K S L S T M S E G T H Y A L P P A L D L K L D K N A F R K M E I L F A V G V T L G K E F 2050
Inters2.Ta     S Y S Q F R K S L S T M S E G T H Y A L P P A L D L K L D K N A F R K M E I L F A V G V T L G K E F 2050
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

      2060      2070
aasclon 3      . . . . . 66
PasocATPasa.Ts . . . . . 66
Inters2.Tsag   K K V S E Q L S N Y S T G Y L A L P R F M N I 2073
Inters2.Ta     K K V S E Q L S N Y S T G Y L A L P R F M N 2072
PasocGTPasa.Em . . . . . 87

```

Figura 29. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°3, con la Proteína hipotética asociada a ATPasa de membrana de *T. solium* (CAD21533.1) (PasocATP.Ts), intersectina-2 de *T. saginata* (OCK40497.1) (Inters2.Tsag), de *T. asiatica* (OCK19161.1) (Inters2.Ta) y proteína asociada a GTPasa de membrana de *E. multilocularis* (CDI96500.1) (PasocGTP.Em).

4.4.4. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°4

El ADNc clonado del grupo N°4 está conformado por 831 nt, presenta en extremo 5` la secuencia SL de 23 nt seguida por el codón de inicio en la posición 24, el marco abierto de lectura está integrado por 210 nt seguido se encuentra una región no traducible de 598 nt donde se encuentra la cola de poli-A de 28 nt en el extremo 3` (Figura 30).

La proteína deducida contiene 69 aa, con un peso molecular de 7,67 kDa y un punto isoeléctrico de 7,241. Presenta dos sitios potenciales de fosforilación (Figura 31), además de la presencia de un dominio de la familia de proteína activadoras de GTPasa asociada a Rho (RhoGAP) (2-48 aa) y una posible región transmembrana (20-40 aa) (Figuras 32 y 33). No se encontraron potenciales sitios de miristilación, acetilación, glicosilación, ni se encontró existencia de péptido señal.

	ggcccttaccttgcaattttgt														ATG	GAA	GTT	CTC	CTT	TAC	CTG	TTG	47
																			8				
GAC	CAC	CTT	AAG	CGG	ATA	ACA	AGT	AAG	TCA	GTG	GTG	AAC	AAG	ATG					92				
D	H	L	K	R	I	T	S	K	S	V	V	N	K	<u>M</u>					23				
AAC	TCT	CAC	AAT	TTG	GCT	GTC	TGC	CTG	GCC	CCT	TGT	CTC	CTT	CAT					137				
N	S	H	N	L	A	V	C	L	A	P	C	L	L	H					38				
CCC	TCT	CCC	ACG	GCG	GCC	CGC	GAC	ATG	GAC	TCG	GGC	CTC	CTA	CAA					182				
P	S	P	T	A	A	R	D	M	D	S	G	L	L	Q					53				
CCC	AGC	AAG	ATG	GTC	AGC	GTT	CTC	GAG	TGC	ATT	CTT	GAC	ATT	TGG					227				
P	S	L	M	V	S	V	L	E	C	I	L	D	I	W					68				
CCA	TAA	agactcctccatcgccgctgccaccaccactaccagcattcttctccatga													284								
P	*														69								
ctatttctatttctactggctggccggtagctcaaatttgaaaacttcaaaaacatccca																				343			
ttttctccatcatcgctcgtcttctcatgcatgaatctcattacaaccccgtcgaagattc																				402			
cgaaaacctcctcatgaggcacatgcatacacgcagttaaaccgctcaagtgaatcct																				461			
gatgttcaaattcccatcctttttcacccccactctcacacttctacttattgtcctct																				520			
gaacttcatctcacccctggtaaggctcacttagagccagaggggcacatttcggcggtt																				579			
agttagatagcgcgtttctctatcaaggcccttctggcaaacgcttcgcctgtctcgtc																				638			
ctacgtcaacacctctctccctaccttccctcaccaaatcctcagcatcccaatgacgt																				697			
gcaggtttgctcggttccccttctctcctcctggccacactgcttaacttattgtagat																				756			
gtgcctcgatctgcttatttgtaaaaatcccaatacatgcctactcga																				815			
aaaaaaaaaaaa																				831			

Figura 30. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°4. En azul se resalta la secuencia SL seguido en verde del codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

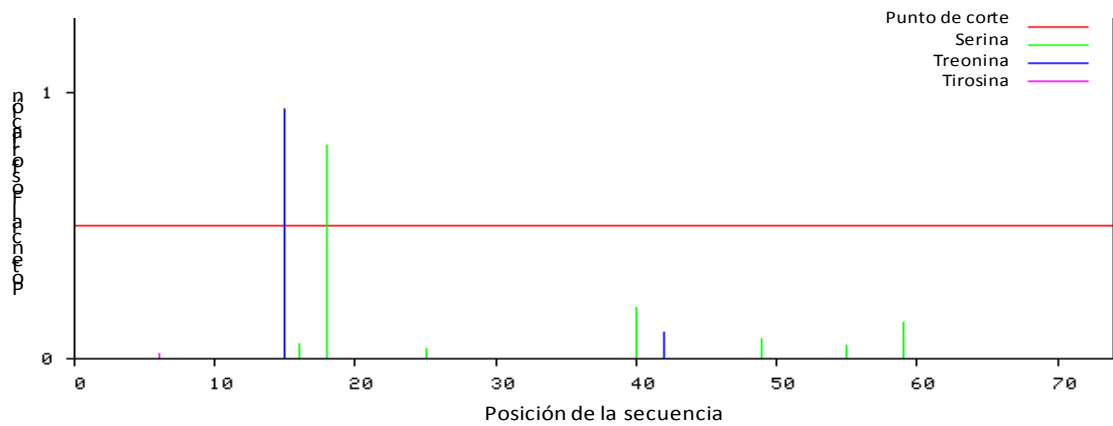


Figura 31. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°4, según el programa NetPhos 2.0.



Figura 32. Topografía del dominio de familia de proteínas RhoGAP en la proteína deducida del grupo N°4, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

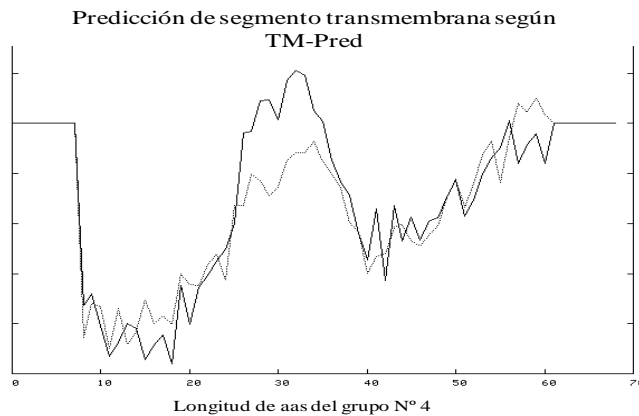


Figura 33. Predicción de segmento transmembrana en la secuencia aminoacídica deducida del clon N°4 según el programa TM-Pred.

La estructura secundaria de la proteína se puede observar en la figura 34 donde se encuentran hélices α , conformaciones β , regiones conectoras en giros y solo algunas regiones enrolladas, del mismo modo se observa mayor hidrofobicidad en el centro de la molécula, que se corresponde con la región transmembrana. Se buscó la posible estructura terciaria de la proteína con el programa Swiss-Model pero no se encontró ningún resultado.

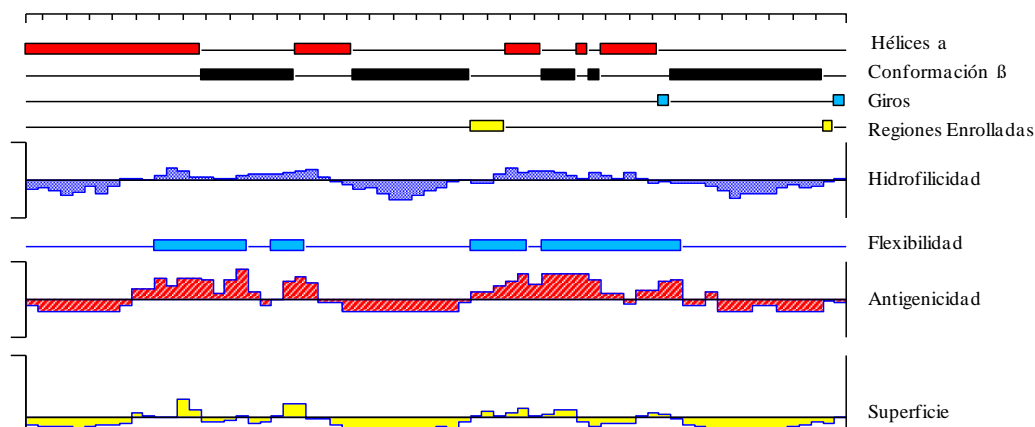


Figura 34. Estructura secundaria del grupo N°4 donde se observan las regiones α -hélices, conformación β , conexiones en giros y regiones flexibles, así como también la hidrofilicidad, el índice antigénico y la probabilidad de estar en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

La comparación de la secuencia del grupo N°4 con las secuencias depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ, permitió observar similitud con la proteína activadoras de GTPasa asociada a Rho de *T. saginata* (OCK39498.1), *T. asiatica* (OCK28379.1), *E. granulosus* (CDS19130.1), *E. multilocularis* (CDS37180.1), *H. microstoma* (CDS27177.1) y de *S. mansoni* (CCD82623.1) (Tabla 8). El alineamiento múltiple de la secuencia del grupo N°4 con sus principales homólogos, evidencia que existe alta conservación entre las secuencias, sin embargo la proteína deducida del grupo N°4 es más pequeña y la similitud con sus homólogos es mayor en el extremo carboxi terminal, lugar donde se encuentra el dominio funcional RhoGAP y presenta algunos de los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción con la GTPasa (Figura 35).

Tabla 7. Similitud de la secuencia del grupo N°4 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	Nº-acceso	nt%	aa%
Activadora de GTPasa unida a Rho	<i>T. saginata</i>	(OCK39498.1)	99	99
Activadora de GTPasa unida a Rho	<i>T. asiatica</i>	(OCK28379.1)	99	99
Activadora de GTPasa unida a Rho	<i>E. granulosus</i>	(CDS19130.1)	99	99
Activadora de GTPasa unida a Rho	<i>E. multilocularis</i>	(CDS37180.1)	99	99
Activadora de GTPasa unida a Rho	<i>H. microstoma</i>	(CDS27177.1)	90	90
Activadora de GTPasa unida a Rho	<i>S. mansoni</i>	(CCD82623.1)	55	56

	860	870	880	890	900	
aasclon4	MEVLLYLLDHLKRIT	SKSVV	NKMNSHNLAVC		31
RhoGAP.Tsag	SHMGTKLILNILDCLPTS	SNQ	871
RhoGAP.Ta	SHMGTKLILNILDCLPTS	SNQ	871
RhoGAP.Eg	SHMGTKLILNILDCLPTS	SNQ	R	462
RhoGAP.Em	SHMGTKLILNILDCLPTS	SNQ	R	462
RhoGAP.Hm	SHMGTKLILNILDCLPTS	SNQ	M	868
	910	920	930			
aasclon4	LAPCLLHPSPTAARDMDS	GLLQPSKMVSW	LECILDIWP			69
RhoGAP.Tsag			909
RhoGAP.Ta			909
RhoGAP.Eg			500
RhoGAP.Em			500
RhoGAP.HmSIAAEH			906

Figura 35. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°4, con la proteína activadoras de GTPasa asociada a Rho de *T. saginata* (OCK39498.1) (RhoGAPT_{sag}) de *T. asiatica* (OCK28379.1) (RhoGAPT_a), de *E. granulosus* (CDS19130.1) (RhoGAP.Eg), de *E. multilocularis* (CDS37180.1) (RhoGAP.Em), de *H. microstoma* (CDS27177.1) (RhoGAP.Hm). Dentro de los recuadros se ubican aminoácidos involucrados en la interacción con GTPasa.

4.4.5. Análisis de la secuencia consenso del grupo N° 5

La secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida se observa en la figura 36, el codón de inicio se ubica en la posición 24 inmediatamente después de la secuencia SL en el extremo 5'; el marco abierto de lectura está conformado por 636 nt seguido de una región no traducible de 218 pb. La cola de poli-A esta formada por 17 nt y comienza en la posición 861.

La proteína deducida es de 211 aminoácidos con un peso molecular de 24,30 kDa y un punto isoeléctrico de 9,43. Posee diez sitios potenciales de fosforilación en serina según el programa NetPhos 2.0, y no se encontraron potenciales sitios de miristilación, acetilación ni de glicosilación. Posee además un dominio KOW (110-175 aas), cuya función es unir al ARN durante la traducción, dicho dominio conforma una familia de proteínas ribosomales L26 (Figuras 37 y 38), ortólogo a la proteína ribosomal bacteriana L24.

No se encontró existencia de péptido señal ni segmento transmembrana.

gggcccttaccttgcaattttgt	ATG	AAT	CCC	GCC	TTC	CAG	TTC	GCC		47
	M	N	P	A	F	Q	F	A		8
TAT TGG CCT CGC TAC GTG GCG CGA CTG CTG CGT TTT CGT CCC GTC										92
Y W P R Y V A R L L R F R P V										23
TTT CGC GGT GAT CTA CAG GGC TGG TCC TTC GAG ATG GAC CGC TCC										137
F R G D L Q G W S F E M D R S										38
ATG CCC TTC GAG TTG CCT GAC GCC AAA CCT CAC GAG TTT GCA GAG										182
M P F E L P D A K P H E F A E										53
GAG AAG TGG CTG CCA GTG TGG CGC TTT TCG GAG CAG TCA CCG TGG										227
E K W L P V W R F S E Q S P W										68
AAT ATC GCG AAC CGC CTC TCG GCC TCC CCC TAT CGC ACC GAC TGG										272
N I A N R L S A S P Y R T D W										83
TGT GTT GTC CAT CCC GAC GGC AAA CGC ACT CGC GAA CAC CTC ACC										317
C V V H P D G K R T R E H L T										98
GGC ATG AGC CCC GAG GAG CAG ACC ATC TTC AAG GGC GAT CGT GTC										362
G M S P E E Q T I F K G D R V										113
ATT GTG CTC AAG GGA ATC AGC AGG GGC AAG ATT GGT ATT GTG AGT										407
I V L K G I S R G K I G I V S										128
TCG GTG ATA AAA ATG CGC AAT CTC GTC TAT GTA GAG GGC TTG AAT										452
S V I K M R N L V Y V E G L N										143
CCC CGC TAT CGA TCC CCT GAG GGC ACC GGA CCC CTC ATT TCT GAC										497
P R Y R S P E G T G P L I S D										158
GAG AAT TAT CTC AAA ATC GAC AAA GAG GTG GCT CTC ATT GAC CCC										542
E N Y L K I D K E V A L I D P										173
TCT GAC AAG ACG CCC CTG CGA AGC AGT GTG GCG CTA CGA CTC CCA										587
S D K T P L R S S V A L R L P										188
GGG GAA CCG CGT GCG CGT CTC CAA ACG CAG TGG GCA CCT ACT GCC										632
G E P R A R L Q T Q W A P T A										203
CCT CCC CAC AGC TGC CCG CAT TCT TGA	cgacctcaccgaccagtgaccgc									683
P P H S C P H S	*									211
cgaagtgggagagaaggacactcccacagaagccgtcaccaggacaactgtggactttgt										743
cgcacccaacgactggagaccttcgaggaggagctgacgcggatctatgcacccgagga										803
caagcgacagcgaatgccactttctggtactgaatatataagcatgtatttgtaaaa										863
aaaaaaaaaaaaaaaa										877

Figura 36. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°5. En azul se resalta la secuencia SL seguido en verde el codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

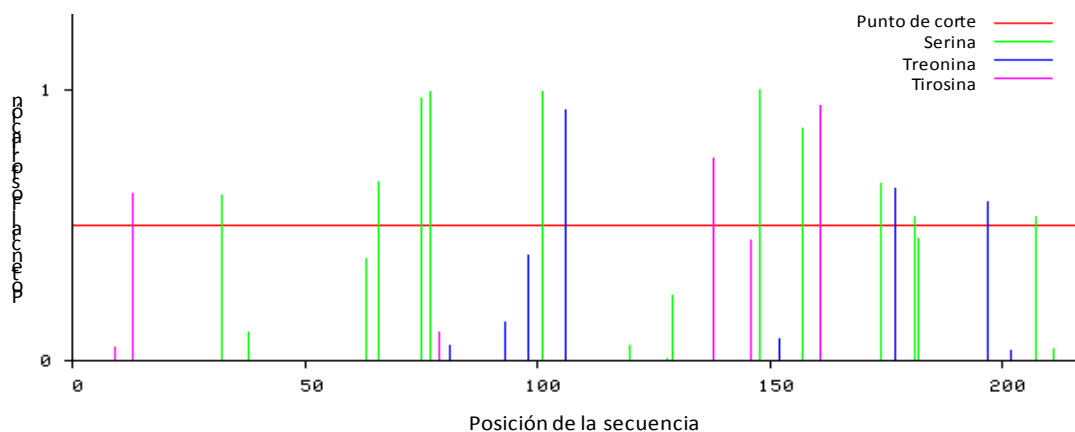


Figura 37. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5, según el programa NetPhos 2.0.



Figura 38. Ubicación del dominio KOW_RPL26 en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

La estructura secundaria de la proteína se puede observar en la figura 39 donde existe solo una hélice α , varias conformaciones β , giros conectores y regiones enrolladas, del mismo modo se observan las zonas hidrofílicas, las regiones más propensas a estar en superficie, áreas flexibles y un alto índice antigénico a lo largo de toda la proteína. No se encontró un modelo de estructura tridimensional para esta proteína.

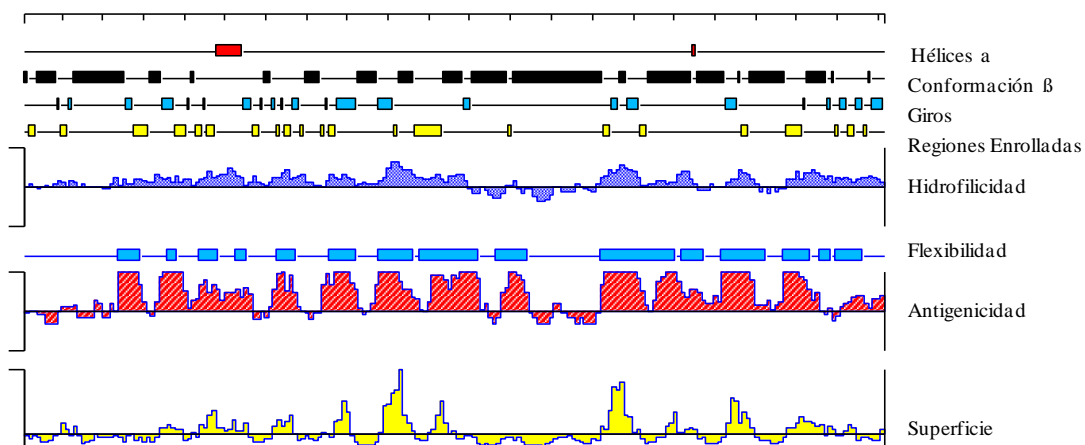


Figura 39. Estructura secundaria del grupo N°5 donde se observan las regiones α -hélices, conformación β , conexiones en giros y regiones flexibles, así como también la hidrofiliidad, el índice antigénico y la probabilidad de estar en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida con la base de datos de NCBI/EMBL/DDBJ mostró similitud con proteínas ribosomal L26 de *T. asiatica* (OCK25018.1), *T. saginata* (OCK41683.1), *E. granulosus* (CDS19963.1), *E. multilocularis* (CDI98305.1), *H. microstoma* (CDS28262.1) y de *S. mansoni* (CCD74992.1) (Tabla 9). Se realizó el respectivo alineamiento múltiple entre las secuencias con mayor similitud y la del grupo N°5, el cual muestra un segmento conservado que corresponde al dominio KOW_RPL26 donde se encuentran presentes residuos de aminoácidos que se unen al ARN (Figura 40).

Tabla 8. Similitud de la secuencia del grupo N°5 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Proteína ribosomal L26	<i>T. asiatica</i>	(OCK25018.1)	98	97
Proteína ribosomal L26	<i>T. saginata</i>	(OCK41683.1)	98	97
Proteína ribosomal L26	<i>E. granulosus</i>	(CDS19963.1)	94	93
Proteína ribosomal L26	<i>E. multilocularis</i>	(CDI98305.1)	93	92
Proteína ribosomal L26	<i>H. microstoma</i>	(CDS28262.1)	80	79
Proteína ribosomal L26	<i>S. mansoni</i>	(CCD74992.1)	57	57

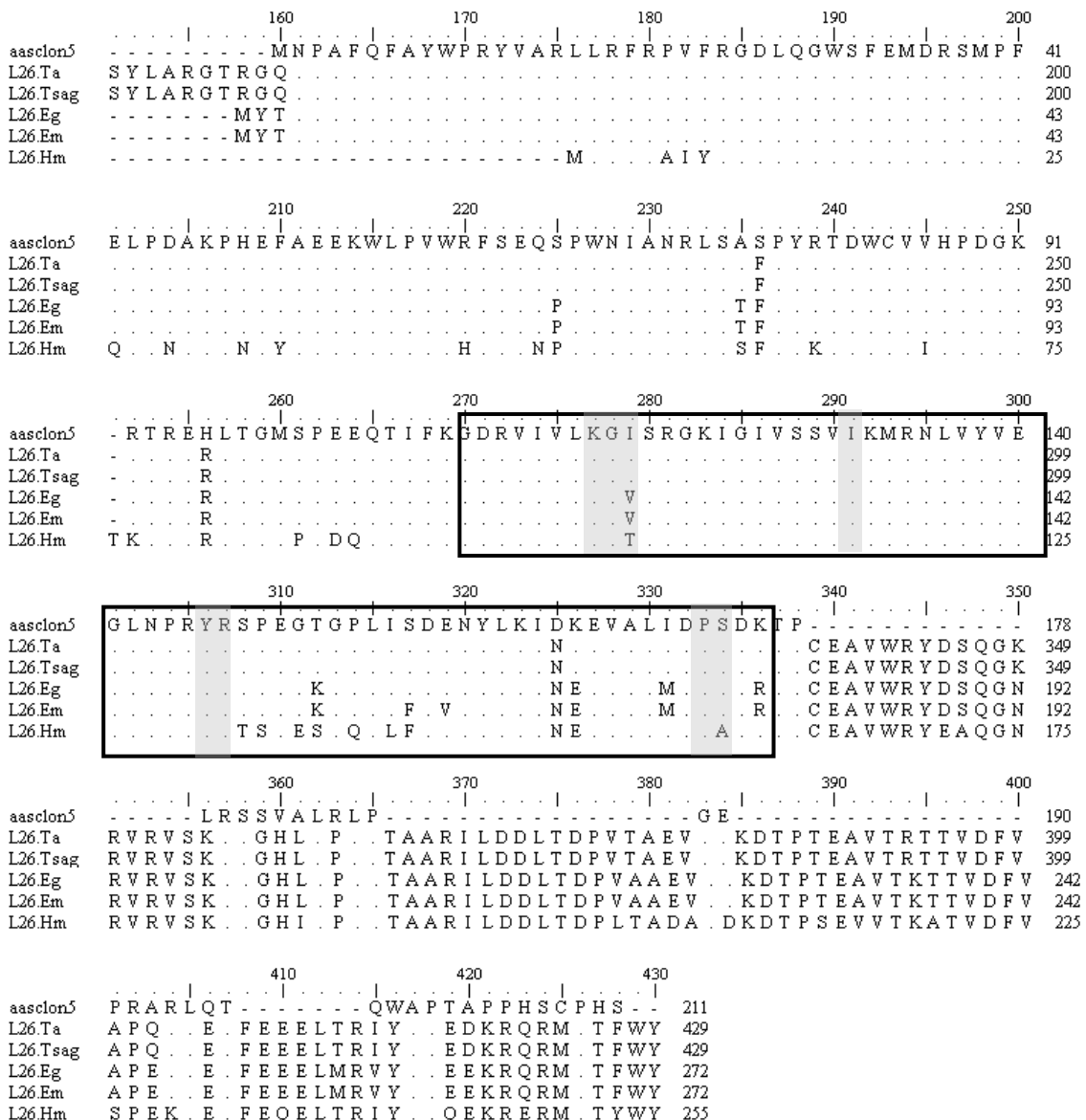


Figura 40. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5, con Proteína ribosomal L26 de *T. asiatica* (OCK25018.1) (L26.Ta), de *T. saginata* (OCK41683.1) (L26.Tsag), *E. granulosus* (CDS19963.1) (L26.Eg), Proteína ribosomal L26 de *E. multilocularis* (CDI98305.1) (L26.Em) y ribosomal L26 de *H. microstoma* (CDS28262.1) (L26.Hm), se destaca entre el recuadro la secuencia que forma parte del dominio KOW_RPL26 y sombreado en gris los aminoácidos que se unen al ARN.

4.4.6. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°6

La secuencia nucleotídica de este grupo se encuentra incompleta, encontrándose solo el extremo 5` que inicia con la secuencia SL e inmediatamente se encuentra el codón ATG, pero en el extremo 3` no se observa codón de parada ni cola de poli-A, por lo cual no fue posible determinar el marco abierto de lectura. Sin embargo, fue posible obtener una proteína deducida incompleta de 96 aminoácidos (Figura 41), con 6 sitios potenciales de fosforilación (Figura 42) y sin sitios potenciales de acetilación, miristilación ni fosforilación.

Se encontró la presencia de un dominio funcional conocido como YjeF_N cuya actividad está asociada a procesos catalíticos (Figura 43). No se encontró existencia de péptido señal ni segmento transmembrana.

	ggcccccttaccttgcaattttgt														ATG	TTG	GTC	GCT	CTG	TGC	GCG	CGT		47
								M	L	V	A	L	C	A	R					8				
GTT	CCT	TGT	TCT	CTC	ATA	AAT	TCT	ACC	TTT	CGC	TTC	ACC	AGA	GCC						92				
V	P	C	S	L	I	N	S	T	F	R	F	T	R	A						23				
ATG	TCC	ACC	AGT	ATC	AAA	TTT	CTT	AGT	CAG	GAG	GAG	GCG	CAG	AAG						137				
M	S	T	S	I	K	F	L	S	Q	E	E	A	Q	K						38				
ATA	GAT	GAA	GAA	CTC	TTC	ACC	GAA	TAT	GCC	TTT	TCA	GTC	GAC	CAA						182				
I	D	E	E	L	F	T	E	Y	A	F	S	V	D	Q						53				
CTT	ATG	GAG	CTT	GCG	GGT	TTT	AGT	TGT	GCT	GTC	GCT	ATT	CAT	AGC						227				
L	M	E	L	A	G	F	S	C	A	V	A	I	H	S						68				
GCC	TAT	CCT	CGA	TCT	TCA	ATG	AAG	ACT	TCA	GAT	GGT	GGA	GTT	TTG						272				
A	Y	P	R	S	S	M	K	T	S	D	G	G	V	L						83				
ATC	TGT	TGT	GGT	CCT	GGG	AAT	AAC	GGT	GGT	GAT	GGA	TTG	---							311				
I	C	C	G	P	G	N	N	G	G	D	G	L	...							96				

Figura 41. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°6. Sombreado en azul se encuentra la secuencia SL seguido en verde del codón de inicio, en el extremo 3` la secuencia carece de cola de poliA por lo cual se encuentra truncada.

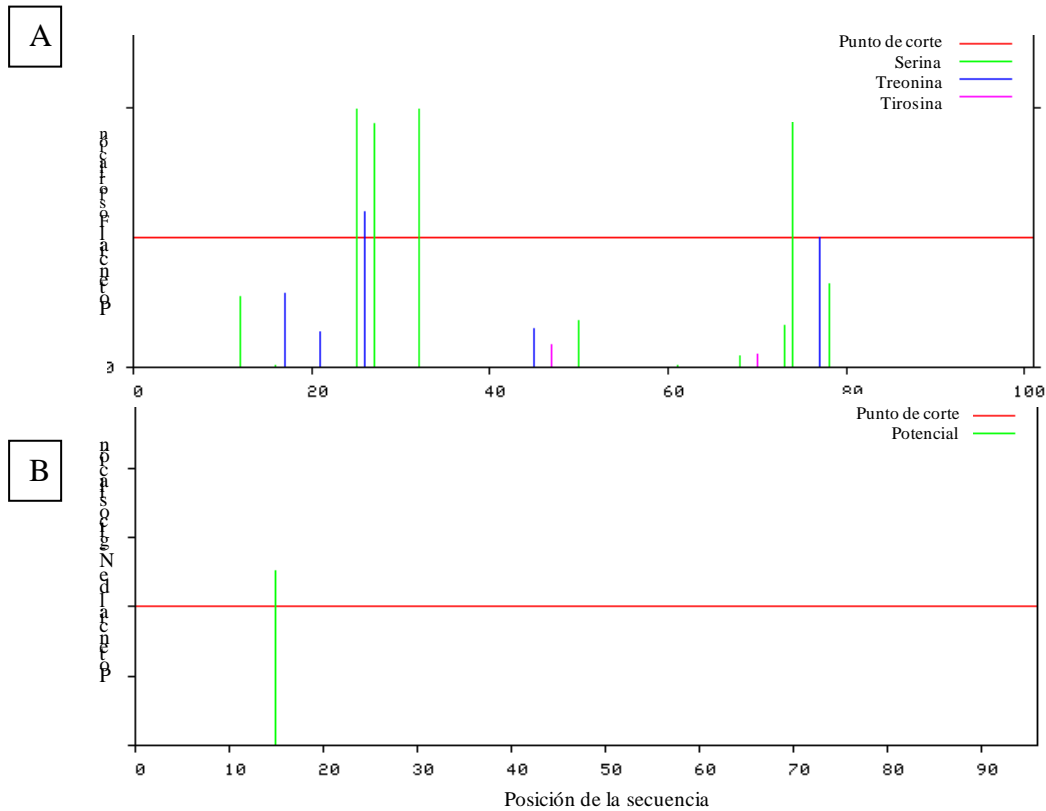


Figura 42. Aminoácidos potenciales a fosforilación (A) y a N-glicosilación (B) en la secuencia aminoácida deducida del grupo N°6, según el programa NetPhos 2.0 y NetNGlyc 1.0.



Figura 43. Ubicación del Dominio YjeF_N en la secuencia aminoácida deducida del grupo N°6, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

La estructura secundaria de la proteína se puede observar en la figura 44 donde existen 3 posible hélices α y algunas pocas conformaciones β y giros conectores, del mismo modo se observa las zonas hidrofílicas, algunas zonas flexibles, áreas más propensas a estar en superficie y alto índice antigénico en los extremos de la proteína.

La estructura tridimensional muestra similitud (70%) con proteínas de unión a apoAI (AI-BP) de ratón (2o8n.1.A) según el programa Swiss-Model, la posible estructura se observa en la figura 45.

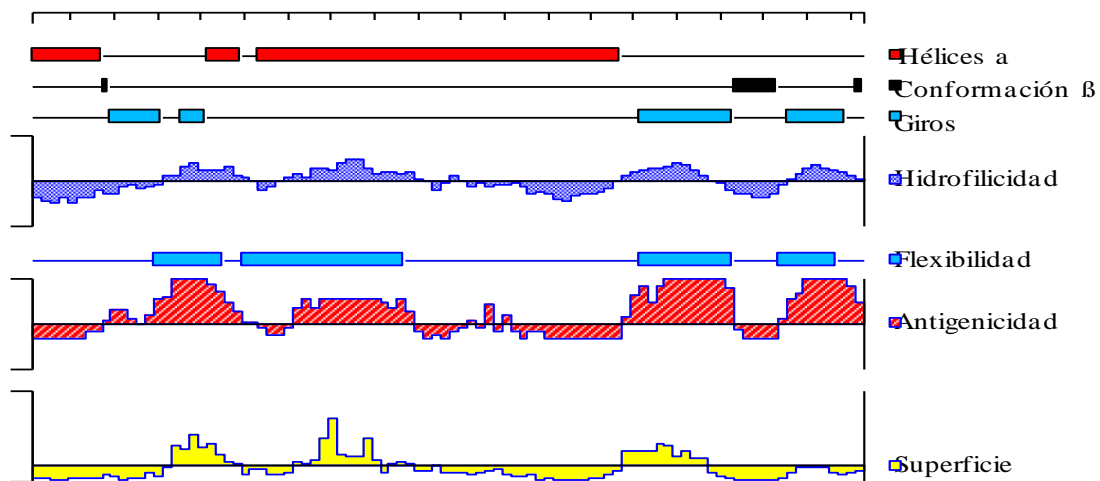


Figura 44. Estructura secundaria del grupo N°6 donde se observan las regiones α -hélices, conformación β , conexiones en giros y regiones flexibles, así como también la hidrofilicidad, el índice antigénico y la probabilidad de estar en superficie. Programa Protean (Lasergene).

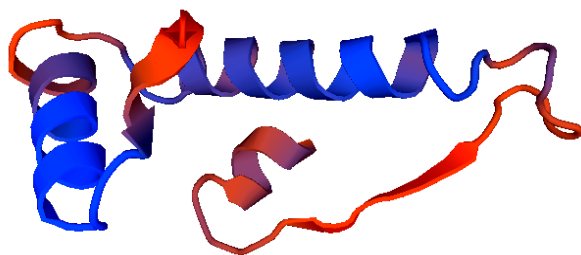


Figura 45. Estructura tridimensional de la proteína truncada deducida N°6, homóloga a proteína de unión a apoAI (AI-BP) de ratón (2o8n.1.A) según el programa Swiss-Model

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida con las secuencias depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ, se observó similitud con proteínas de unión a apolipoproteína AI de *T. saginata* (OCK37036.1), *T. asiatica* (OCK25545.1), *E. granulosus* (CDS24247.1), *E. multilocularis* (CAX16804.1), *H. sapiens* (CAC86580.1) y en menor grado con el dominio N-terminal YjeF_N de *S. mansoni* (CCD75736.1) (Tabla 10). El alineamiento múltiple de secuencia se realizó con las dos primeras secuencias nombradas anteriormente ya que fueron con las que presentó mayor porcentaje de similitud, se muestra un segmento conservado que corresponde al dominio YjeF_N, del mismo modo puede apreciarse que este segmento se encuentra truncado en esta molécula (Figura 46).

Tabla 9. Similitud de la secuencia del grupo N°6 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
De unión a apolipoproteína AI	<i>T. saginata</i>	(OCK37036.1)	98	97
De unión a apolipoproteína AI	<i>T. asiatica</i>	(OCK25545.1)	97	96
De unión a apolipoproteína AI	<i>E. granulosus</i>	(CDS24247.1)	94	94
De unión a apolipoproteína AI	<i>E. multilocularis</i>	(CAX16804.1)	86	86
De unión a apolipoproteína AI	<i>H. sapiens</i>	(CAC86580.1)	64	71
N-terminal YjeF_N	<i>S. mansoni</i>	(CCD75736.1)	70	70

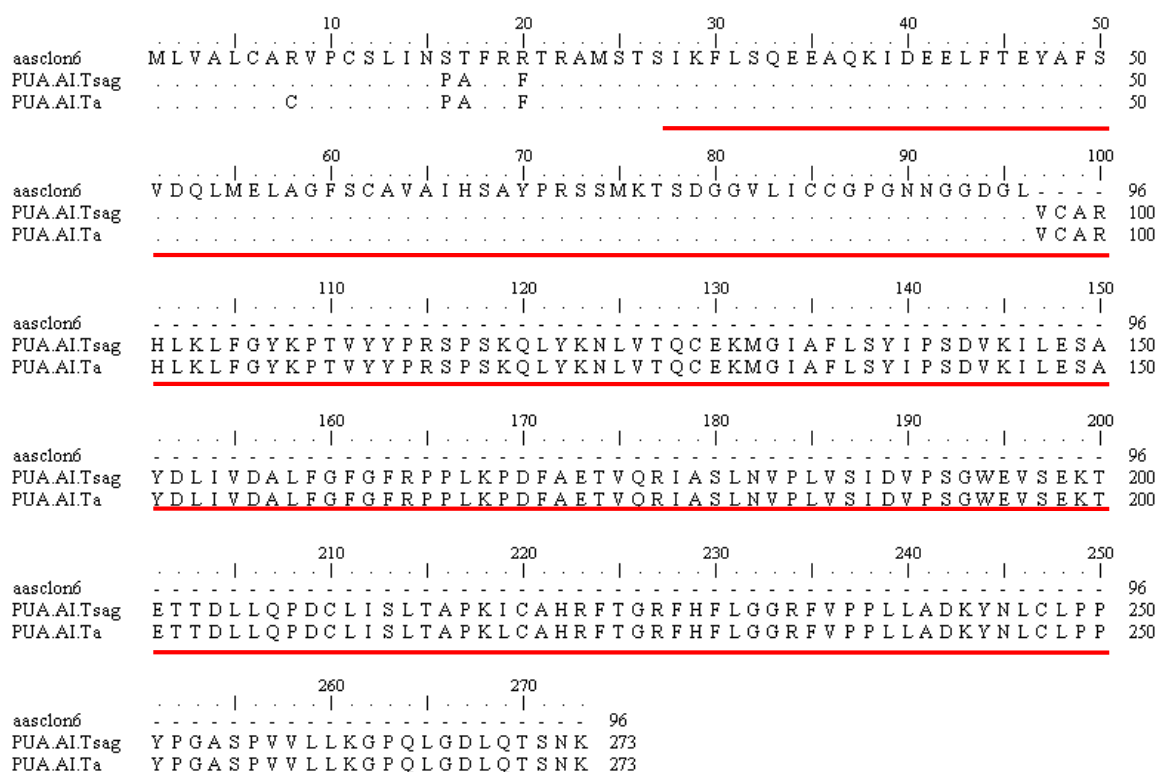


Figura 46. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida incompleta del grupo N°6 con la proteína de unión a Apolipoproteína AI de *T. saginata* (OCK37036.1) (PUA.AI.Tsag) y de *T. asiatica* (OCK25545.1) (PUA.AI.Ta). Subrayado se destacada la secuencia que forma parte del dominio YjeF_N

4.4.7. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°7

La secuencia aminoacídica deducida del grupo N°7 se observa en la figura 47, donde también se observa el codón de inicio en la posición 31 que se ubica 7 nt después de la secuencia SL de 23 nt en el extremo 5'. El marco abierto de lectura está conformado por 492 nt seguido de una región no traducible de 95 pb. La cola de poli-A

esta formada por 20 nt y comienza en la posición 597. La proteína deducida es de 163 aminoácidos con un peso molecular de 18,35 kDa y un punto isoeléctrico de 9,461. Posee 6 sitios potenciales de fosforilación (Figura 48), un sitio potencial para acetilación en S2 según los programas NetPhos 2.0 y NetAcet 1.0 server respectivamente y no se encontraron posibles sitios para miristilación ni glicosilación. Posee además un dominio NDK (Nucleosido Difosfato Kinasa) que se extiende desde el aminoácido 7 hasta el 152 (Figura 49) y cuya función es la síntesis de nucleosidos trifosfato, dicho dominio conforma una familia de proteínas denominadas NDK. No se encontraron resultados de existencia de péptido señal ni segmento transmembrana.

	ggtccttaccttgcaattttgt													atgctgc	ATG	TCG	GCG	GGA	CAA	45
															M	S	A	G	Q	5
CGT	CTC	ACT	TTG	GCC	ATT	TTC	AAA	CCT	GAC	GTG	CAG	CGA	ATT	GGA						90
R	L	T	L	A	I	F	K	P	D	V	Q	R	I	G						20
GTC	TAC	CGT	CAG	TAC	GCG	GAA	GAG	GCC	ATT	CGA	GGG	ATT	GGT	TTG						135
V	Y	R	Q	Y	A	E	E	A	I	R	G	I	G	L						35
GAA	CCA	CTG	GTC	CAC	CGC	GAG	TTC	CGT	ATG	TCT	CGA	GGA	CGC	GCG						180
E	P	L	V	H	R	E	F	R	M	S	R	G	R	A						50
GAG	GCC	TTT	TAT	GCT	GCA	CAC	CGA	GGT	GGT	CTA	GTG	TTT	TCC	TTT						225
E	A	F	Y	A	A	H	R	G	G	L	V	F	S	F						65
TCT	GCC	CTC	CCA	AAC	CCA	GGA	AAA	TTC	TTC	TAC	CAG	CGT	CTC	GTC						270
S	A	L	P	N	P	G	K	F	F	Y	Q	R	L	V						80
AAC	TAC	ATG	ATC	GCC	GGT	CCG	ATT	GGT	GTA	TAC	GTG	CTG	GCT	GGC						315
N	Y	M	I	A	G	P	I	G	V	Y	V	L	A	G						95
GAA	TCG	GCC	GTT	TCG	AAG	TGG	CGA	GAA	CTC	ATT	GGT	CCA	ACC	AAA						360
E	S	A	V	S	K	W	R	E	L	I	G	P	T	K						110
ACC	TAT	AGA	ACC	GTG	ATT	TTT	CAA	CCA	GCC	AGC	CTT	CGA	GGG	TGT						405
T	Y	R	T	V	I	F	Q	P	A	S	L	R	G	C						135
TTC	GGT	CTA	ACT	GAC	ACA	CGC	AAT	GGT	TTT	CAT	GGT	TCA	GAT	GGT						450
F	G	L	T	D	T	R	N	G	F	H	G	S	D	G						140
GAT	GAG	TCG	GCG	AAG	GAG	GAA	ATC	AAA	TTC	TTC	TTT	CCT	GAC	TTC						495
D	E	S	A	K	E	E	I	K	F	F	F	P	D	F						145
GAC	TTC	ACT	CTT	AAA	GAC	AAG	GTT	TGA	cgcctaactcttggaaggtgtcac											546
D	F	T	L	K	D	K	V	*												163
Tatgactggttgaaggcctctttaa	tagatctaaaagtcttcggctg	aaaaaaaaaaaa																		606
aaaaaaaaaaaa																				

Figura 47. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc del grupo N°7. En azul se resalta la secuencia SL, en verde el codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A

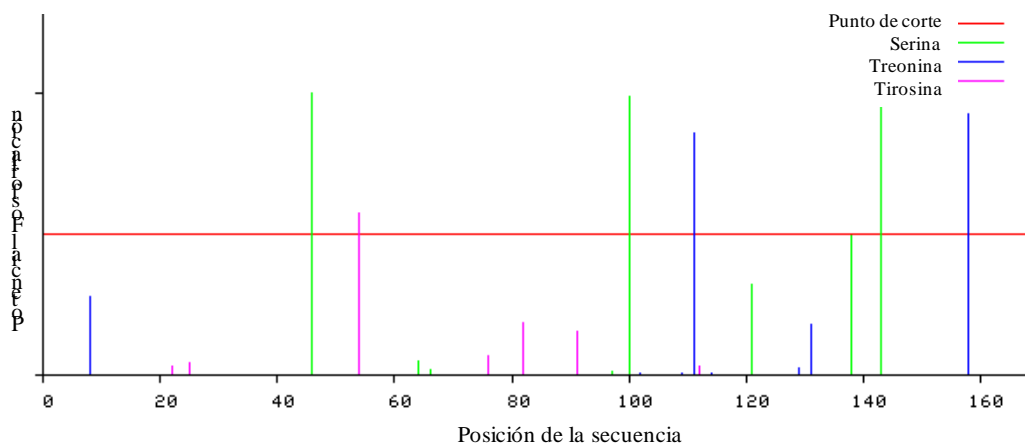


Figura 48. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°7, según el programa NetPhos 2.0.

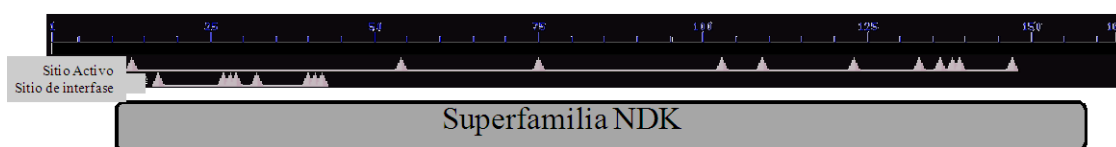


Figura 49. Ubicación del dominio NDK en la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°7, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

La estructura secundaria predicha según el programa Protean (Lasergene®) puede visualizarse en la figura 50, donde se muestran estructuras en hélices α , conformaciones β , algunos giros conectores y regiones, también se muestra el grado de hidrofiliidad, flexibilidad, antigenicidad y la posibilidad de encontrarse en superficie. La estructura tridimensional muestra similitud (34,8%) con la enzima nucleosido difosfato quinasa de *H. quadrata* (2zua.2) según el programa Swiss-Model (Figura 51).

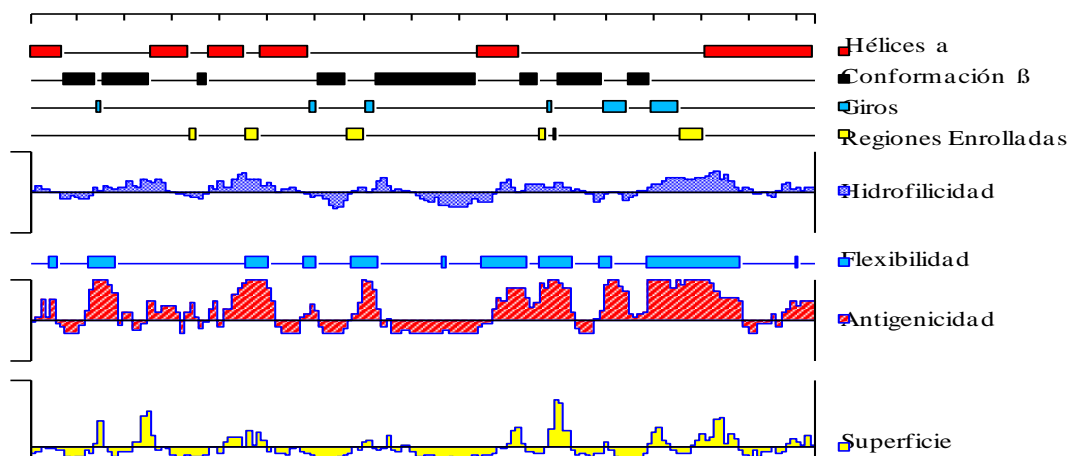


Figura 50. Estructura secundaria de la proteína deducida del grupo N°7 donde se observan las regiones hélices α , conformación β , giros, zonas flexibles, hidrofílicas y con posibilidad de estar expuestas a superficie. Programa Protean (Lasergene®).

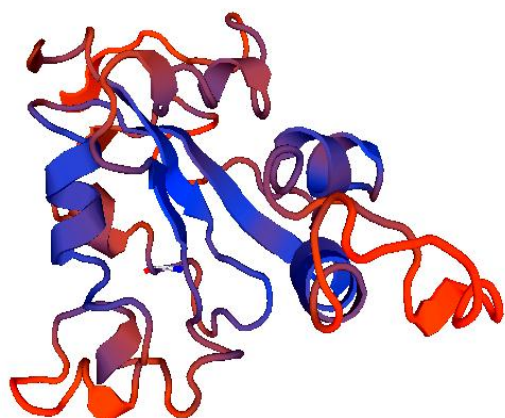


Figura 51. Estructura tridimensional de la proteína deducida N°7, homóloga al monómero de nucleosido difosfato kinasa (NDK) de *Haloarcula quadrata* (2zua.2) según el programa Swiss-Model

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida con las depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DBJ se observó similitud con proteínas nucleosido difosfato kinasa (NDK) de *T. asiatica* (OCK18630.1), *E. multilocularis* (CDJ06377.1), *T. solium* (CAD21552.1), *H. microstoma* (CDS29218.1) y de *S. mansoni* (CCD59864.1) (Tabla 11).

Se realizó el alineamiento múltiple de secuencia con nucleosido difosfato kinasa (NDK) de *T. asiatica* (OCK18630.1) y de *E. multilocularis* (CDJ06377.1) de mayor similitud con la secuencia del grupo N°7, y se observó un alto grado de conservación entre las secuencias homólogas, solo difieren en dos aminoácidos con la primera y en 16 con la segunda. Se observó la presencia de aminoácidos conservados ubicados en el sitio activo involucrado en la catálisis y otros involucrados en la interacción de interface multimérica (Figura 52).

Tabla 10. Similitud de la secuencia del grupo N°7 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Nucleosido difosfato kinasa	<i>T. asiatica</i>	(OCK18630.1)	91	91
Nucleosido difosfato kinasa	<i>E. multilocularis</i>	(CDJ06377.1)	82	82
Putativa nucleosido difosfato kinasa	<i>T. solium</i>	(CAD21552.1)	71	71
Nucleosido difosfato kinasa	<i>H. microstoma</i>	(CDS29218.1)	67	67
Nucleosido difosfato kinasa	<i>S. mansoni</i>	(CCD59864.1)	57	57

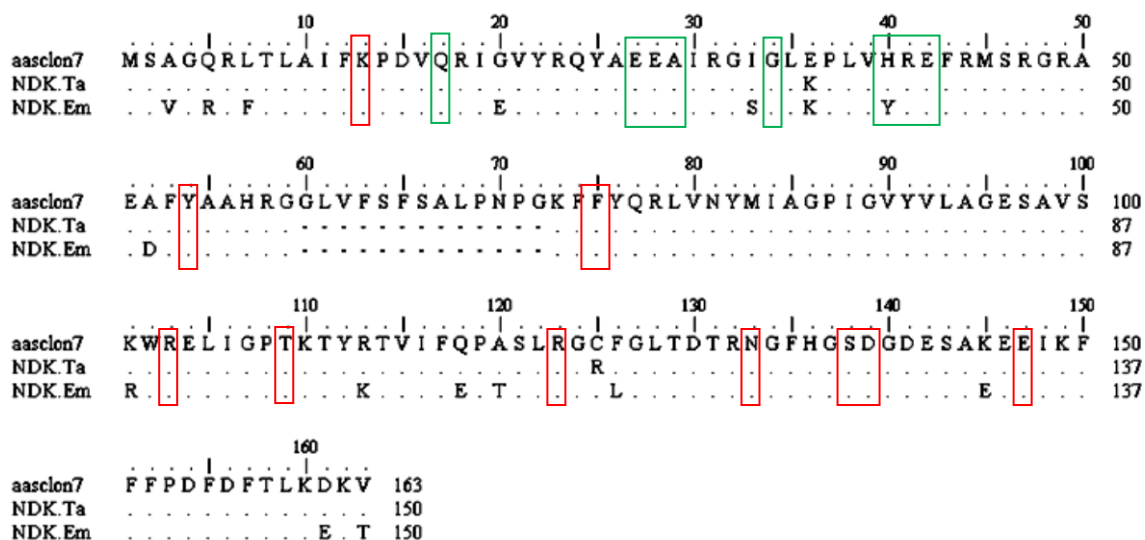


Figura 52. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°7, con las secuencias de las proteínas que presentaron mayor similitud; nucleosido difosfato kinasa *T. asiatica* (OCK18630.1) y de *E. multilocularis* (CDJ06377.1). Aminoácidos dentro de los recuadros rojos son sitios activos y fosforilados durante la catálisis. Aminoácidos dentro de los recuadros verdes son sitios de interacción interfase multimérica.

4.4.8. Análisis de la secuencia consenso del grupo N°8

La secuencia nucleotídica está formada por 605 nt, el codón de inicio se ubica en la posición 40, 16 nt después de la secuencia SL en el extremo 5'; el marco abierto de lectura está conformado por 327 nt seguido de una región no traducible de 239 pb. La cola de poli-A esta formada por 28 nt y comienza en la posición 577 (Figura 53).

La proteína deducida es de 108 aminoácidos con un peso molecular de 12,51 kDa y un punto isoeléctrico de 11,434. Posee cuatro sitios potenciales de fosforilación según el programa NetPhos 2.0 (Figura 54), no se encontraron sitios potenciales para miristilación, glicosilación ni acetilación.

Posee también un segmento transmembrana que es considerado péptido señal cuyo clivaje ocurre entre los aminoácidos 23 y 24 (Figura 55), por lo que probablemente esta sea una proteína de excreción/secreción.


```

ggtcaccttaccttgcaattttgtatggttcaagcagtaaa ATG CGC 45
M R 2
GCT TGG ATT TTA TGC GCT CTC GTG ATC GCC GCC CTC GTC GCC TGC 90
A W I L C A L V I A A L V A C 17
TTC CAG CTG GCT GAG GOC AAG CCC GCG GTG ACA ATA GAC AGG GCG 135
F Q L A E A K P A V T I D R A 32
CCT CAT GAC CTC GAT GTC AGT GGA GGG GGT GAC AAG GAA ATC GAG 180
P H D L D V S G G G D K E I E 47
GGT AGA OCC AAA AAA CAA CGA CGC AAG AAG AGC GGC AAA TAC GGC 225
G R P K K Q R R K K S G K Y G 62
CAA AAT CGA GGC AAA TTG AAC CAG CGT CGC CAA AAG CCA AGG AGA 270
Q N R G K L N Q R R Q L P R R 77
CGG CGT TTC AAG AGA COC CGC TCT GTT GAG GAT GAT CGC AAA CGC 315
R R F K R P R S V E D D R K R 92
GGT AGA AAA TGC GAA AAC GGT AAA CGC GGG AGG AAC TGC AAG CGG 360
G R K C E N G K R G R N C K R 107
CAG TAG gggaaatctctcctggttaacttaattgacgtactccactttttacgatgca 417
Q * 108
ccttgtcactccataaacacacacagatagacacacagacaaactcattaaacgcattt 477
ttacaatttttccoctccctttctgctcaaatgcttgatttgtatcctggttgcttg 537
ctttggcgattt aaat actttgctctt cgtttcggctct aaaaaaaaaaaaaaaaaa 597
aaaaaaaaa 605

```

Figura 53. Secuencia nucleotídica y aminoácídica deducida del ADNc del grupo N°8. En azul se resalta la secuencia SL, en verde el codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

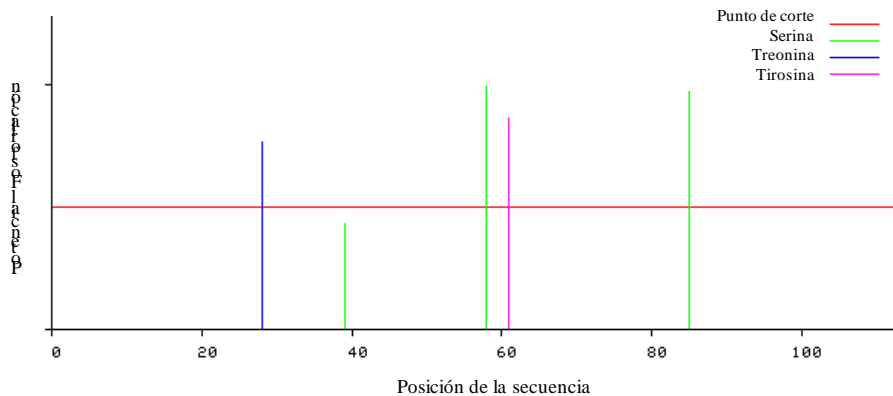


Figura 54. Aminoácídicos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoácídica deducida del grupo N°8, según el programa NetPhos 2.0.

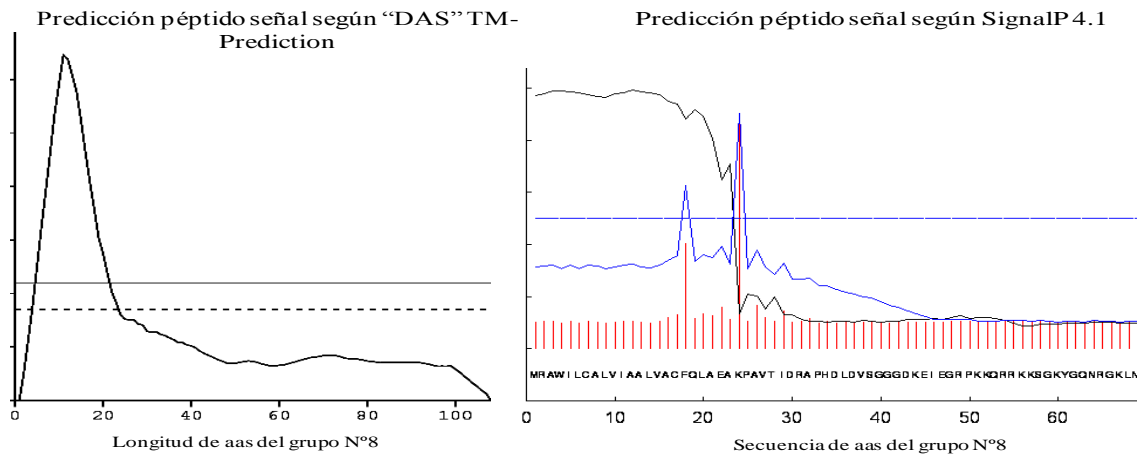


Figura 55. Predicción de segmento transmembrana y péptido señal por los programas “DAS” *Transmembrane Prediction Server* y *SignalP 4.1 Server* en la secuencia aminoacídica del grupo N°8.

La estructura secundaria deducida de la proteína del grupo N°8 muestra que está formada por tres hélices α y una conformación β y algunos giros conectores; la primera hélice α corresponde a una hélice transmembrana y posterior a esta la proteína tiene altas posibilidades de encontrarse en superficie, con alto índice de hidrofiliidad, y de antigenicidad, además de amplias zonas flexibles lo que indica la posibilidad de que sea una proteína antigénica de excreción/secreción (Figura 56). No se encontró un modelo de estructura tridimensional para esta proteína.

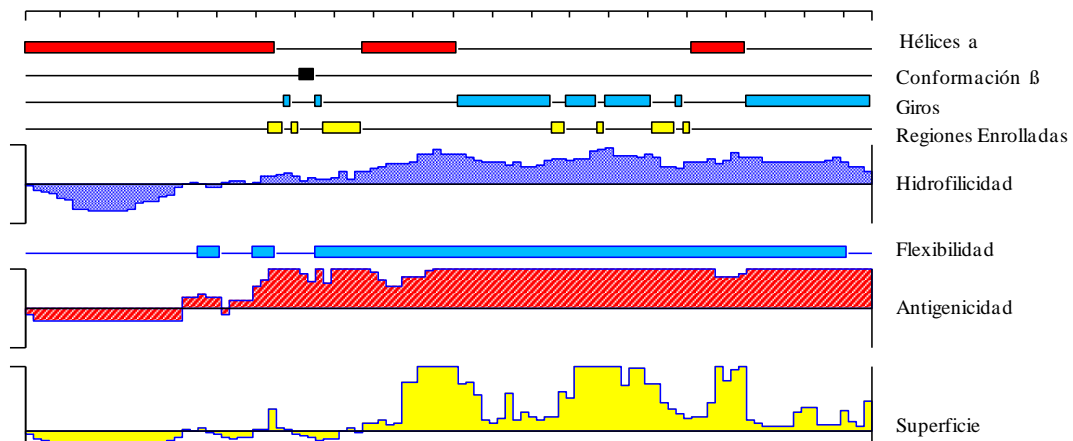


Figura 56. Estructura secundaria de la proteína deducida del grupo N°8 donde se observan las regiones hélices α , conformación β , giros, zonas flexibles, así como también, las zonas hidrofílicas y con posibilidad de estar expuestas en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida con las depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ se observó similitud con proteínas hipotéticas de

T. solium (CAD21546.1), *T. asiatica* (OCK22069.1), *T. saginata* (OCK35157.1), *E. granulosus* (CDS23826.1) y *E. multilocularis* (CDI99643.1) (Tabla 12). Se realizó el alineamiento múltiple de secuencias entre las secuencias antes mencionadas con la secuencia del grupo N°8, y se observó un alto grado de conservación con la proteína de la misma especie, mientras que presentó un grado medio de conservación con las secuencias de los organismos cercanos (Figura 57). No se encontró un modelo de estructura tridimensional para esta proteína.

Tabla 11. Similitud de la secuencia del grupo N°8 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Proteína Hipotética	<i>T. solium</i>	(CAD21546.1)	99	99
Proteína Hipotética	<i>T. asiatica</i>	(OCK22069.1)	86	86
Proteína Hipotética	<i>T. saginata</i>	(OCK35157.1)	85	84
Proteína deducida	<i>E. granulosus</i>	(CDS23826.1)	70	70
Proteína deducida	<i>E. multilocularis</i>	(CDI99643.1)	70	70

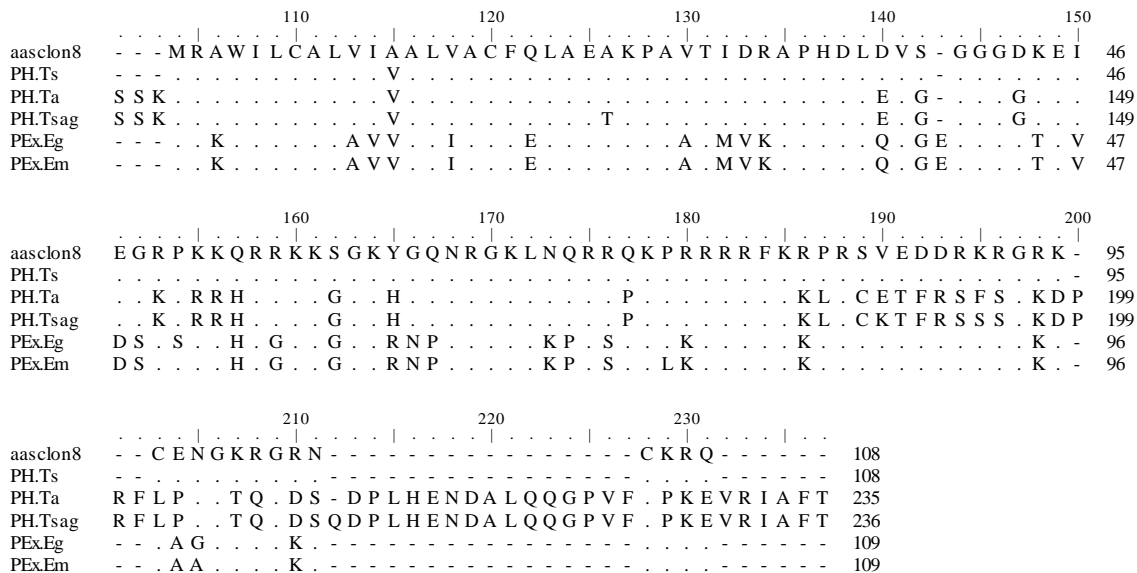


Figura 57. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida del grupo N°8, con la secuencia de las proteínas hipotéticas de *T. solium* (CAD21546.1) (PH.Ts), *T. asiatica* (OCK22069.1) (PH.Ta), *T. saginata* (OCK35157.1) (PH.Tsag), y con la proteína expresada de *E. granulosus* (CDS23826.1) (PEx.Eg) y de *E. multilocularis* (CDI99643.1) (PEx.Em).

4.4.9. Análisis de la secuencia N°9

La secuencia nucleotídica está formada por 1190 nt, el codón de inicio se ubica en la posición 29, 5 nt después de la secuencia SL en el extremo 5'. El marco abierto de lectura está conformado por 1077 nt seguido de una región no traducible de 57 pb. La cola de poli-A esta formada por 33 nt y comienza en la posición 1157. La proteína deducida es de 358 aminoácidos con un peso molecular de 38,88 kDa y un punto isoeléctrico de 4,899 (Figura 58).

La secuencia aminoacídica deducida posee 7 sitios potenciales a fosforilación (Figura 59), cabe destacar que según el programa Motif Scan la treonina de la posición 174 es un posible sitio de fosforilación por quinasas específicas, conocidas como ATM quinasa (*Ataxia Telangiectasia Mutated*, siglas en inglés) que son proteínas serina/treonina quinasas que se reclutan y activan cuando existe algún daño en el ADN de doble hélice originando el final del ciclo celular y la apoptosis. No se encontraron sitios potenciales para acetilación, miristilación ni glicosilación. La secuencia además contiene dos dominios de repetición HEAT, que presenta baja similitud de secuencia, pero considerable semejanza estructural, que involucra pequeñas repeticiones en hélices (Figura 60). No se encontraron resultados de existencia de péptido señal ni segmento transmembrana.

La estructura secundaria de la proteína se puede observar en la figura 61 donde básicamente está formada solo por hélices α y algunas pocas conformaciones β y giros conectores, del mismo modo se observan las zonas hidrofílicas, flexibles, las zonas más propensas a estar en superficie y el índice antigénico. La estructura tridimensional muestra similitud (41%) con la enzima deoxipusina hidroxilasa de humano (4d50.1) según el programa Swiss-Model (Figura 62), donde se observa las repeticiones de hélices que caracterizan al dominio HEAT.

ggtcaccttaccttgcaattttgt													atgac	ATG	CCT	CCT	GTT	GCG	AAG	46
														M	P	P	V	A	K	6
CCG	CAT	GCT	GTC	TCC	GAA	GAA	GAG	TTG	CGC	ACT	TGG	GGC	GTT	AAG	91					
P	H	A	V	S	E	E	E	L	R	T	W	G	V	K	21					
ATC	CGT	GAC	CCC	ACG	GTG	CCT	CTT	GTG	GAA	CGC	GCT	CAT	GCA	ATG	136					
I	R	N	P	T	V	P	L	V	E	R	A	H	A	M	36					
TGG	GGT	CTA	CGC	CAC	GCG	CGG	GAG	CCC	CTT	GCC	ACA	CAC	CTA	CTG	181					
W	G	L	R	H	A	R	E	P	L	A	T	H	L	L	51					
GCT	GCC	TAC	GTG	ACC	GAA	GTC	GTC	CCC	CCG	GAA	CCG	TCC	TCT	AAC	226					
A	A	Y	V	T	E	V	V	P	P	E	P	S	S	N	66					
GCC	TTA	CTC	CAA	CAC	GAG	GCC	GCT	TAC	TGT	CTG	GGT	CAG	CGA	GGC	271					
A	L	L	Q	H	E	A	A	Y	C	L	G	Q	R	G	81					
GAC	CCT	TCG	GCT	GTC	CCC	GAT	CTT	GAA	GCC	GCA	CTG	AGA	GAT	TCT	316					
D	P	S	A	V	P	D	L	E	A	A	L	R	D	S	96					
CGA	CAC	GAG	CCC	ATT	GTG	CGT	CAC	GAG	GCC	GCA	GAG	GCC	CTG	GCC	361					
R	H	E	P	I	V	R	H	E	A	A	E	A	L	A	111					
GCC	CTT	GCC	TCC	GCA	CCT	GGA	GTG	GAT	GTG	GAG	CAT	ATC	AAG	AGA	406					
A	L	A	S	A	P	G	V	D	V	E	H	I	K	R	126					
GTG	CTG	ACG	GAA	TTT	CGC	GGC	ATC	GAC	ATC	GTT	GTG	GTC	GCT	GAG	451					
V	L	T	E	F	R	G	I	D	I	V	V	V	A	E	141					
ACA	TGC	GAA	ATC	GGT	CTG	GGT	CGC	ATC	GCC	TGG	CTC	CAG	CAG	CCC	496					
T	C	E	I	G	L	G	R	I	A	W	L	Q	Q	P	156					
AAC	AAG	GCA	CCT	GAT	CCT	GCA	GCG	ATG	TGC	GCC	GAG	GCA	GAG	TTT	541					
N	K	A	P	D	P	A	A	M	C	A	E	A	E	F	171					
CCC	AAC	ACC	ATC	GAC	CCT	TCG	CCC	GCC	TTC	GAG	CCT	GAC	TCC	ACG	586					
P	N	T	I	D	P	S	P	A	F	E	P	D	S	T	186					
TTC	AGT	GTG	GCA	GAG	CTA	CGT	CGC	ATC	CTC	CTC	TCT	CCC	TCG	TCT	631					
F	S	V	A	E	L	R	R	I	L	L	S	P	S	S	201					
TCT	CTC	TTC	GCT	CGT	TAC	CAA	GCT	CTC	TTC	TCC	CCT	TCG	CAA	CGC	676					
S	L	F	A	R	Y	Q	A	L	F	S	P	S	Q	R	216					
TGC	TGT	AGT	CTC	TGC	TTA	CGA	CTC	TAC	TTC	GCC	ATC	GCC	ACA	TTT	721					
C	C	S	L	C	L	R	L	Y	F	A	I	A	T	F	231					
CTC	TTA	GAG	GTT	GTG	GAA	ACC	CTC	TCC	GAG	TCG	TTG	GCT	GCC	CCG	766					
L	L	E	V	V	E	T	L	S	E	S	L	A	A	P	246					
GGC	TCC	GCA	CAA	TTT	CGT	CAC	GAG	GTG	GCT	TTC	ATC	CTT	GGA	CAG	811					
G	S	A	Q	F	R	H	E	V	A	F	I	L	G	Q	261					
CTT	AGC	ATC	ACT	CGA	ACT	GGC	AAC	CCC	TTG	ATT	GAG	CGA	CTG	AAT	856					
L	S	I	T	R	T	G	N	P	L	I	E	R	L	N	276					
GAT	CGC	CAG	GAG	GCT	CCC	ATG	GTT	CGT	CAT	GAG	GCG	GCT	ATG	GCA	901					
D	R	Q	E	A	P	M	V	R	H	E	A	A	M	A	291					
TTA	GGA	GAG	GTG	GCA	GGA	GCT	GCC	GAA	GCT	GAG	GAA	GGT	GAT	GGT	946					
L	G	E	V	A	G	A	A	E	A	E	E	G	D	G	306					
AGC	GAG	AAC	TCT	TTG	GCC	ATA	AGG	GCA	CGT	CAA	CCC	CTA	CTC	ATG	991					
S	E	N	S	L	A	I	R	A	R	Q	P	L	L	M	321					
GGA	TGT	AAG	GAC	CCC	GAA	CCG	GTT	GTG	CGG	GAC	TCC	TGT	GCT	CTG	1036					
G	C	K	D	P	E	P	V	V	R	D	S	C	A	L	336					
GCT	CTT	GAT	ATG	GCC	GAC	TAT	GTG	GCC	TCA	AAT	GAC	CGA	TTC	CAA	1081					
A	L	D	M	A	D	Y	V	A	S	N	D	R	F	Q	351					
TTT	GCT	GAG	GTG	CCT	ACG	TGT	TAA	ggtggacattttgtgtgaattttgctaa							1132					
F	A	E	V	P	T	C	*							358						
gaaa tacactaggtaatagggtctc													aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1190						

Figura 58. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc de la secuencia N°9. Sombreado en azul se encuentra la secuencia SL, en verde el codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

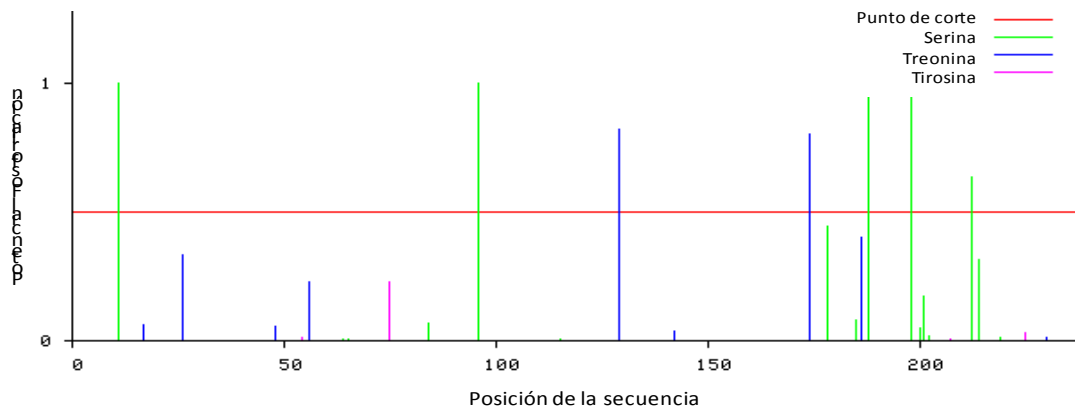


Figura 59. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°9, según el programa NetPhos 2.0.



Figura 60. Ubicación de los Dominios HEAT en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°9, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

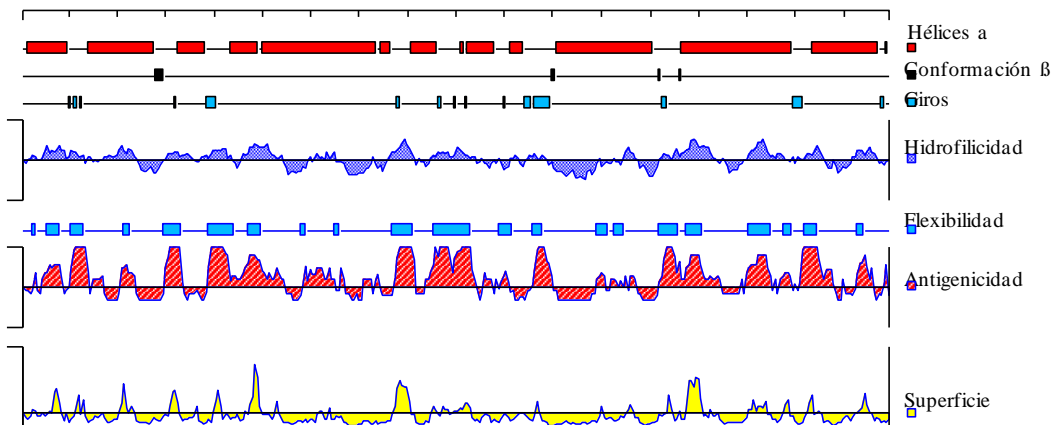


Figura 61. Estructura secundaria de la proteína deducida de la secuencia N°9 donde se observan las regiones hélices α , conformación β , giros, flexibles, así como también las zonas hidrofílicas y con posibilidad de estar expuestas en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

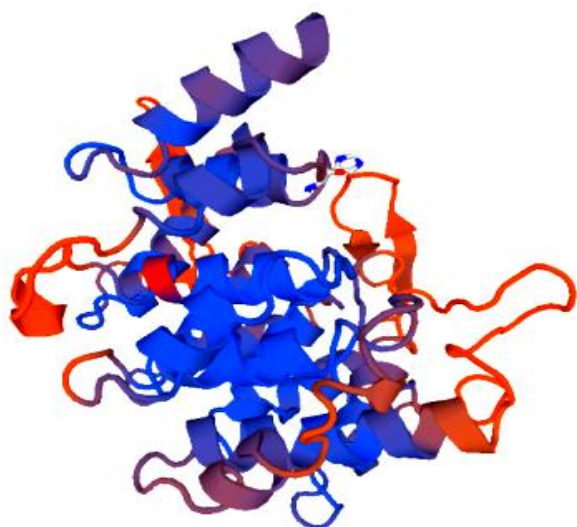


Figura 62. Estructura tridimensional de la proteína deducida N°9, semejante a una enzima de deoxipusina hidroxilasa de humano (4d4z.2) según el programa Swiss-Model

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida con las de las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ se observó similitud con enzimas de tipo hidroxilasa-monooxigenasa de *T. asiatica* (OCK25463.1), *T. saginata* (OCK38643.1), *E. multilocularis* (CUT99304.1), *E. granulosus* (CDS18585.1), *H. microstoma* (CDS31349.1) y *S. mansoni* (CBI71140.1) (Tabla 13). Se realizó alineamiento múltiple de secuencia entre las 4 primeras moléculas antes señaladas y la secuencia N°9, y se observa un alto grado de conservación entre las secuencias y semejanza en la longitud de las mismas (Figura 63).

Tabla 12. Similitud de la secuencia N°9 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Hidroxilasa-monooxigenasa	<i>T. asiatica</i>	(OCK25463.1)	90	90
Hidroxilasa-monooxigenasa	<i>T. saginata</i>	(OCK38643.1)	85	86
Hidroxilasa-monooxigenasa	<i>E. multilocularis</i>	(CUT99304.1)	83	83
Hidroxilasa-monooxigenasa	<i>E. granulosus</i>	(CDS18585.1)	83	83
Hidroxilasa-monooxigenasa	<i>H. microstoma</i>	(CDS31349.1)	71	72
Hidroxilasa-monooxigenasa	<i>S. mansoni</i>	(CBI71140.1)	46	46

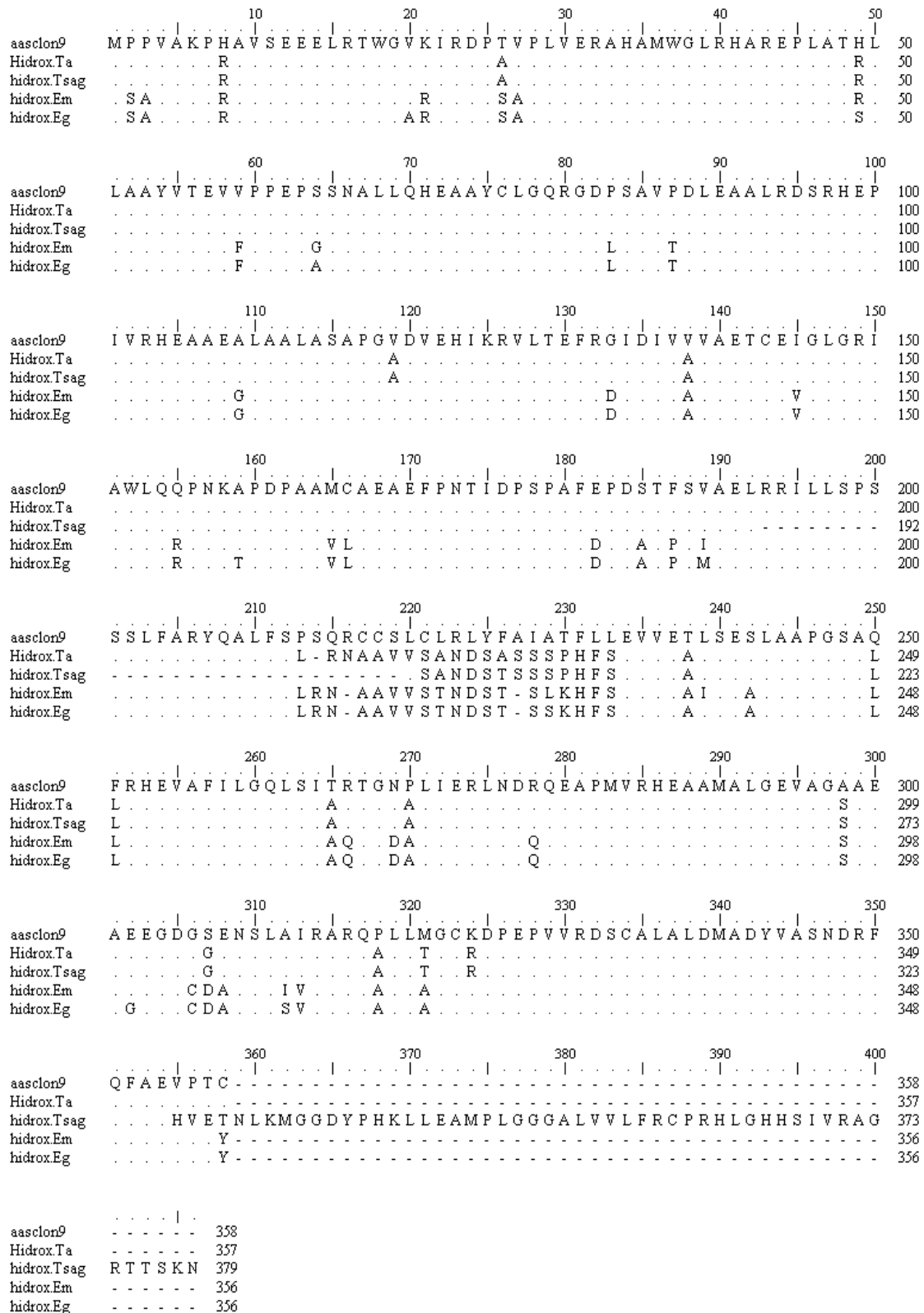


Figura 63. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°9, con las secuencias de las proteínas hidroxilasa-monooxigenasa de *T. asiatica* (OCK25463.1) (HidroX.Ta), *T. saginata* (OCK38643.1) (hidrox.Tsag), *E. multilocularis* (CDJ01643.1) (hidrox.Em) y de *E. granulosus* (CDS18585.1) (hidrox.Eg).

4.4.10. Análisis de la secuencia N°10

La secuencia nucleotídica N°10 está conformada por 560 nt, presenta en extremo 5' la secuencia SL de 23 nt seguida por el codón de inicio en la posición 24, el marco abierto de lectura está integrado por 315 nt seguido se encuentra una región no traducible de 222 nt donde se encuentra la cola de poli-A de 45 nt en el extremo 3'. La proteína deducida contiene 104 aa, con un peso molecular de 12,16 kDa y un punto isoelectrico de 8,949 (Figura 64).

La proteína presenta 8 sitios potenciales de fosforilación (Figura 65), no se encontraron sitios potenciales para acetilación, miristilación ni glicosilación. Se encontró según el programa "DAS", un segmento transmembrana de aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo amino de la proteína (figura 66); aunque no fue predicho ningún peptido señal, ni presencia de dominio funcional en la secuencia.

ggtcccttaccttgcaattttgt	ATG	CTT	GAA	ATT	GTT	GAA	CTC	CTG		47							
	M	L	E	I	V	E	L	L		8							
GTC	TCC	TAT	GTT	GCC	GAC	ATG	GAG	GCA	ACC	ACG	ACA	AGC	GGT	CAA		92	
V	S	Y	V	A	D	M	E	A	T	T	T	S	G	Q		23	
TCT	GTT	GAC	ACG	CTC	TGC	GAT	TCA	AAG	GAG	TTT	CAA	GAG	AAG	CTG		137	
S	V	D	T	L	C	D	S	K	E	F	Q	E	K	L		38	
AAA	GAA	GTG	TGG	GAC	AGA	CGC	GAG	GAG	TTA	CGA	TGT	GCT	GTA	AAG		182	
K	E	V	W	D	R	R	E	E	L	R	C	A	V	K		53	
CAA	AAT	AAT	GCA	GTG	CAG	AAC	TTC	ACC	CGC	AGT	TAT	GGC	TCC	TCC		227	
Q	N	N	A	V	Q	N	F	T	R	S	Y	G	S	S		68	
CGA	CGA	AAG	AAC	TTG	ATG	CCT	CGG	TCT	GGC	GGA	TGG	TGG	TCA	CTG		272	
R	R	K	N	L	M	P	R	S	G	G	W	W	S	L		83	
CAG	ACA	GTT	GGA	CAA	AGG	GAT	GCT	CAA	AAG	AGC	TTA	CAA	TTA	AGC		317	
Q	T	V	G	Q	R	D	A	Q	K	S	L	Q	L	S		98	
AGG	CGA	CAG	TGG	TTC	CAT	TAA	ggcatcagtc	aatcggtg	caagt	cgagcttg						370	
R	R	Q	W	F	H	*										104	
g	c	e	t	t	c	t	c	e	c	t	c	e	c	c	g	t	430
a	t	t	a	t	t	t	a	a	c	c	a	c	c	t	c	g	490
A	t	a	a	a	a	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	550
a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	560

Figura 64. Secuencia nucleotídica y aminoácídica deducida de ADNc de la secuencia N°10. Sombreado en azul se encuentra la secuencia SL, seguido en verde del codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

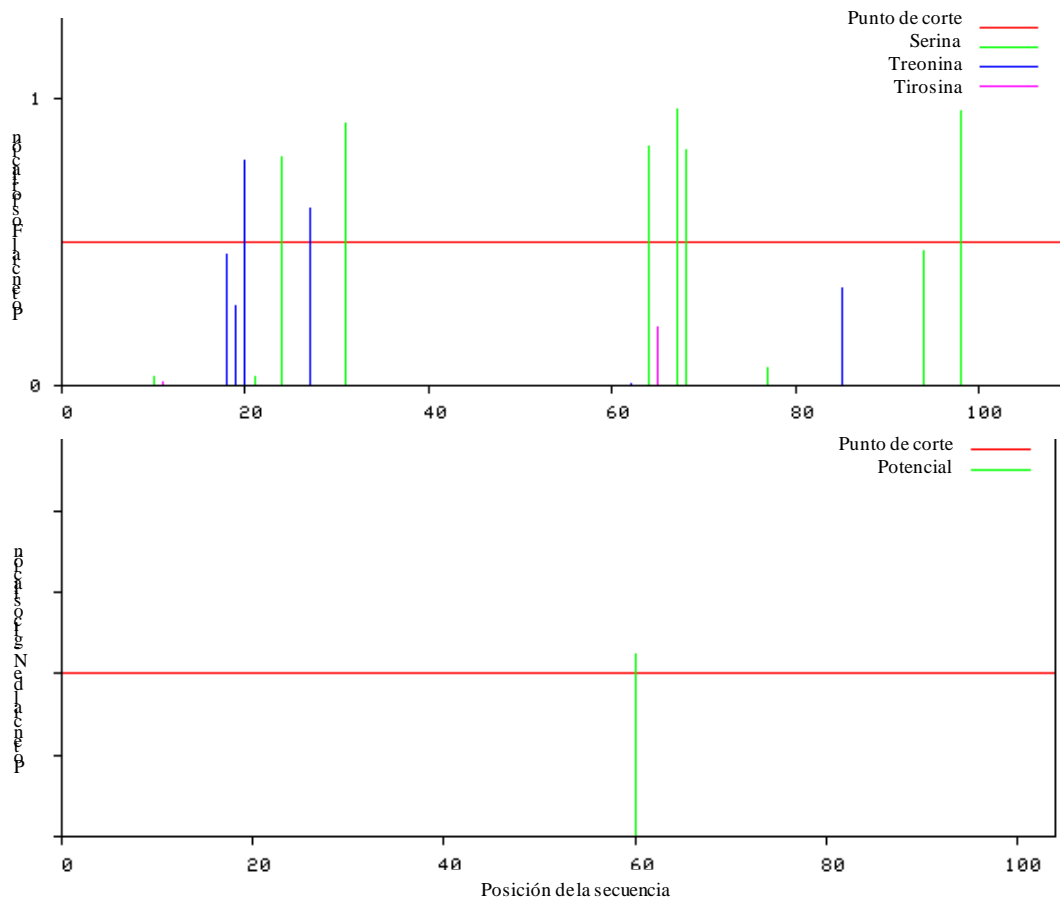


Figura 65. Aminoácidos potenciales a fosforilación (A) y a N-glicosilación (B) en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°10, según el programa NetPhos 2.0 y NetNGlyc 1.0.

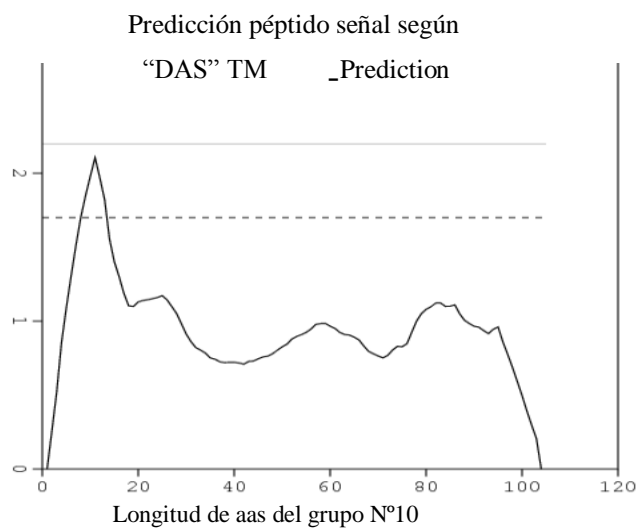


Figura 66. Predicción de segmento transmembrana con el programas "DAS" *Transmembrane Prediction Server* en la secuencia aminoacídica de la secuencia N°10.

La estructura secundaria de la proteína deducida refleja que está conformada por 3 hélices α y 3 conformaciones β y algunos otros giros y regiones enrolladas, en gran proporción de la molécula se observa alto grado hidrofílico y de antigenicidad y varias zonas flexibles.

Al comienzo de la molécula aproximadamente en los primeros 15 aminoácidos se observa un bajo índice hidrofílico con baja probabilidad de estar en superficie, característica indicativa de un posible péptido señal (Figura 67), resultado que coincide con el mostrado con el programa “DAS”-transmembrane prediction server, aunque no fue predicho ningún péptido señal. No se encontró un modelo de estructura tridimensional para esta proteína.

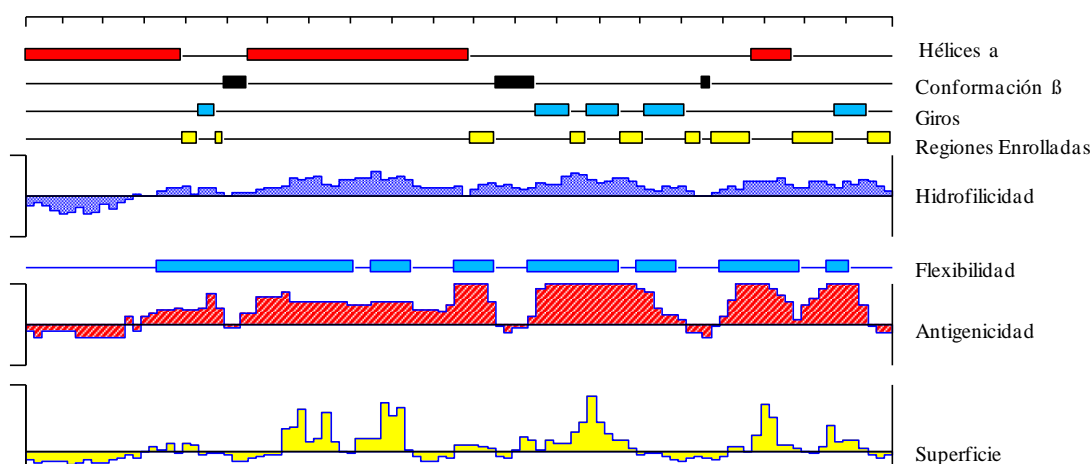


Figura 67. Estructura secundaria de la proteína deducida de la secuencia N°10 donde se observan las regiones hélices α , conformación β , giros, zonas flexibles, así como también las áreas hidrofílicas y con posibilidad de estar expuestas en superficie. Programa Protean (Lasergene®).

La comparación de la secuencia N°10 con las de las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ permitió observar similitud con la proteína hipotética de *T. solium* (CAD21553.1), con la subunidad inhibidora de fosfatasa 1 de *T. asiatica* (OCK20519.1), *E. granulosus* (EUB60723.1) *E multilocularis* (CUT99660.1) y *H. microstoma* (CDS29831.2) (Tabla 14).

El alineamiento múltiple de la secuencia del grupo N°10 se realizó con la proteína hipotética de *T. solium* (PH.Ts) (CAD21553.1) de mayor similitud, con la que se obtuvo 100% de coincidencia, sin embargo la secuencia N°10 tiene 14 aminoácidos N-terminal más que la proteína homóloga (Figura 68).

Tabla 13. Similitud de la secuencia N°10 con la depositada en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga			Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Proteína hipotética			<i>T. solium</i>	(CAD21553.1)	100	100
Subunidad fosfatasa 1	inhibidora	de	<i>T. asiatica</i>	(OCK20519.1)	63	84
Subunidad fosfatasa 1	inhibidora	de	<i>E. granulosus</i>	(EUB60723.1)	72	72
Subunidad fosfatasa 1	inhibidora	de	<i>E. multilocularis</i>	(CUT99660.1)	69	69
Subunidad fosfatasa 1	inhibidora	de	<i>H. microstoma</i>	(CDS29831.2)	59	59

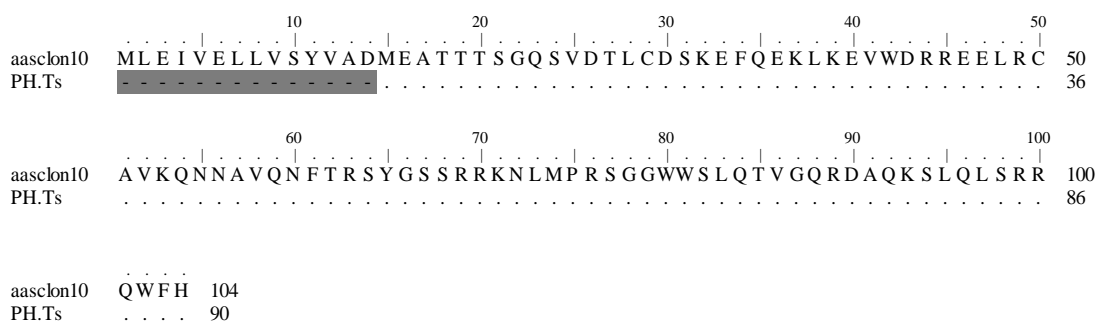


Figura 68. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°10, con la proteína que presentó mayor similitud en la base de datos; Proteína hipotética de *T. solium* (CAD21553.1) (PH.Ts).

4.4.11. Análisis de la secuencia N°11

La secuencia nucleotídica N°11 está conformado por 371 nt, presenta en el extremo 5` la secuencia SL de 23 nt, separado del codón de inicio por 55 nt ubicándose en la posición 78. El marco abierto de lectura está integrado por 216 nt, seguido se encuentra una región no traducible de 78 nt donde se encuentra la cola de poli-A de 19 nt en el extremo 3`.

La proteína deducida contiene 71 aas, con un peso molecular de 7,95 kDa y un punto isoeléctrico de 11,055 (Figura 69). La proteína presenta 5 sitios potenciales de fosforilación (Figura 70), 2 posibles segmentos transmembrana (Figura 71) y no se encontraron sitios probables para miristilación, acetilación, glicosilación ni presencia de péptido señal.

```

                                ggtcccttaccttgcaattttgtatgacaag      31
ctaagccaaggagaccggcgattattcgtttttgaagacgattcctc  ATG  ATC  CCC      87
                                                         M  I  P      3
GGT TTC CCA ATA TCA ATC AAA CCA GAA ATT GCT TGC AAA ACT TCA      132
G  F  P  I  S  I  K  P  E  I  A  C  K  T  S      18
TCG ATT TCC ATC GCT GCA CTC GTA TCT ACG GCG AGG ATT ATA AAC      177
S  I  S  I  A  A  L  V  S  T  A  R  I  I  N      33
CAT GCA ATT ATT TCA AAT TCG CAT ACA AAG ATT TGT GCC CTA GTT      222
H  A  I  I  S  N  S  H  T  K  I  C  A  L  V      48
TTA TGG TTG AAG CAT GGG ATG AAC AGG TGG AGA ACG ACA CGT TTC      267
L  W  L  K  H  G  M  N  R  W  R  T  T  R  F      63
CAT ACA AGA TTG AGT AAA TGC CTG  TAA  tctgatctgtctcaggtcattaat  317
H  T  R  L  S  K  C  L  *
ttacctaatcacctaattataatctctagt  aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa      371

```

Figura 69. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ADNc de la secuencia N°11. Sombreado en azul se encuentra la secuencia SL, en verde el codón de inicio, en rojo el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

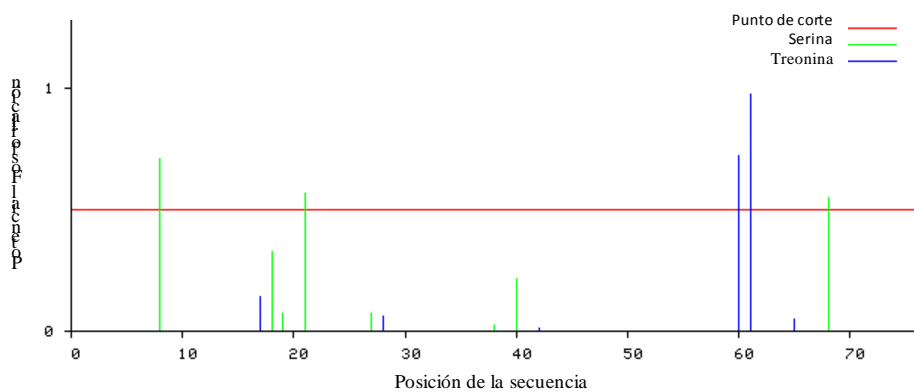


Figura 70. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia N°11, según el programa NetPhos 2.0.

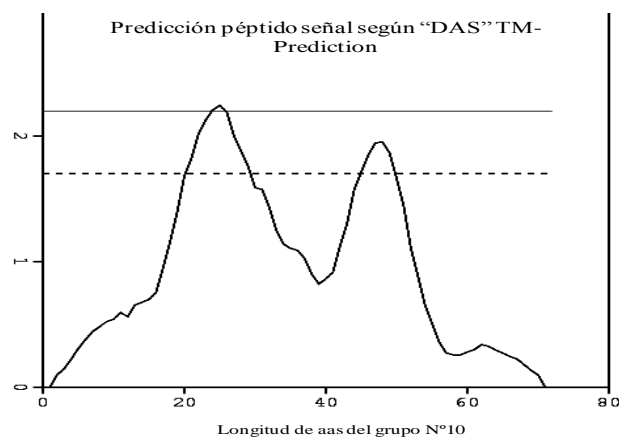


Figura 71. Predicción de segmentos transmembrana con el programas “DAS” *Transmembrane Prediction Server* en la secuencia aminoacídica de la secuencia N°11.

En cuanto a la estructura secundaria está formada por dos hélices α , tres conformaciones β y 4 giros conectores, presenta alto índice antigénico en algunas zonas de la proteína y bajo índice hidrofílico y pocas probabilidades de estar en superficie en las regiones señaladas como posible segmentos transmembrana por el programa “DAS” (Figura 72). No se encontró un modelado de estructura tridimensional para esta proteína.

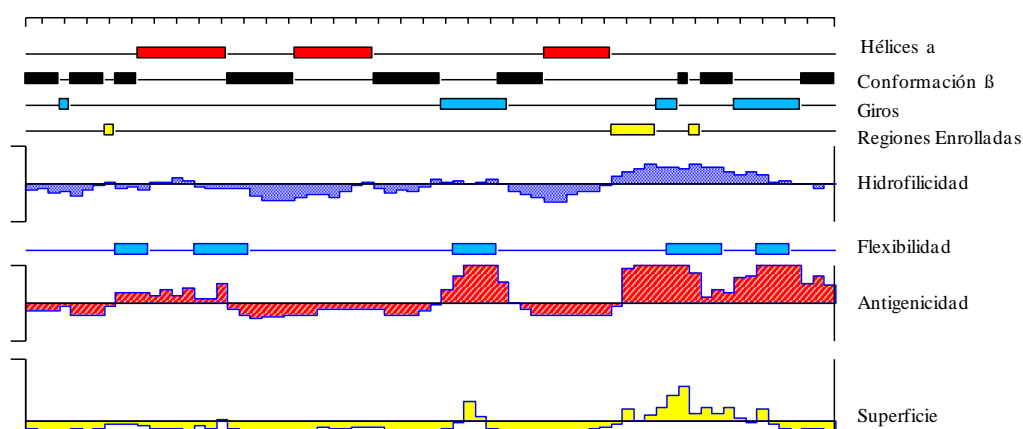


Figura 72. Estructura secundaria de la proteína deducida de la secuencia N°11 donde se observa las regiones hélices α , conformación β , giros, flexibles, así como también las zonas hidrofóbicas y con posibilidad de estar expuestas a superficie. Programa Protean (Lasergene).

La comparación de la secuencia aminoacídica N°11 con las depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ permitió observar similitud con una proteína expresadas de *E. granulosus* (CDS24779.1) y *E. multilocularis* (CDS24779.1), sin embargo al hacer la comparación con la secuencia en nucleótidos, se observa similitud con otras proteínas expresadas de organismos del mismo género, tales como *T. asiatica* (OCK22956.1) y *T. saginata* (OCK36624.1), así como también, se observa similitud con una subunidad 6B de la proteína Citocromo C Oxidasa de *E. granulosus* (EUB56199.1) y *S. japonicum* (CAX75822.1) (Tabla 15).

El alineamiento múltiple de la secuencia N°11 se realizó con las dos primeras secuencias mencionadas anteriormente y muestra gran variación entre las moléculas, tanto en el tamaño como en la similitud (Figura 73).

Tabla 14. Similitud de la secuencia N°11 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto en nucleótidos (nt), como en secuencia de aminoácidos (aa).

Proteína Homóloga	Organismo	N°-acceso	nt%	aa%
Proteína deducida	<i>T.asiatica</i>	(OCK22956.1)	99	-
Proteína deducida	<i>T.saginata</i>	(OCK36624.1)	98	-
Citocromo c oxidasa subunidad 6B	<i>E. granulosus</i>	(EUB56199.1)	97	-
Citocromo c oxidasa subunidad 6B	<i>S. japonicum</i>	(CAX75822.1)	59	-
Proteína expresada	<i>E. granulosus</i>	(CDS24779.1)	62	72
Proteína expresada	<i>E. multilocularis</i>	(CDS24779.1)	60	71

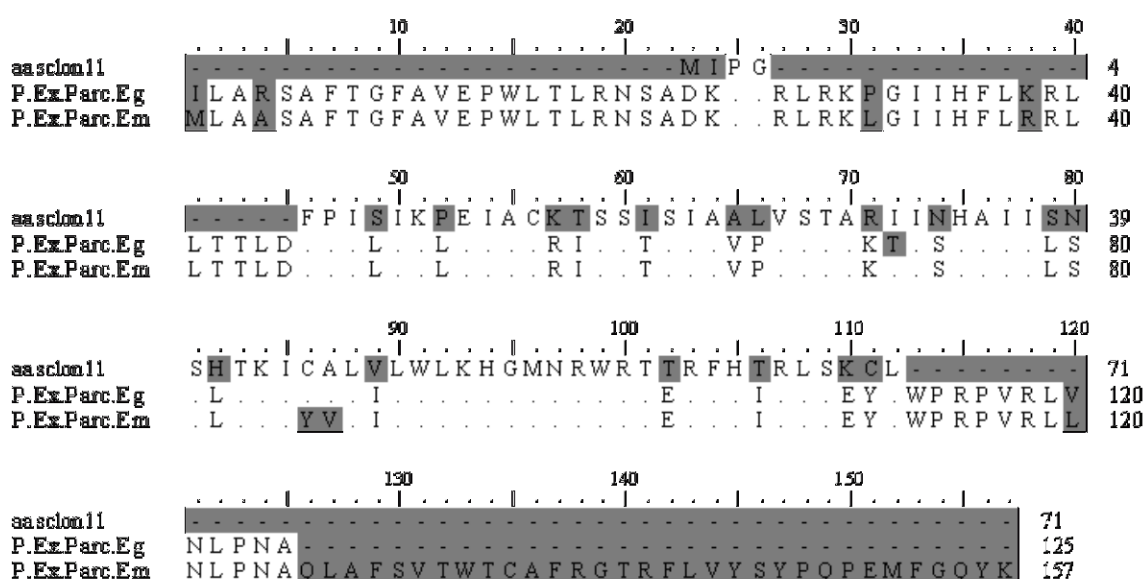


Figura 73. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida N°11, con las secuencias homólogas de mayor similitud, proteína expresada de *E. granulosus* (CDS24779.1) y proteína expresada de *E. multilocularis* (CDS24779.1).

4.4.12. Análisis de la secuencia N°12

La secuencia nucleotídica N°12 está truncada, se tiene un extremo 5`terminal de 461 nt, en donde se encuentra la secuencia SL y un codón de inicio separada por 14 nt del SL; el marco abierto de lectura no puede ser determinado ya que no se cuenta con la parte central de la molécula (de aproximadamente 240 nt), se tiene un extremo carboxilo terminal de 442 nt donde se observa el codón de parada y una cola de poli A de 24 nt.

La secuencia aminoacídica deducida refleja una proteína incompleta de 253 aas (faltando aproximadamente 88 aas centrales) (Figura 74 y 75) con varios aminoácidos potenciales a fosforilación (Figura 76). Según el programa Motif Scan una serina ubicada en la posición 46 es un sitio de acción para AMP-quinasas, una enzima perteneciente a la familia de las serina/treonina quinasas y que regula su acción en base a los niveles intracelulares de AMP/ATP.

No se encontraron sitios potenciales de miristilación, activación, ni glicosilación. La proteína contiene además un dominio funcional conocido como COQ9 en el extremo carboxilo terminal de 79 aas de longitud y cuya función está relacionada con la síntesis de ubiquinona (Figura 77). No se encontraron resultados de existencia de péptido señal, ni segmentos transmembrana.

gtcccttaccttgcaat														ttttgt	atgaattg	ttggag	ATG	ATC	AGG	46
														M	I	R	3			
TCA	AGA	ATA	AGT	TTT	AAA	CAG	TGT	ATC	CAT	TGG	CTC	GGC	TCT	TTA	91					
S	R	I	S	F	K	Q	C	I	H	W	L	G	S	L	18					
GCC	ATT	TGT	CGT	CGC	AGC	TTC	CTT	ACG	GCT	CCT	CAA	GTC	GAC	CGT	136					
A	I	C	R	R	S	F	L	T	A	P	Q	V	D	R	33					
CTT	ACA	AGT	CAA	TGT	TCT	CAT	CTT	ATC	TCC	AAG	ACA	TCA	AAG	GGT	181					
L	T	S	Q	C	S	H	L	I	S	K	T	S	K	G	48					
TCC	CTC	ATC	TAC	AGG	TCA	GGT	ACA	CCT	GCC	TAC	GTA	TTA	TCC	GTT	226					
S	L	I	Y	R	S	G	T	P	A	Y	V	L	S	V	63					
GCA	GCC	AGC	ACC	ACA	ACA	GAC	TCA	GTG	GAG	GGG	GCG	ACG	TAC	GCA	271					
A	A	S	T	T	T	D	S	V	E	G	A	T	Y	A	78					
GCG	GAA	GTG	GAA	GGA	AGT	GGT	TCC	GAC	AAT	GAG	ATC	TCC	GCA	GCG	316					
A	E	V	E	G	S	G	S	D	N	E	I	S	A	A	93					
GAC	TTG	AGA	GCG	GGC	TCG	CTA	GAG	GAG	ATG	TGC	GAG	CGC	GCA	CTG	361					
D	L	R	A	G	S	L	E	E	M	C	E	R	A	L	108					
GAG	GCT	GCG	GTG	GCA	CAT	GTG	CCT	ACC	CTC	GGA	TGG	TCG	CGT	GAT	406					
E	A	A	V	A	H	V	P	T	L	G	W	S	R	D	123					
TCC	CTC	GAA	GCC	GCT	TGC	ATG	GAA	CTT	GAT	CTG	CCC	CCC	GGT	CTC	451					
S	L	E	A	A	C	M	E	L	D	L	P	P	G	L	138					
CAT	TCT	ATT	G--												461					
H	S	I	...												141					

Figura 74. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc N°12 Molécula truncada. (Zona 5' y amino Terminal). Sombreado en azul se encuentra la secuencia SL y en verde del codón de inicio.

CTT	CTA	ACC	CTA	CCG	CAA	ATC	ATA	CCT	GCT	GCT	ATC	GGT	CTG	42	
...	L	L	T	L	P	Q	I	I	P	A	A	I	G	L	14
GAA	GCG	CAA	CTC	GTT	GAC	GAA	ATT	TGG	GCA	CAA	GCT	GGT	GAT	AGG	87
E	A	Q	L	V	D	E	I	W	A	Q	Q	G	D	R	29
TCC	GTT	GAC	ATG	AAC	TGG	TAC	GCA	AAG	CGT	GTA	GGC	CTG	GCG	TAC	132
S	V	D	M	N	W	Y	A	K	R	V	G	L	A	Y	44
GTG	TAC	AAA	CTA	ACC	GAA	CTG	TTC	TAC	ATC	CAA	GAC	ACG	TCG	CCA	177
V	Y	K	L	T	E	L	F	Y	I	Q	D	T	S	P	59
GAT	CAC	AAG	GCC	ACC	TGG	GAC	TTC	CTT	GAT	CGT	CGA	ATA	GCC	GAT	222
D	H	K	A	T	W	D	F	L	D	R	R	I	A	D	74
CTT	CGG	GCT	ATG	AAG	GAA	GCC	AAA	CTC	AAA	GGC	GTT	GCC	AGT	ATG	267
L	R	A	M	K	E	A	K	L	K	G	V	A	S	M	89
TTG	CGC	GAG	GGA	GTC	TTC	GCT	GCC	GGT	CAC	GTC	ACC	CCG	AAC	ATC	312
L	R	E	G	V	F	A	A	G	H	V	T	P	N	I	104
CTG	GGT	TGG	AGT	TGT	AGC	GGT	CGT	TAG	atttggttcccacttacctactc						362
L	G	W	S	C	S	G	R	*							112
ctga ttttgccgca cctttggg ag tcc agc ctgtg aataa atc tgg ttc aactgtc aaaa														418	
a a														442	

Figura 75. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc N°12. Molécula truncada (Zona 3' y Carboxi Terminal). Sombreado en rojo se encuentra el codón de parada y en amarillo la cola de poli-A.

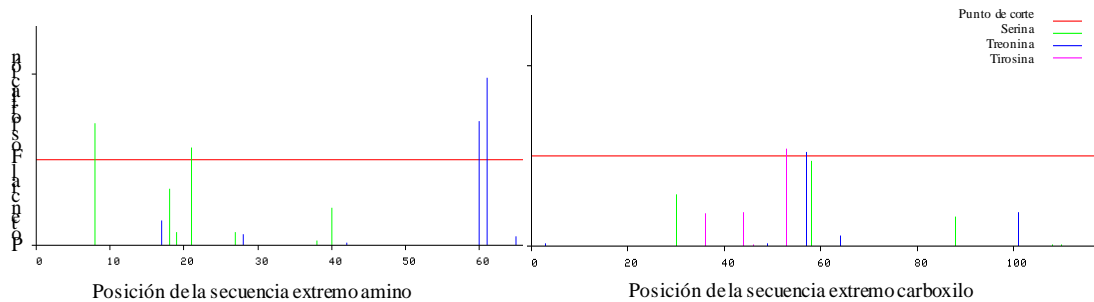


Figura 76. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en la secuencia aminoacídica deducida N°12, según el programa NetPhos 2.0.

Figura 77. Ubicación del dominio COQ9 en el extremo carboxilo de la secuencia aminoacídica deducida N°12, según el programa *Conserved Domain* del NCBI.

La estructura secundaria la proteína está formada por varias hélices α , conformaciones β , giros conectores y algunas regiones enrolladas, además presenta bajo

índice hidrofílico, pocas áreas flexibles y bajas probabilidades de estar en superficie, pero si presenta un alto índice antigénico en algunas zonas de la proteína (Figura 78). La posible estructura tridimensional de la proteína deducida presentó una conformación similar (39%) a un homo-dímero mitocondrial implicada en la biosíntesis de ubiquinona COQ9 de humanos (4rhp.1.B) según el programa Swiss-Model (Figura 79).

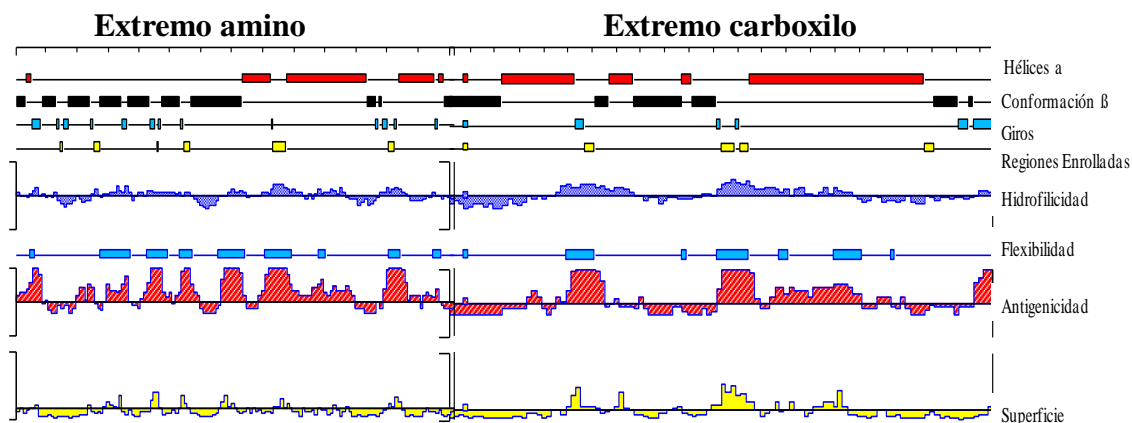


Figura 78. Estructura secundaria de la proteína deducida N°12 donde se observa las regiones hélices α , conformación β , giros, flexibles, así como también las zonas hidrofóbicas y con posibilidad de estar expuestas en superficie de los extremo amino y carboxilo terminal de la proteína deducida.

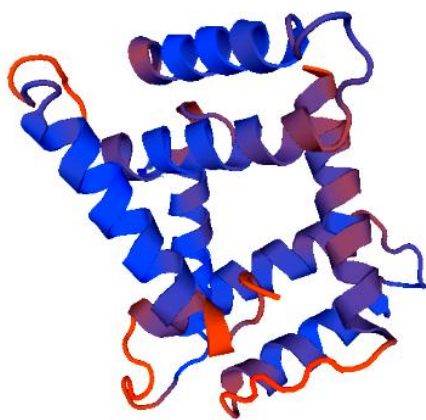


Figura 79. Modelo de posible estructura tridimensional de la proteína deducida N°12, extremo carboxi terminal, similar a un homo-dímero mitocondrial implicado en la biosíntesis de ubiquinona COQ9 de humanos (4rhp.1.B), según el programa Swiss-Model.

La comparación de la secuencia del grupo N°12 con las depositadas en las bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ permitió observar similitud con una proteína involucrada en la síntesis de ubiquinona COQ9 de *T. asiatica* (OCK27491.1), *E. granulosus* (CDS19343.1), *E. multilocularis* (CDS37395.1), *H. microstoma* (CDS31943.1) y hasta de organismos evolutivamente lejanos como de *H. sapiens* (AAH01478.2) (Tabla 16). El alineamiento múltiple de la secuencia N°12 con las secuencias homólogas de *E. granulosus* y *E. multilocularis* antes mencionadas, muestra

que presentan mejor grado de conservación de aminoácidos en el extremo carboxi-terminal donde se encuentra el dominio COQ9 (Figura 80).

Tabla 15. Similitud de la secuencia N°12 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank), tanto del extremo amino como del extremo carboxilo.

Proteína Homóloga	Organismo	Nº-acceso	Extremo amino	Extremo Carboxilo
COQ9	<i>T. asiatica</i>	(OCK27491.1)	92%	96%
COQ9	<i>E. granulosus</i>	(CDS19343.1)	65 %	90 %
COQ9	<i>E. multilocularis</i>	(CDS37395.1)	62 %	89 %
COQ9	<i>H. microstoma</i>	(CDS31943.1)	65 %	85 %
COQ9	<i>H. sapiens</i>	(AAH01478.2)	-	38%

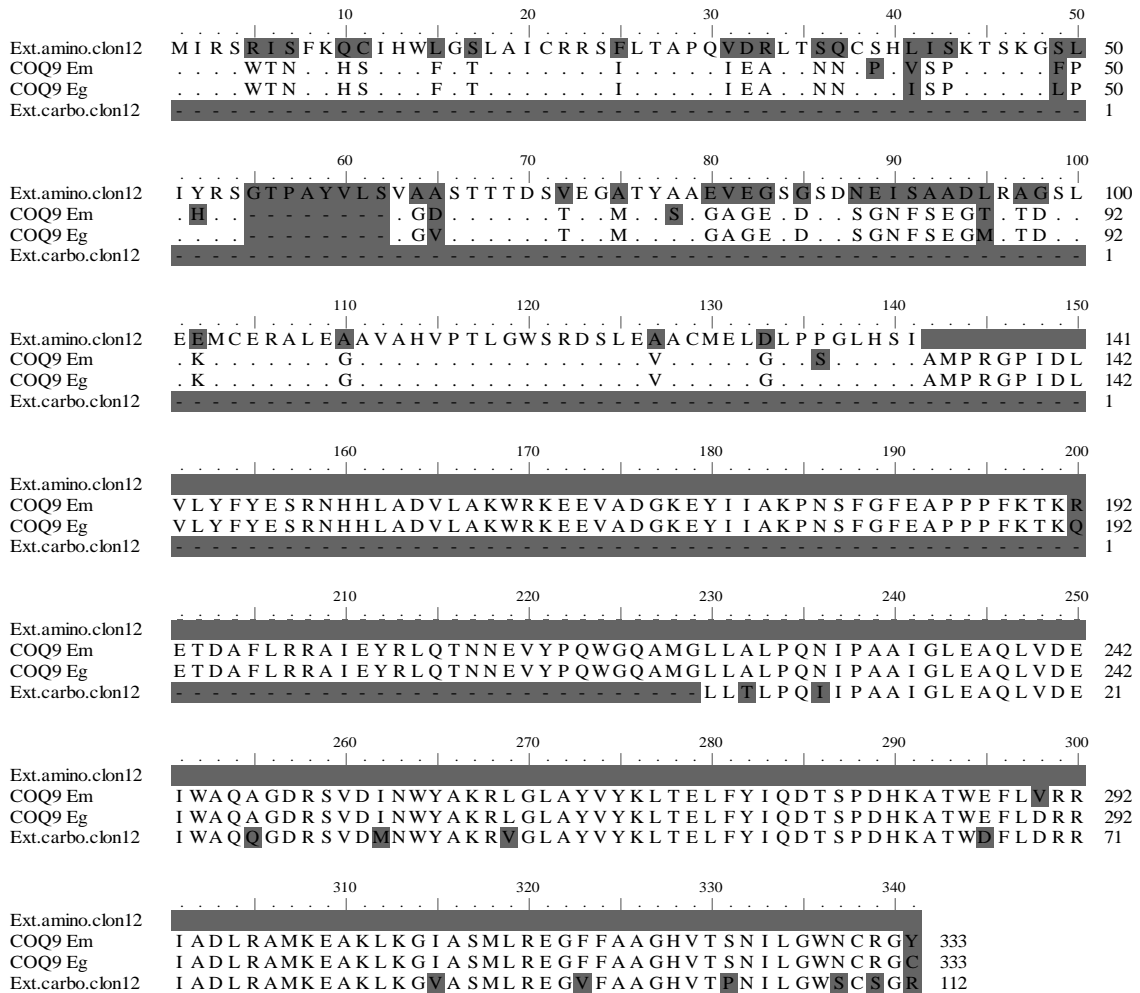


Figura 80. Alineamiento múltiple (Clustal W, Bioedit) de la secuencia aminoacídica deducida incompleta de la secuencia N°12, con las secuencias homólogas de mayor similitud; proteína involucrada en la síntesis de ubiquinona COQ9 de *E. granulosus* (CDS19343.1) (COQ9 Eg) y de *E. multilocularis* (CDS37395.1)(COQ9 Em).

4.4.13. Análisis de la secuencia N°13

En el caso del clon 13 no se pudo obtener la secuencia de la proteína deducida, ya que no se encontró marco abierto de lectura, por lo cual el análisis bioinformático no se pudo realizar. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos (Figura 81) mostró similitud con una proteína tipo matriz de dedo de zinc de *E. granulosus* (EUB59605.1) (49%), proteína hipotética de *E. granulosus* (CDS15220.1) (49%) y proteína expresada de *E. multilocularis* (CDS40054.1) (47%) (Tabla 17).

```

TTTTTTTTGTCTCCGTTGTTTTTCTTCCATTCTGGCCTTACTACATAAGTGTCTCCCGG      60
GGAACACCAGTTTCTCCCTTGGCTTGCTATCGCTCGCTATTCCTTTATCGGTACACATCG      120
CTTGGACGGAAAGGGGAAATCTTCAAACCTGAATCCCCTTGGGGAATTTCAAATTTTTT      180
AAACTGTTTCTTCTTTTCCGGACTAACTCCTCAGGTTCCCAAACCTGCTTGCTATTGGATC      240
CTGGGACCGGTCTCCGACTGCTGCCTGGAAAACGTGTCTCCTCCTCCCTTGGAAAATGA      300
TGGAGATCACCGGCGAAGACTTACGTCCGGAATTGGCATGGGACCTTGGTTCGCCTGGAT      360
ACGATCATGGTAGGGTTTCGTCTCGGATCGGTTCCGACGAGGTTAGATACCCTCCAACGC      420
GTGAATCTTCTGATATGGGGATGGCATTATGACTTCCAATCTTCAAATTTGGAACCATGG      480
ACGCAGGCCACCCATTTGAAGGTGGGTTTCCCGGCCCTATTCCACCCAGGGCTTATCCTG      540
GGAAAAGCTTTGGTATTCGCCAAGTAGATCGCCCAGATTAGTAAACGCCGGCCCCCATT      600
ACAAAAAATTTGGCAAGGGTTAAAGGGGGAACCCAAATCCACTTAGGTGGAAATTCGCGG      660
GGGCCCCGCTGGCAGGTCGACCCATATGGGGAAAACCTCCCCAACGGCGTTGGGATGCCA      720
TAGCTTGGATATTTCTATAGGGGTCCCCTAAAATACTTGGGCGTAACCCAAGGGTCATAA      780
CTGGTTTTCCCGGGGGGAAAATGTTATCCGCTCAAATTTCCCCAAAATAACAACCCGGA      840
AACATAAGGGAAAACCCGGGGGGGGCCCCAAGGGGGGAAACCCCTTAATTGGGGGTGGGG      900
CAAGGGCCCTTTTTCCGGGAAAAAAAAAAGGGCGGGCC      938

```

Figura 81. Secuencia nucleotídica del ADNc de la secuencia N°13.

Tabla 16. Similitud de la secuencia N°13 con las depositadas en los bancos de datos (GenBank)

Proteína Homóloga	Organismo	Nº-acceso	nt%	aa%
Proteína tipo matriz de dedo de zinc de	<i>E. granulosus</i>	(EUB59605.1)	49%	-
Proteína hipotética	<i>E. granulosus</i>	(CDS15220.1)	49%	-
Proteína expresada	<i>E. multilocularis</i>	(CDS40054.1)	47%	-

4.4.14. Análisis de la secuencia N°14

En el caso del clon 14 no se pudo obtener la secuencia de la proteína deducida, ya que no se encontró marco abierto de lectura, por lo cual el trabajo bioinformático no se pudo realizar. Por otro lado, la secuencia de nucleótidos (Figura 82) no mostró similitud con ninguna de las depositadas en las bases de datos (GenBak/EBL/DDBJ).

```

GGTCCCTTACCTTGCAATTTTGTATGGTCGTGCTGCCGTGCAGGGCCTTCGGGTTGGTGC      60
CTCAAAGGTCCTGACAGCCTGCCATAACCTAAAGTTCATCTGTGCAGGGTTCAAGGCTTC      120
TGGATGGGTACTGTACACAACGTCAGCAGCGGATCGTCCTCGATGAGGGGGTCACTGGATG      180
CACAGATGAAGGCATTTACAGCCAATATCGATGCCTGTTGATGGTCCAGACAGAATCTA      240
TCAAAAGCTGTTGTTTTGAAGTATCGAGCAATGCCTTGGTTGTAGAAAAAAAAAAAAAAAAA      300
AAAAAAAAA                                                                309

```

Figura 82. Secuencia nucleotídica de ADNc de la secuencia N°14. Sombreado en azul se encuentra la secuencia SL y en amarillo la cola de poli-A.

A manera de resumen, la comparación de las secuencias con las depositadas en las bases de datos (GenBank/EMBL/Swiss-Prot), mostro que la mayor semejanza fueron con ADNc codificantes de proteínas de parásitos de los géneros *Taenia*, *Echinococcus*, *Hymenolepis* y *Schistosoma*, y solo clon no presentó similitud alguna con moléculas ya descritas. Se identificaron transcritos completos que codifican una variedad de proteínas con funciones diversas típicas del metabolismo de organismos vivos, tales como; factores de transcripción, proteína activadora de GTPasas, proteínas de unión a ATPasa de membrana, de unión a Apolipoproteínas, enzimas, proteínas del sistema ubiquitina, y proteínas ribosomales, además de proteínas de función desconocida (Tabla 18); sin embargo, no se pudo apreciar un patrón característico en la secuencia de estas proteínas que contiene SL que las identifique y clasifique de aquellas que no llevan a cabo el mecanismo de *trans splicing*.

Tabla 17. Identificación de todas las secuencias obtenidas.

Nº	Identificación	Nº	Identificación
1	Factor de transcripción nuclear γ	8	Proteína hipotética
2	Proteína hipotética	9	Hidroxilasa - monooxigenasa
3	Proteína asociada a ATPasa de membrana	10	Subunidad inhibidora de fosfatasa 1
4	Proteína activadora de GTPasa unida a Rho	11	Citocromo C-oxidasa, subunidad 6B
5	Proteína ribosomal L24	12	Proteína involucrada en la síntesis de ubiquinona (COQ9)
6	Proteína de unión a apolipoproteína AI	13	Proteína de matriz de dedo
7	Nucleosido difosfato kinasa (NDK)	14	Sin similitud

CAPITULO V

DISCUSION

5.1. Estrategia de clonación

Los transcritos con la secuencia SL fueron identificados por PCR utilizando un juego de iniciadores diseñados que hibridan con SL en la región 5' y una región del extremo 3' del vector, siendo una estrategia metodológica similar a la reportada por otros investigadores que emplearon oligo dT en lugar del cebador del vector, como el caso del estudio para conocer que existen transcritos con SL en el genoma del parásito *Onchocerca volvulus* (Zeng y col., 1990) o el estudio sobre la identificación de transcripto que son procesados mediante *trans-splicing* en el parásito *S. mansoni* (Mourao y col., 2013); otro ejemplo es el estudio en *Toxocara canis* en el que incluyen en la metodología una PCR-SL con cebadores 5' SL y 3' poli A y consiguen amplificar un transcripto que solo se expresa en las larvas mas no en el adulto y que codifica una glicoproteína abundante en la superficie del parásito (Gems y Maizels, 1996).

Con el sistema de clonación empleado, se obtuvo una gran cantidad de moléculas recombinantes de diferentes tamaños (150-1200 pb) en un corto tiempo y de forma sencilla, lo que indica que este es un método eficiente de clonaje, además que permite garantizar que todos los ADNc clonados se encuentran completos, debido a la presencia de la secuencia SL en el extremo 5' y a la región de poliadenilación (cola poliA) en el extremo 3', siendo esta secuencia la que se utiliza en la purificación de los ARNm para la construcción de las genotecas de expresión. Esta estrategia es muy beneficiosa a la hora de realizar la subclonación de estas moléculas en un vector de expresión pues se garantiza la correcta expresión de las proteínas codificadas por los genes clonados.

El amplio conjunto de transcritos de tamaños diversos (150-1500 pb) ya ha sido reportado en investigaciones anteriores que emplearon la misma estrategia de amplificación también sobre una genoteca de expresión de cisticerco de *T. solium* (Brehm y col., 2002). De esta forma se realiza una amplificación selectiva de forma rápida de solo aquellos ADNc provenientes de ARNm que sufren el mecanismo *trans-*

splicing de aquellos que no sufren esta modificación post-transcripcional a partir de una genoteca que contiene ambos transcritos juntos.

Este tipo de estrategia de captura y amplificación selectiva de moléculas con SL y su subsecuente clonación en un vector ha sido utilizada por varios investigadores con diferentes objetivos. Para la creación de una genoteca de solo ADNc-SL de diferentes organismos parasitarios (*Cnidaria*, *Rotifera*, *Nematoda*, *Platelmintos* y *Chordata*) emplearon igualmente una PCR-SL a partir de ADNc de ARN total para aislar solo aquellas moléculas que sufren la modificación post-transcripcional de cada uno de los organismos, sin embargo la estrategia de clonación fue diferente ya que emplearon clonación dirigida con enzimas de restricción, pero con la que obtuvieron resultados similares con el organismo *E. granulosus* en cuanto al número de colonias recombinantes (96) y a la diferencias de tamaños de los insertos clonados (500-3000pb) (Fernández y Maizels, 2009).

De igual manera, el SL ha sido muy útil para identificar complejos, especies, linajes y genotipos de parásitos (Rodrigues y col., 2010). En helmintos, últimamente se está utilizando el SL como estrategia para identificar perfiles de expresión génica específica de tejido en *Caenorhabditis elegans* (Ma y col., 2016), en estudios de transcriptomas (Hope y col., 2016) y en ensayo de PCR relacionado con la pirosecuenciación de ADN como una herramienta rápida para identificación de nematodos en muestras de sangre y mosquitos (Sanpool y col., 2016).

5.2. Análisis Bioinformático de las secuencias de los ADNc clonados

El mecanismo *Trans-splicing* ocurre en pocos *phyla* de células eucariotas, entre los que se encuentran *Euglenozoa*, *Nematoda*, *Platyhelminthes*, *Chordata*, *Rotifera*, *Dinoflagellatay*, *Cnidaria* (Bitar y col., 2013) pero nunca ha sido reportado en antropodos, vertebrados, plantas ni hongos. En el *phylum Nematoda* ya ha sido descrito que ocurre este mecanismo principalmente en los géneros *Caenorhabditis*, *Ascaris* (Bektesh y Hirsh, 1988; Nilsen y col., 1989) y *Toxocara* (Gems y Maizel, 1996), mientras que en los *Platyhelminthes* se ha descrito principalmente en los géneros *Echinococcus*, *Taenia* (Brehm y col., 2000, 2002) y *Schistosoma* (Rajkovic y col., 1990). La molécula de SL se ha asociado a varias funciones, entre ellas están: una

mayor estabilidad del mensajero, pues el SL, lo provee de la caperuza 5' de trimetilguanosina (TMG) (Piecyk y col., 2012), el procesamiento de grandes ARNm policitrónicos en varios ARNm individuales (Morton y Blumenthal, 2011), la regulación de la traducción en algunos organismos y la eliminación de codones de inicio prematuros o fuera de marco (Danks y Thompson, 2015), expansión del proteoma, al originar diversas isoformas de un ARNm y por lo tanto diversas isoforma de una proteína (Nilse y Gravelly, 2010), puede aportar un codón AUG ,potencial sitio de inicio de la traducción (Cheng y col., 2006).

Este mecanismo ha sido utilizado en diferentes investigaciones con el objetivo de buscar, a partir de ARN por transcripción reversa a ADNc, o de genotecas de ADNc, nuevas moléculas que sean de interés en estos organismos que llevan a cabo este mecanismo post-transcripcional (Gems y Maizel, 1996; Brehm y col., 2002; Fernández y Maizel, 2009, Mourao y col., 2013, Ma y col., 2016). En este estudio se obtuvieron un conjuntos de secuencias de clones de ADNc codificantes de proteínas de cisticercos de *T. solium* empleando la misma estrategia de cribado con la finalidad de encontrar secuencias completas, nunca antes reportada en *T. solium* y finalmente caracterizar.

Al comparar las secuencias obtenidas de todos los clones con las depositadas en las bases de datos (GenBank/EMBL/DDBJ), se obtuvieron elevados porcentajes de similitud con proteínas del propio parásito *T. solium* y con parásitos del mismo género *Taenia*, pero diferentes especies (*T. saginata* y *T. asiatica*, principalmente) seguidos de parásitos de géneros cercanos evolutivamente, como los del género *Echinococcus* e *Hymenolepis*, ambos céstodes y *Schistosoma* (tremátode), cual era de esperarse debido a la cercanía evolutiva, ya que todos pertenecen al *phylum Platyhelminthes*.

No se observaron patrones comunes en las funciones biológicas de las posibles proteínas codificadas por estos transcritos, que estarían involucrados en procesos celulares tan diferentes como transcripción (clones 1 y 13), señalización celular (3 y 4), traducción (5), transporte de lípidos (6), metabolismo de nucleótidos (7), cadena de transporte de electrones (12) y enzimas que actúan en diversos procesos (9 y 11), resultado que coincide con Mourao y col. (2013) en *S. mansoni* donde encontraron transcritos modificados por *trans-splicing* que codifican una variedad de proteínas involucradas en diversos procesos biológico del parásito, sin encontrar ningún patrón

común entre ellas, ni genes con categoría particular, proceso biológico específico, función molecular determinada, ni compartimiento celular particular donde se encuentre, tampoco diferencia con respecto al estado evolutivo y sexo del parásito. Sin embargo, tal como se ha demostrado en trabajos previos (Bitar y col., 2013; Mourao y col., 2013), existen hasta cierto punto patrones comunes entre los transcritos de estos miembros de familias cercanas y es que todas las moléculas encontradas están involucradas en procesos imprescindibles para la supervivencia del parásito y existen conjuntos de proteínas ortólogas cuyos mensajeros son seleccionados para *trans-splicing* (Brehm y col., 2002), lo que indica que algunos genes pudieran haber mantenido *trans-splicing* como una forma de regulación transcripcional durante la evolución (Mourao y col., 2013).

Es de resaltar que no se encontraron moléculas posiblemente implicadas en las relaciones inmunológicas parásito-hospedador, tales como posibles antígenos o moléculas involucradas en mecanismos de evasión de respuesta inmune. Llama la atención no encontrar moléculas relacionadas o parecidas a los antígenos comunes de *Taenia* spp. que han sido ampliamente descritos por muchos investigadores (Chung y col., 1999; Hubert y col., 1999; Greene y col., 2000; Sako y col., 2000; Hancock y col., 2003; Ferrer y col., 2007) como los mejores candidatos para ser empleado en la detección de anticuerpos para el diagnóstico de NCC. Muchas de las moléculas clonadas y estudiadas de *Taenia* spp. comparten tres características; son glicoproteínas, de excreción/secreción del parásito y tienen bajo peso molecular; del mismo modo los productos recombinantes principalmente empleados como antígenos también comparten estas tres características. En este sentido quizás los 3 casos de las proteínas hipotéticas de función desconocida (2, 8, 10) pudiesen ser proteínas muy específicas de *Taenia* involucradas en estas relaciones, ya que son proteínas de bajo peso molecular (entre 10 y 12 kDa) y una de ellas tiene péptido señal (8), y todas poseen un elevado índice antigénico, y gran cantidad de zonas flexibles (rasgo característico en los epítomos) aunque no poseen el dominio específico de “*antígenos de Taenia*”. A su vez, la molécula que no presentó similitud con ninguna otra (14), también pudiese ser un antígeno de estas características, por su pequeño tamaño.

Tampoco se encontraron moléculas con similitud a los antígenos protectores empleados como posibles vacunas en los distintos modelos experimentales. De igual

manera, quizás los tres casos de las proteínas hipotéticas de función desconocida (2, 8, 10) y la molécula que no presentó similitud con ninguna otra (14), pudiesen ser proteínas con propiedades protectoras en distintos modelos, ya que son de bajo peso molecular y algunas poseen péptido señal que las define como posibles moléculas de superficie y secreciones del parásito (Bonay y col., 2002; Harrison y col., 2005; Parkhouse y col., 2008). Aunque, no se evidenciaron otros rasgos característicos de este tipo de moléculas, tales como; presentar dominios de adhesión o fibronectina-like (Bonay y col., 2002).

De los 30 clones secuenciados, 20% (6) codifican un factor de transcripción nuclear y 10% (3) una proteína asociada a ATPasa de membrana, lo que pudiera sugerir que los ARNm que predominantemente llevan a cabo este mecanismo post-transcripcional sean factores de transcripción y proteínas del sistema ATPasa o genes codificantes de estos transcritos abundantes en el genoma del cisticerco de *T. solium*. De igual manera, se estima que solo 25% de los ARNm de *E. granulosus* llevan a cabo *trans-splicing* (Fernández y col., 2002), mientras que más recientemente otros investigadores sugieren que solo 13% de los genes de *E. granulosus* llevan a cabo *trans-splicing* (Tsai y col., 2013), datos que pudiera ser similar en *Taenia* debido a la cercanía de ambos géneros. Mientras que en otros helmintos como *C. elegans* se estima que 70% de los genes llevan a cabo *trans-splicing* (Ma y col., 2016), indicando que es un mecanismo importante en helmintos.

Todas las secuencias obtenidas presentaron una característica en común y es que luego de la secuencia del cebador SL-D inmediatamente continuaba un codón ATG (SL-ATG), este hecho es una característica conservada en todos los *platyhelminthes* y se relaciona con los resultados obtenidos por Brehm y col. (2002), quienes clonaron ADNc de cisticercos de *T. solium* empleando una PCR con cebador directo SL-D y obtuvieron 35 clones, los cuales presentaron la secuencia SL inmediatamente antes del ATG, lo que confirma que los ADNc clonados derivan del empalme del SL y no ocurrió una unión inespecífica del cebador durante la fase de hibridación en la PCR. Sin embargo, en este caso SL-ATG fue el punto de partida de la traducción del 50% (6/12) de los grupos formados, en el resto de los grupos el ATG de inicio se encontraba entre 5 a 55 nt después de la secuencia SL, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Fernández y col. (2002) durante un estudio en el que realizaron la amplificación de

transcriptos de *E. granulosus* por PCR y en donde obtuvieron que 43% de los transcriptos tenían como punto de inicio de la traducción el codón SL-ATG, al igual que en el estudio realizado por Cheng y col. en el 2006, en *Schistosoma*, donde 28% de los transcriptos obtenidos muestran el SL-ATG como codón de inicio.

Igualmente, Zheng y col. (2008) obtuvieron diferentes tamaño de la secuencia 5'UTR después de la secuencia del cebador SL-D cuando realizaron transcripción reversa sobre ARN de cisticerco de *T. solium* empleando como cebador la secuencia SL del parásito; de igual forma obtuvo Cheng y col. en el 2006 en un trabajo similar realizado en parásitos *S. mansoni*. Todo esto demuestra que esta secuencia, SL-ATG, aunque es una estructura conservada en familias de proteínas de miembros homólogos de *Planthelminthes* (Brehm y col., 2000) y un potencial punto de partida de la traducción, no en todo los casos la traducción se inicia desde allí.

La comparación de la secuencia aminoacídica del **grupo N° 1** con las secuencias depositadas en las bases de datos indican homología con factores de transcripción nuclear γ de organismos cercanos, como *Taenia*, *Echinococcus* e *Himenolepis*, sin embargo esta proteína es mucho más pequeña que la de sus semejantes, pero presenta un alto grado de conservación, lo que puede indicar que es en esta región donde se encuentra la parte funcional de la proteína. Por otro lado, este gen posiblemente ha de tener una alta expresión en el metacestode de *T. solium* ya que fue el grupo con mayor cantidad de moléculas clonadas. De forma similar sucede con la secuencia aminoacídica deducida del **grupo N°2** donde existe mayor conservación de aminoácidos en el extremo amino, que corresponde a la región que conforma el dominio DUF2615 sin caracterizar y de función aún desconocida. Además, esta secuencia tuvo una similitud inferior con una proteína pequeña integral de membrana de *T. canis*, sin embargo, esta molécula no contiene ningún segmento transmembrana.

La secuencia aminoacídica deducida del **grupo N°3** mostró similitud con proteínas de membranas asociadas a ATPasas, además presentó un dominio funcional de receptor para renina, lo cual guarda relación en el hecho de que este tipo de receptores se asocia con adenosintrifosfatasa vacuolada (v-ATPasa) y son necesarios para el ensamblaje de la misma. Esta enzima interviene en diversos procesos como en la regulación del pH intracelular, en endocitosis, reciclaje de proteínas de membrana,

reabsorción de bicarbonato y absorción de sales, por medio del bombeo de protones (H^+) de un medio a otro utilizando la hidrólisis de ATP a ADP (Daryadel y col., 2016). De igual manera presentó similitud con proteína asociada a GTPasa de membrana (dinamina), la cual desempeña un papel esencial en la endocitosis mediante la catalización de la división de vesículas revestidas de clatrina nacientes de la membrana plasmática, lo cual requiere la hidrólisis de GTP hasta GDP (Stowell y col., 1999). Es notable el hecho que esta proteína haya presentado similitud con organismos del mismo género, pero también con organismos lejanos como el hombre por lo que se puede considerar un péptido cuya relación secuencia-función está bastante conservada.

El análisis bioinformático del **grupo N°4** indicó que la secuencia aminoacídica se trata de una proteína activadora de GTPasa asociada a Rho (RhoGAP), las cuales están involucradas en la regulación de muchas cascadas de señalización celular que modulan diversos procesos como son: la motilidad celular, la migración, la morfología y la división celular. Estas GTPasas son activadas por señales externas, tales como; factores de crecimiento, citocinas y hormonas, a través de sus respectivos receptores de superficie celular (Ling Hoon y cols, 2016).

Estas GTPasas pueden encontrarse en dos formas, la activa (unida a GTP) y la inactiva (unida a GDP), cuyo cambio de la forma activa a inactiva ocurre por la hidrólisis del GTP mediante la actividad intrínseca de la misma GTPasa. Esta reacción es iniciada por proteínas específicas denominadas proteínas activadoras de GTPasa (RhoGAP), las cuales aceleran en gran magnitud la actividad de hidrólisis del GTP, esta condición puede ser revertida a su forma activa por efecto de otras proteínas llamadas factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) que promueve la disociación del GDP de la GTPasa, conllevando a su asociación con un nuevo GTP; ello cierra el ciclo al estado activado de la GTPasa, el cual es el único estado en el que la GTPasa puede traducir una señal celular (Schmidt y Hall, 2002). El inhibidor de disociación de GDP (GDI) es también un grupo de reguladores negativos de las proteínas Rho GTPasas que actúan uniéndose a las GTPasas en su estado inactivo bloqueando el acceso de los GEF y la asociación de las GTPasas a las membranas, reclutándola de esta manera en el citosol. (DerMardirossian y Bokoch, 2005).

La proteína deducida presenta gran conservación entre los organismos cercanos, sin embargo, el tamaño es más pequeña que sus homólogos, pero contiene el dominio característico de este tipo de enzimas, con la presencia de residuos de aminoácidos involucrados en la unión del polipéptido GTPasa, lo cual indica que es en el extremo carboxi-terminal donde se encuentra el dominio funcional de estas proteínas (Rittinger y col., 1997), esto puede ser debido al hecho de que el mecanismo de *trans-splicing* puede generar productos de corte y empalme alternativos, en el que diferentes exones potencialmente podrían recibir la secuencia SL, lo que sugiere un medio único para la ampliación del repertorio de proteínas en los organismos que llevan a cabo este proceso (Mourao y col., 2013).

En cuanto a los resultados encontrados con el análisis bioinformático de la secuencia del **grupo N°5** se obtuvo que la secuencia aminoacídica deducida corresponde a una proteína ribosomal L26 que es ortólogo funcional a la proteína ribosomal L24 de procariotas, uniéndose ambas a las mismas regiones en los ARNr eucariota y procariota, respectivamente (Babiano y col., 2012). La secuencia aminoacídica deducida del grupo N°5 tiene una longitud de 211 aminoácidos y un dominio funcional KOW, dentro del cual se encuentran los sitios de unión al ARNr, residuos de aminoácidos específicos ubicados en posiciones conservadas, que es la característica principal que conforman a la superfamilia de proteínas KOW_RPL26 (Vila-Sanjurjo y col., 2003). La diferencia encontrada dentro de estos puntos de unión al ARNr de la secuencia del grupo N°5 con sus homólogos *Echinococcus* fue de apenas un aminoácido (sustitución conservadas I¹¹⁹/ V¹²¹).

Esta proteína L26 se ensambla en la unidad pre-60S eucariota dentro del núcleo, sin embargo investigaciones han demostrado que las células de levaduras pueden crecer en ausencia de L26, ya que no causa disminución considerable ni altera la conformación de los pre ARNr60S, manteniéndose la traducción en el ribosoma de manera normal (Babiano y col., 2012). Por otro lado, la proteína ribosomal L26 tiene una función importante al inducir la traducción de la proteína p53 humana cuando existe un daño en el ADN, promoviendo de esta forma la apoptosis de las células (Chen y col., 2012).

Del **grupo N°6**, 2 clones codifican una proteínas de unión a lípido, la cual se encontraba truncada sin embargo contiene una parte del dominio YjeF_N el cual está

asociado a la unión de lípidos y es homólogo al dominio ApoA-I BP en humanos (Rudolph y cols, 2007). Las secuencias homólogas reportadas de *E. multilocularis* (CAX16804.1) y *H. sapiens* (CAC86580.1) contienen péptido señal en el extremo amino terminal que está ausente en la secuencia del grupo N°6, resultado que es similar en otras secuencias con menor similitud como la de *S. mansoni* (CCD75736.1), lo que indicaría que estas proteínas pueden tener su efecto tanto fuera como en el interior de la célula y que posiblemente la secuencia señal haya sido adquirida en este gen con la evolución (Bernthaler y cols, 2009). Este hallazgo tiene relación crucial con la biología del parásito ya que los céstodos son incapaces de sintetizar *de novo* los lípidos, como el colesterol y los ácidos grasos, y deben adquirirlos del hospedador durante la infección ya sea para que formen parte estructural de las membranas o como generadores de energía por β -oxidación peroxisómica, por lo que el sistema de transporte de los lípidos debe estar bien desarrollado (Bernthaler y cols, 2009).

El análisis bioinformático de **grupo N°7** señala que la proteína deducida es una putativa subunidad del homo-hexámero nucleótido difosfato kinasa (NDK) de *T. solium*, una enzima responsable de la síntesis de nucleósidos trifosfato (NTP), vital en la síntesis de ácidos nucleicos e implicada en numerosos procesos regulatorios asociados con la proliferación, el desarrollo y la diferenciación celular. Esta familia de proteínas contiene alta conservación de residuos de aminoácidos, al mismo tiempo que el tamaño y peso de las proteínas son muy similares entre los organismos. La secuencia de NDK ha sido altamente conservada a través de la evolución, existe un residuo de histidina conservado en todas las isoenzimas, que está implicado en el mecanismo catalítico (Levit y col., 2002). Entre las secuencias homólogas se encontró una NDK de *T. solium* con la cual se obtuvo un 71% de similitud, lo que indica que no se trata de la misma proteína, pero si podría ser una isoenzima de la misma. De igual manera, se encontró similitud de un 91% con una NDK de *T. asiática*, existiendo solo diferencia en 2 aminoácidos, dentro de los cuales uno es una sustitución conservada. Sin embargo, la proteína del grupo N°7 es un poco más grande, al presentar un segmento interno de 13 aminoácidos que no está presente en ninguno de sus homólogos, lo que pudiera sugerir que se trate de una isoenzima previamente reportada o un empalme de exones distinto.

En cuanto al análisis de **grupo N°8** se encontró que se trata de una proteína de excreción/secreción de *T. solium* aún sin función conocida, ya que presenta un segmento

transmembrana en el extremo amino y un sitio de corte para la peptidasa señal, indicativo de que este segmento actúa como péptido señal. La proteína tuvo un 99% de similitud con una proteína hipotética de *T. solium* sin función aún conocida (Brehm y col., 2002) y con la que solo tuvo una sustitución conservada, en un solo aminoácido de toda la secuencia. Tiene relevancia la característica de ser una proteína de excreción/secreción y el bajo peso molecular (12 kDa), además del elevado índice antigénico predicho en casi toda la extensión de la molécula (a excepción del péptido señal), y la gran cantidad de zonas flexibles (rasgo característico en los epítomos), ya que este tipo de moléculas suelen ser proteínas antigénicas y que pueden ser empleadas como antígenos recombinantes en las técnicas inmunodiagnósticas o en modelos de inmunización experimental (Ferrer y col., 2012).

El análisis de la **molécula N°9** muestra que se trata de una proteína grande, una enzima llamada deoxihipusina hidroxilasa, que interviene en la formación post-traducciona de un aminoácido no proteico inusual llamado hipusina (4amino-2hidroxibutil-lisina) que forma parte del factor de iniciación de la traducción 5 (eIF5A), por lo que es clave en la proliferación celular. Deoxihipusina hidroxilasa cataliza una hidroxilación estereoespecífica en el C2 de la deoxihipusina (Park y col., 2011).

La proteína mostró semejanza tanto en la estructura primaria, secundaria y tridimensional con la enzima deoxihipusina hidroxilasa de organismos cercanos como *T. asiática* y *T. saginata* y en organismos más lejanos, por ejemplo; el humano, lo que indica que esta enzima es altamente conservada en organismos eucariotas.

En cuanto al análisis bioinformático de **secuencia N°10** se encontró que se trata de una proteína de 104 aminoácidos con un segmento transmembrana en el extremo amino y la comparación con la base de datos de secuencias indica que se trata de una hipotética subunidad inhibidora de fosfatasa 1, lo cual hace posible pensar que esté involucrada en los procesos de transmisión de señal celular. Cabe mencionar que la proteína fosfatasa 1 (PP1) es un miembro importante de la familia de fosfatasas Ser/Thr que se distribuyen de forma ubicua en eucariotas superiores. PP1 se ha demostrado que regulan diversos procesos celulares, tales como la progresión del ciclo celular, transcripción, síntesis de proteínas, metabolismo de los carbohidratos, la contracción

muscular, y señalización neuronal, por medio de la interacción de la subunidad catalítica (PP1c) con más de cincuenta diferentes subunidades reguladoras (Cohen, 2002).

La proteína deducida N°10 fue 100% similar a una proteína hipotética de *T. solium*, sin embargo, no se trata de la misma molécula ya que esta secuencia posee 14 aminoácidos adicionales en el extremo amino, por lo que se pudiera pensar que se trate de una isoforma de la proteína o de proceso de trans-splicing llevado a cabo en un sitio distinto en el mismo ARNm inmaduro como se describió en el análisis del grupo N°4 (Mourao y col., 2013). Sin embargo, la secuencia nucleotídica de donde se dedujo la proteína homóloga es idéntica a la de la secuencia N°10 por lo cual también es probable que la diferencia se deba a que el programa bioinformático utilizado por los investigadores de la secuencia depositada en la base de datos les haya dado un marco abierto de lectura diferente, ya que la secuencia homóloga fue obtenida empleando la misma estrategia de clonación que se empleó en este estudio, utilizando la secuencia SL como cebador (Brehm y col., 2002). Este hecho descarta la posibilidad de que haya ocurrido una ruptura o corte post-traduccional programado en la proteína homóloga.

Tiene relevancia la característica de poseer un segmento transmembrana en el extremo amino de la molécula, de aproximadamente 15 aa, aunque no se encontró sitio de clivaje para la peptidasa señal, esta secuencia tiene características de péptido señal, indicando que pudiese ser una proteína de E/S. Por otro lado, el bajo peso molecular (12,16 kDa), además del elevado índice antigénico predicho en casi toda la extensión de la molécula (a excepción del péptido señal), y la gran cantidad de zonas flexibles (rasgo característico en los epítomos), evidencian que podría tratarse (al igual que la secuencia N°8) de una proteína antigénica y que podría ser evaluada como antígeno recombinante en técnicas de inmunodiagnóstico o en modelos de inmunización experimental (Ferrer y col., 2012).

Un caso similar a lo expuesto anteriormente ocurrió con la secuencia aminoacídica deducida de la **molécula N°11**, según el programa empleado el marco abierto de lectura origina una proteína de 71 aminoácidos con similitud a dos proteínas expresadas de parásitos cercanos del género *Equinococcus*. Sin embargo, la secuencia nucleotídica presenta similitud con otras proteínas de parásitos del género *Taenia* y *Equinococcus* que con la secuencia aminoacídica no se observa, esto se debe a que el

programa de comparación de secuencias empleado, BLASTx, traduce la secuencia nucleotídica en otro marco de lectura, que incluso no es lógicamente correcto, pues no comienza desde un ATG inicial, originando una proteína distinta, similar a la subunidad 6B de la enzima citocromo C oxidasa de *E. granulosus* y *S. japonicum*.

Todo lo antes expuesto hace pensar que este gen codifique una proteína distinta y que sea justamente el mecanismo de *trans-splicing* y el lugar donde ocurre en el pre-ARNm el que dirija el marco de lectura a ser codificado en el ribosoma, pues como ya es conocido, este mecanismo puede originar diferentes ARNm a partir de un mismo gen, aumentando la diversidad del genoma eucariota sin necesidad de un incremento en el tamaño del genoma (Sammeth y col., 2008; Talavera y col., 2013); esta variedad de isoformas de proteínas pueden tener distintas funciones biológicas y pueden ser expresadas en diferentes tejidos, condiciones ambientales y estadio del ciclo evolutivo (Nilsen y Graveley, 2010), además el SL es determinante para la fase de inicio de la traducción (Piecyk y col., 2012).

La secuencia de la **molécula N°12** no está completa, debido a que las secuencias directa y reversa no permitieron obtener la secuencia total de la molécula, por lo que solo se dispuso de un extremo amino y otro carboxilo, faltando la parte central de la proteína. Para trabajos posteriores, con estas secuencias, se deben diseñar cebadores internos y realizar la secuenciación de la porción central de la molécula, con el objeto de obtener la secuencia completa y poder realizar la caracterización molecular.

Sin embargo, se trabajó con ambos extremos y se encontró que presenta gran similitud tanto de secuencia como estructural con una proteína involucrada en la síntesis de ubiquinona, conocida como COQ9, tanto de organismos cercanos como *T. asiática* y del género *Equinococcus* como de organismos más lejanos evolutivamente como el *H. sapiens*, lo cual indica que esta familia de proteína contiene un dominio estructural y funcional bastante conservado en la evolución.

La coenzima Q (CoQ) o también conocida como ubiquinona es un componente mitocondrial necesario para el proceso de fosforilación oxidativa que produce más del 90% de ATP celular. La biosíntesis de *novo* de la CoQ en eucariotas tiene lugar en la matriz mitocondrial a través de la acción colectiva de al menos 9 proteínas (COQ 1-9).

COQ9 es una proteína de unión a lípidos que interviene en la biosíntesis CoQ a través de la interacción física y funcional con COQ7, estabilizando todo el complejo de síntesis de CoQ (Lohman y col., 2014). El hecho que la proteína COQ9 tenga capacidad de unión a lípidos, hace que esta coloque a disposición de la enzima COQ7 el metabolito intermediario que usa como sustrato en la reacción que cataliza.

En el caso de la secuencia N°13 no se encontró un marco abierto de lectura, tampoco se encontró la secuencia del SL, ni la cola de poliA, pero al someter la secuencia nucleotídica a las bases de datos (GenBank/EMBL/DDBJ) se encontró similitud aunque baja con una proteína tipo matriz de dedo de zinc de *E. granulosus*, proteína hipotética de *E. granulosus* y proteína expresada de *E. multilocularis*, lo que hace pensar que no se trata de un artefacto y que la molécula si puede ser un ADNc de *Taenia*, en el cual, quizás, debido a algunos errores en las secuencias, que no pueden ser descartados, aunque se tenían duplicados, tanto de secuencia directa como de reversa; se pudieron haber formados codones de parada erróneos que no permiten predecir el ORF. De igual manera sucedió con la secuencia N°14, en la cual no se encontró marco abierto de lectura ni similitud con las secuencias almacenadas en las bases de datos, quizás debido, como se mencionó anteriormente a algunos errores en las secuencias que podrían hacer que se formen codones de parada artificiales que no permiten predecir un ORF para esta molécula. Para ambos casos, en trabajos posteriores se deberían repetir varias veces estas secuenciaciones para así corroborar si existió o no un error.

Aunque algunas investigaciones han demostrado que todas las moléculas de *spliced leader* presentan similitud estructural y funcional (Bitar y col., 2013) y ya es conocido el mecanismo complejo por el cual se lleva a cabo el *trans-splicing* (Lasda y Blumenthal, 2011), los resultados de este estudio refuerzan la teoría de otros investigadores (Brehm y col., 2000, 2002; Cheng y col., 2006; Mourao y col., 2013) en el hecho que los ARNm que contiene SL codifican proteínas de funciones muy variadas, acontecimiento que demuestra la importancia de este mecanismo en los procesos biológicos, lo que sugiere un papel crucial en la regulación de la expresión de ciertas proteínas, así como también, tiene un rol crucial en la ampliación del repertorio de proteínas sin necesidad del aumento del genoma.

Los transcriptos analizados no presentaron secuencia de patrón conservado, pero al compararse con las bases de datos de secuencias, se observó similitud con una serie de proteínas homólogas de organismos evolutivamente cercanos que también poseen SL en su extremo 5', por lo cual se piensa que el mecanismo de *trans-splicing* es un proceso conservado en la evolución para ciertos genes ortólogos, que conlleva a pensar que existe un ancestro común de donde surgió este mecanismo. Todos estos resultados incrementan el conocimiento sobre este mecanismo de *trans-splicing* en el cestode *Taenia solium* y podrían servir de soporte para estudios posteriores que permitan comprender mejor estos mecanismos post-transcripcionales tan importantes en la biología propia de los parásitos donde ocurre.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. La amplificación selectiva de ADNc a partir de genotecas de cisticerco de *Taenia solium*, mediante PCR usando como cebador la secuencia *Spliced leader*, permitió obtener una gran cantidad de fragmentos de ADNc de diversos tamaños, que se encontraban completos, desde la secuencia SL hasta la cola de poliA.
2. La inserción de las secuencias de ADNc obtenidas en el vector de mantenimiento pGEM[®]-T-Easy y la transformación de las células *E. coli* XL1 Blue MRF' posibilitó la clonación de los fragmentos obtenidos, así como el almacenamiento y amplificación de los mismos para estudios posteriores.
3. El proceso de secuenciación de los ADN complementarios (ADNc) mediante reacciones de secuenciación directa y reversa fue óptimo para la obtención de secuencias completas para posteriormente realizar el análisis y caracterización de las moléculas clonadas. Sin embargo, en uno de los clones es necesario la secuenciación con cebadores internos para lograr la secuencia completa de la molécula y en pocos casos es necesario la repetición de las secuencias.
4. El análisis y caracterización de las secuencias obtenidas empleando métodos bioinformáticos confirmó la obtención de ADNc completos y se obtuvo una gran cantidad de información de cada uno ellos. Este análisis permitió describir las diferentes distancias existente entre la secuencia SL y el ATG de inicio (0-55nt), y conocer que no existe un patrón aparente que clasifique a los ARNm que llevan a cabo el proceso de trans-splicing en el cisticerco de *T. solium*.
5. El análisis y caracterización de las secuencias también permitió conocer que el proceso de *trans-splicing* en *Taenia solium* no está asociado a genes específicos, ni a familias multigénicas, ni a localización subcelular, ni a estadios de vida específicos, al igual que en otros platelmintos.

6. La identificación de diversas proteínas típicas del metabolismo de organismos vivos, tales como; factores de transcripción, diferentes enzimas, proteína activadoras e inhibidoras, proteínas involucradas en señalización celular, proteínas de unión a lípidos, así como proteínas ribosomales, evidencian que el proceso de *trans-splicing* en *Taenia solium* pudiese tener un rol crucial en la regulación de los procesos metabólicos.
7. La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de datos permitió conocer hipotéticamente la naturaleza de las secuencias de proteínas, algunas nunca antes reportadas en *T. solium*, otras con similitud a secuencias almacenadas en las bases de datos de organismos evolutivamente cercanos y otras sin similitud a ninguna antes reportada.
8. Se identificaron los parásitos *T. asiática*, *T. saginata*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *H. microstoma*, *S. japonicum* y *S. mansoni* como los principales organismos que poseen proteínas homólogas a proteínas de cisticerco de *T. solium*, siendo los del mismo género *Taenia* los que presentaron proteínas con mayor grado de similitud, seguidos de los céstodes del género *Equinococcus*, *Himenolepis* y por último los trematodes del género *Schistosoma*, siendo todos evolutivamente cercanos por ser *platyhelminthes*.
9. El análisis y comparación de las secuencias permitió conocer las características de varias proteínas de *T. solium* nunca antes reportadas, así como, posibles isoformas de proteínas no reportadas anteriormente, en las cuales el mecanismo de *trans-splicing* puede originar diferentes ARNm a partir de un mismo gen, aumentando la diversidad de proteínas sin necesidad de un incremento en el tamaño del genoma, pudiendo ser este un mecanismo de regulación post-transcripcional de estos genes ortólogos en determinadas especies.
10. La similitud de secuencia del *Spliced Leader* de los diferentes helmintos en los cuales se ha descrito este mecanismo, algunos muy separados evolutivamente de *T. solium*, tales como *C. elegans*, apoyan la hipótesis de que este mecanismo pudiese haberse originado de un ancestro común.

BIBLIOGRAFIA

Alarcón de Noya B, Colmenares C. (2002). Las Limitaciones del diagnóstico de la Cisticercosis humana en Venezuela. Vitae academia biomédica digital. <http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeOnce/Articulos/MedicinaTropical/ArchivosHTML/introduccion.htm>.

Almeida CR, Ojopi EP, Nunes CM, Machado LR, Takayanagui OM, Livramento JA, Abraham R, Gattaz WF, Vaz AJ, Dias-Neto E. (2006). *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 256(5):307-10.

Altschul, S.F, Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410.

Apt, W. (2013). *Parasitología Humana*. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana Editores, México. pp. 406-416.

Babiano R., Gamalinda M., Woolford J., De la Cruz J. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Protein L26 Is Not Essential for Ribosome Assembly and Function. *Molecular and Cellular Biology*. 32(16):3228-3241.

Becerril, M. (2011). *Parasitología Médica*. (Tercera edición). Mc Graw Hill Interamericana Editores. México

Bektesh S.L., Hirsh D.I. (1988). *C. elegans* mRNAs acquire a spliced leader through a *trans*-splicing mechanism. *Nucleic Acids Research*. 16(12):5692.

Benítez L., Harrison L.J., Parkhouse R.M., Garate T. (1996). Sequence and immunogenicity of *Taenia saginata* ferritin. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 82(1): 113-116.

Berenthaler P., Epping K., Schmitz G., Deplazes P., Brehm K. (2009). Molecular Characterization of EmABP, an Apolipoprotein A-I Binding Protein Secreted by the *Echinococcus multilocularis* Metacestode. *Infection and Immunity*. 77(12):5564-5571.

Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Gallo Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 42:252-258.

Bitar M., Boroni M., Macedo A., Machado C., Franco G. (2013) The spliced leader *trans*-splicing mechanism in different organisms: molecular details and possible biological roles. *Front. Genet*. 4:199.

Blom N., Gammeltoff S., Brunak S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*. 294(5): 1351-1362.

- Bock M., Garcia H., Chin-Hong P., Baxi S. (2015). Under seize: neurocysticercosis in an immigrant woman and review of a growing neglected disease. *BMJ Case Reports*
- Boeckman B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O`Donovan C., Phan I., Pilbout S., Schneider M. (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research*. 31(1):365-370.
- Bologna G., Yvon C., Duvaud S., Veuthey L. (2004). N-terminal Myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics*. 4(6):1626-1632.
- Bonay, P., González, L.M., Benítez, L., Foster M., Harrison L.J., Parkhouse R.M.E. et al, (2002). Genomic and functional characterisation of a secreted antigen of *Taenia saginata* oncospheres. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 121(2): 269-273.
- Botero D., Restrepo M. (2012). *Paratosis Humana*. 5ª edición. Bogotá, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas. Pag. 142 – 151.
- Bowles J., McManus D.P. (1994). Genetic characterization of the *Asian Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 50(1):33-34.
- Brehm K., Jensen K., Frosch M. (2000). mRNA Trans-splicing in the Human Parasitic Cestode *Echinococcus multilocularis*. *The Journal of Biological Chemistry* 275(49):38311-38318.
- Brehm K., Hubert K., Sciutto E., Garate T., Frosch M. (2002). Characterization of a spliced leader gene and of *trans*-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 122(1):105-110.
- Burge C., Karlin S. (1998). Finding the genes in genomic DNA. *Current Opinion in Structural Biology*. 8(3):346-354.
- Center for Disease Control & Prevention (CDC). DPDx Parasite Image Library. Disponible en: www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Taeniasis_il.htm (fecha de consulta: 12/01/11).
- Chauhan J.S., Rao A., Raghava G.P. (2013). In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLoS One*. 8(6):e67008.
- Chen J., Guo K., Kastan M. (2012). Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *Journal Biological Chemistry*. 287(20):16467-16476.
- Cheng G., Cohen L., Ndegwa D., Davis R.E. (2006). The flatworm spliced leader 3`-terminal AUG as a translation initiator methionine. *The Journal of Biological and Chemistry*. 281(2):733-743.

Chung J.Y., Bahk Y.Y., Huh S., Kang S.Y., Kong Y., Cho S.Y. (1999). A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *Journal of Infectious Diseases*. 180(4):1307-1315.

Cohen P. (2002). Protein phosphatase 1- targeted in many directions. *Journal of cell science*. 115(2):241-256.

Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P. (2015). *Taenia solium* Human Cysticercosis: A Systematic Review of Sero-epidemiological Data from Endemic Zones around the World. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(7): e0003919.

Cortez M.M., Boggio G., Guerra M., Rodríguez de Gavidia M., Rojas G., Ferrer E., Lares M., Alviarez Y., Harrison L.J., Parkhouse R.M. (2010). Evidence that active transmission of porcine cysticercosis occurs in Venezuela. *Tropical animals Health and Production*. 42(3):531-537.

Cserzo M., Wallin E., Simon I., von Heijne G., Elofsson A. (1997). Prediction of transmembrana alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Protein Engineering*. 10(6):673-676.

Dadley-Moore D.L., Lightowlers M.W., Rothel J.S., Jackson D.C. (1999) Synthetic peptide antigens induce antibodies to *Taenia ovis* oncospheres. *Vaccine*. 17(11-12):1506-1515.

Danks G., Thompson E. (2015). Trans-splicing in metazoans: A link to translational control?. *Worm* 4(3):e1046030

Daryadel A., Bourgeois S., Figueiredo MF., Gomes Moreira A., Kampik NB., Oberli L., Mohebbi N., Lu X., Meima ME., Danser AH., Wagner CA. (2016). Colocalization of the (Pro)renin Receptor/Atp6ap2 with H⁺-ATPases in Mouse Kidney but Prorenin Does Not Acutely Regulate Intercalated Cell H⁺-ATPase Activity. *PLoS One* 11(1). e0147831

de Aluja A, Villalobos N., Nava G., Toledo A., Martinez J., Plancarte A, et al. (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*. 23(31):4062-4069.

De Queiroz, A., Alkire, N.L. (1998). The phylogenetic placement of *Taenia* cestodes that parasitize humans. *Journal of Parasitology*, 84(2):379-383.

Del Brutto O.H., Rajshekhar V., White A.C., Tsang V.C.W., Nash T.E., Takayanagui O.M., Schantz P.M., Evans C.A.W., Flisser A., Correa D., Botero D., Allan J.C., Sarti E., Gonzalez A.E., Gilman R.H., Garcia H.H. (2001). Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*. 57(2):177-183.

Del Brutto O.H. (2005). Neurocysticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología*. 20(8):412-418.

- DerMardirossian C, Bokoch GM. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology*. 15(7):356-63.
- Dorny P., Brandt J., Zoli A., Geerts S. (2003). Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica*. 87(1):79-86.
- Drew D.R., Lightowers M., Strugnell R.A. (2000). Vaccination with plasmid DNA expressing antigen from genomic or cDNA gene forms induces equivalent humoral immune responses. *Vaccine*. 18(7-8):692-702.
- Eom K.S., Jeon H.K., Rim H.J.. (2009). Geographical distribution of *Taenia asiatica* and related species. *Korean Journal Parasitology*. 47:115-124.
- Espíndola N.M., De Gaspari E.N., Nakamura P.M., Vaz A.J. (2000). Production of monoclonal antibodies anti *Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 42(3)175-177.
- Espinoza B., Ruiz Palacios G., Tovar A., Sandoval M., Plancarte A., Flisser A. (1986). Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 24(4):536-541.
- Fan PC. (1988). Taiwan *Taenia* and Taeniasis. *Parasitology Today*. 4(3):86-88.
- Fan, P.C., Lin, C.Y., Chen, C.C., Chung W.C. (1995). Morphological description of *Taenia saginata asiatica* (Cyclophyllidea: Taeniidae) from man in Asia. *Journal of Helminthology*, 69(4):299-303.
- Fernández C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM. (2002). Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 122(2):171-180.
- Fernandez C., Maizels R. (2009) Generating EST Libraries: Trans-Spliced cDNAs. *Methods in Molecular Biology* 533:125-51.
- Ferrer E. (2003). Caracterización Molecular de Antígenos de *Taenia Solium/T. saginata* relevante en el inmunodiagnóstico de cisticercosis. (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España).
- Ferrer E. (2006). Teniasis/Cisticercosis: Avances en diagnóstico inmunológico y molecular. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. XLVI(1):1-13.
- Ferrer E. (2007). Teniasis/cisticercosis: del diagnóstico convencional al diagnóstico molecular. *Salus*. 11(1):57-61.
- Ferrer E., Gárate T. (2014). Taeniosis and Cysticercosis. En: Helminth Infections and their Impact on Global Public Health. Edited by Fabrizio Bruschi, University of Pisa,

Italy. Senior Editor Biomedicine/Life Sciences Springer Wien, New York, ISBN 978-3-7091-1781-1. Capítulo 7, Pág 201-227. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1782-8_7

Ferrer E., Cortez M., Perez H., De la Rosa M., Alarcón de Noya B., Dávila I., Harrison L.J., Foster Cuevas M., Parkhouse R.M., Cabrera A. (2002). Serological evidence for recent exposure to *Taenia solium* in Venezuelan Amerindians. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 66(2):170-174.

Ferrer E., Cabrera Z., Rojas G., Lares M., Vera A., Alarcón de Noya B., Fernandez I., Romero H.U., Harrison L., Parkhouse M., Cortez M. (2003a). Evidence for high seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in individuals from three rural communities in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 97(5):522–526

Ferrer E., Benitez L., Foster-Cuevas M., Bryce D., Wamae L.W., Onyango-Abuje J.A., Garate T., Harrison L.J., Parkhouse R.M. (2003b). *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Veterinary Parasitology*. 111(1):83-94

Ferrer, E., Cortéz, M.M., Cabrera, Z., Rojas, G., Dávila, I., Alarcón De Noya, B., Perez, H., Fernández, I., Urdaneta, H., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Gárate, T. (2005). Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(8): 568-576.

Ferrer E., Bonay P., Foster-Cuevas M., González L.M, Dávila I., Cortez M.M., Harrison L., Parkhouse M., Gárate T. (2007). Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 152(1):90-100.

Ferrer E., Martínez-Escribano J.A., González Barderas M.G., González L.M., Cortéz M.M., Dávila I., Harrison L.J.S., Parkhouse R.M.E., Gárate T. (2009). Peptide epitopes of the *Taenia solium* antigen Ts8B2 are immunodominant in human and porcine cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 168(2):168-171.

Ferrer E., Sanchez J., Milano A., Alvarez S., La Rosa R., Lares M., Gonzalez L., Cortez M., Davila I., Harrison L., Parkhouse R., Garate T. (2012). Diagnostic epitope variability within *Taenia solium* 8 kDa antigen family: implications for cysticercosis immunodetection. *Experimental parasitology*. 30(1):78-85.

Fleury, A., Beltrán, C., Ferrer, E., Gárate, T., Harrison, L.; Parkhouse, R.M.E., García E., Fragoso, G., Costa-Cruz J., Biondi, G., Agapejev, S. Sciutto E. (2003). Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health*, 8(12): 1124-1130

Flisser A., Espinoza B., Tovar A., Plancarte A., Correa D. (1986). Host-parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Veterinary Parasitology*. 20(1-3):95-102.

- Flisser A., Sarti E., Lightowlers M., Schantz P. (2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica*. 87(1):43-51.
- Flisser A., Gauci C.G., Zoli A., Martínez-Ocaña J., Garza-Rodríguez A., Dominguez-Alpizar J.L. et al. (2004). Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity*. 72(9): 5292-5297.
- Fraga C., Costa T., Bezerra J., Lino R., Vinaud M. (2012). Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. *Experimental Parasitology*. 131(1):111-115.
- Freites A., García ME, Díaz-Suárez O, Alonso N, Urdaneta H., Martínez A. (2015). Inmunidad anti-cisticerco en una comunidad indígena del occidente venezolano. *Kasmera*. 43(1):56-65.
- Galán-Puchades, M.T., Fuentes, M.V. (2000). The Asian *Taenia* and the possibility of cisticercosis. *The Korean Journal of Parasitology*. 38(1):1-7.
- García H.H., Herrera G., Gilman R., Tsang V., Pilcher J., Diaz J., Candy E., Miranda E., Naranjo J. and the cisticercosis working group in Perú. (1994). Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 50(2):152-157.
- García H.H., Gilman R., Catacora M., Verastegui M., Gonzalez A., Tsang V. and the cysticercosis working group in Perú. (1997). Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. 175(2):486-489.
- García H.H., González A.E., Gilman R.H., Palacios L.G., Jimenez I., Rodriguez S. Verastegui M., Wilkins P., Tsang V. and the cysticercosis working group in Perú. (2001) Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions a major contributor to high seroprevalence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 65(1):31-32.
- García H., Del Brutto O. (2003). Imaging finding in neurocysticercosis. *Acta Tropica*. 87(1):71-78.
- Gauci C., Jayashi C., Lightowlers M. (2013). Vaccine development against the *Taenia solium* parasite. *Bioengineered*. 4(5):343-347.
- Gauci C., Lightowlers M. (2013). Genes encoding homologous antigens in taeniid cestodes parasites. *Bioengineered*. 4(3):168-171.
- Gems D., Maizels R. (1996). An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93(4):1665-70.

- Giménez-Roldán S., Díaz F., Esquivel A. (2003). Neurocysticercosis e inmigración. *Neurología*. 18(7):385-388.
- Gomes A., Soares K., Bueno E., Espindola N., Iha A, Maia A, Peralta R., Vaz A. (2007). Comparative evaluation of different immunoassay for the detection of *Taenia solium* cysticercosis in swine with low parasite burden. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 102(6):725-731.
- González A.E., Garcia H.H., Gilman R.H., Tsang V.C. and the cisticercosis working group in Perú. (2003). Control of *Taenia solium*. *Acta Tropica*. 87(1):103-109.
- Gottstein B., Zini D., Schantz P.M. (1987). Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Tropical Medicine and Parasitology*. 38(4):299-303.
- Guo A, Jin Z, Zheng Y, Hai G, Yuan G, Li H, Cai X. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine*. 2007; 25(1): 170-5.
- Greene R., Hancock K., Wilkins P., Tsang V. (2000). *Taenia solium*: Molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *Journal of Parasitology*. 86(5):1001-1007.
- Guo A., Jin Z., Zheng Y., Hai G., Yuan G., Li H., Cai X. (2007). Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine*. 25(1):170-175.
- Guzmán M., Guillarte, D.V., Urdaneta H. (2004). Seroprevalencia de la teniasis y cisticercosis en escolares de la localidad El Peñón, estado Sucre, Venezuela. *Kasmera*.32(2):108-16.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- Hancock K., Khan A., Williams F., Yushak M., Pattabhi S., Noh J., Tsang V. (2003). Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 41(6):2577-2586.
- Harrison L.J., Joshua G.W., Wright S.H., Parkhouse R.M. (1989). Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunology*. 11(4):351-370.
- Harrison G.B., Heath D.D., Dempster R.P., Gauci C., Newton S.E., Cameron W.G. et al. (1996). Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. *International Journal for Parasitology*. 26(2):195-204.
- Harrison L.J., Garate T., Bryce D.M., Gonzalez L.M., Foster-Cuevas M., Wamae L.W., Onyango-Abuje J.A., Parkhouse R.M. (2005). Ag-ELISA and PCR for monitoring the

vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. *Tropical Animal Health Production*. 37(2):103-120.

Hastings K. (2005). SL trans-splicing: easy come or easy go? *Trends in genetic*. 21(4):240-7.

Hernández M., Gonzalez M., Fleury A., Saenz B., Parkhouse R., Harrison L., Garate T., Sciutto E. (2008). Neurocysticercosis: detection of *Taenia solium* DNA in human cerebrospinal fluid using a semi-nested PCR based on HDP2. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 102(4):317-323

Hoberg, E.P., Jones, A., Rausch, R.L., Eom, K.S., Gardner, S.L. (2000) A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda : Taeniidae). *Journal of Parasitology*. 86(1):89-98.

Hoberg, E.P. (2002). *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection*. 4(8):859-866.

Hofmann K. y Stoffel W. (1993). A database of membrane spanning protein segments. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*. 374:166

Hope R., Egarmina K., Voloshin K., Waldman B., Carmi S., Eliaz D., Drori Y., Michaeli S. (2016). Transcriptome and proteome analyses and the role of atypical calpain protein and autophagy in the spliced leader silencing pathway in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*. 102(1):1-21

Hubert K., Andriantsimahavandy A., Michault A., Frosch M., Mühlischlegel F. (1999). Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 6(4):479-482.

Johnson K.S., Harrison G.B., Lightowlers M.W., O'Hoy K.L., Cogle W.G., Dempster . et al. (1989). Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 338(6216):585-587.

Kiemer L., Bendtsen J., Blom N. (2005). NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. *Bioinformatics*. 21(7):1269-1270.

Laclatte J.P. y Willms K. Fecha de consulta: 30 de Septiembre 2016. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html>).

Laclette J.P., Landa A., Arcos L., Willms K., Davis A.E., Shoemaker C.B. (1991). Paramyosin in the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 44(2):287-296.

Larralde C., Laclette J.P., Owen C., Madrazo I., Sandoval M., Bojalil R., Sciutto E., Contreras L., Arzate J., Díaz M. L., Govezensky T., Montoya R.M., Goodsaid F. (1986). Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst

vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35(5):965-973.

Larralde C., Sotelo J., Montoya R., Palencia G., Padilla A., Govezensky T., Diaz M., Sciutto E. (1990). Immunodiagnosis of human cisticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 114(9):926-928.

Lenardo M.J., Dorfman D.M., Donelson J.E. (1985). The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potencial role as a cap donor structure. *Molecular and Cellular Biology*. 9(5):2487-2490.

Lasda E., Blumenthal T. (2011). Trans-splicing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2(3):417-434

Levit M., Abramczyk B., Stock J., Postel E. (2002). Interactions between *Escherichia coli* Nucleoside-diphosphate Kinase and DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(7):5163-5167.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. (2003). *Trans* and *Cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*. 2(5):830-40.

Lightowers M.W. (1999). Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal for Parasitology*. 29(6):811-817.

Ling Hoon J., Hua Tan M., Koh C. (2016). The Regulation of Cellular Responses to Mechanical Cues by Rho GTPases. *Cells*. 5(17):1-20.

Lohman D., Forouhar F., Beebe E., Stefely M., Minogue C., Ulbrich A., Stefely J., Sukumar S., Sanchez M., Jochem A., Lew S., Seetharaman J., Lopez L., Coon J., Tong L., Pagliarini D. (2014). Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(44):4697-4705

Loos-Frank, B. (2000). An up-date of Verster's (1969). 'Taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus' (Cestoda) in table format. *Systematic Parasitology*, 45(3): 155-183.

Luque J., Herráez A. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid-España. Harcourt S.A. 2001. Pag198-229.

Ma X., Zhan G., Sleumer M., Chen S., Liu W., Zhang M., Liu X. (2016). Analisis of *C. elegans* muscle transcriptome using trans-splicing-based RNA tagging (SRT). *Nucleic Acids Research*. pii: gkw734. DOI: 10.1093/nar/gkw734. (Publicación aun sin imprimir)

Mao D. Gao S., Li Y. (2015). Imaging characteristics of different types of cerebral cysticercosis. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*. 27(5):513-6.

Malagón Valdez J. (2009). Neurocisticercosis en pediatría. *Medicina* (Buenos Aires). 69(1):114-120.

- Manoutcharian K., Diaz-Orea A., Gevorkian G., Fragoso G., Acero G., Gonzalez E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 99(1-2):11-24.
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I, Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Omelchenko M.V. Robertson C.L., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D., Zhang N., Zheng C., Bryant S.H.(2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*. 39:225-229.
- Martínez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J.C., Florencio-Martínez L.E., Manning-Cela R.G., Figueroa-Angulo E.E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 525241
- Meza N.W., Rossi N.E., Galeazzi T.N., Sánchez N.M., Colmenares F.I., Medina O.D., Uzcategui N., Alfonso N., Arango C., Urdaneta H. (2005). Cysticercosis in chronic psychiatric inpatients from a venezuelan community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygien*. 73(3):504–509.
- Michelet L., Fleury A., Sciutto E., Kendjo E., Fragoso G., Paris L., Bouteille B. (2011). Human Neurocysticercosis: Comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(1):195-200.
- Morton J., Blumenthal T. (2011). ARN processing in *C. elegans*. *Methods in Cell Biology*. 106:187-217
- Mourao M., Bitar M., Pereira F., Peconick A., Grynberg P., Prosdocimi F., Waisberg M., Coutinho G., Macedo A., Machado C., Yoshino T., Franco G. (2013). A directed approach for the identification of transcripts harbouring the Spliced leader sequence and the effect of trans-splicing knockdown in *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(6):707-717.
- Mulder N.J., Apweiler R., Attwood T.K., Bairoch A., Barrell D., Bateman A., Binns D., Biswas M., Bradley P., Bork O., Bucher P., Copley R.R., Courcelle E., Das U., Durbin R., Falquet L., Fleischmann W., Griffiths-Jones S., Haft D., Harte N., Hulo N., Kahn D., Kanapin A., Krestyaninova M., Lopez R., Letunic I., Lonsdale D., Silventoinen V., (2003) The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Research*. 31(1):315-318.
- Nilsen T.W., Shambaugh J., Denker J., Chubb G., Faser C., Putnam L., Benneth K. (1989). Characterization and expression of a spliced leader RNA in the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides* var *suum*. *Molecular and Cellular Biology*. 9(8):3543-3547.
- Nilsen T., Graveley B. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 463(7280):457-463.

Ogden R.C., Adams D.A. (1987). Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymology* 152:61-87.

Organización Mundial de la Salud (OMS) 2002. 55ª Asamblea Mundial de la Salud. Punto 13.18 del orden del día provisional A55/23.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015). Mapa de Endemicidad de *Taenia solium* 2015 Taeniasis/cisticercosis [Online]. http://www.who.int/taeniasis/Endemicity_Taenia_Solium_2015.jpg?ua=1 [acceso el 28 de Septiembre, 2016].

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Teniasis y Cisticercosis. Nota descriptiva N°376 Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>.

Pagni M., Iseli C., Junier T., Falquet L., Jongeneel V., Bucher P. (2001) . trEST, trGEN and Hits: Access to databases of predicted protein sequences. *Nucleic Acids Research* 29:148-151.

Park J., Wolff E., Park M. (2011). Assay of Deoxyhypusine hidroxylase activity. *Methods Molecule Biology* 720:207-216

Parkhouse R.M.E., Bonay P., González L.M., Ferrer E., Gárate, T., Cortéz M.M., Harrison L.J.S. (2008). TSOL18 (HP6-Tsol), an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. *Parasitology Research*. 102 (5): 921-926.

Pearson W.R., Lipman D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 85(8):2444-2448.

Petersen T.N., Brunak S., Heijne G. Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrana regions. *Nature Methods*. 8:785-786.

Piecyk K., Davis R., Jankowska M. (2012). 5-terminal chemical capping of spliced leader RNAs. *Tetrahedron Lett.* 53(36):4843-4847.

Proaño-Narvaez J.V., Meza-Lucas A., Mata-Ruiz O., García-Jerónimo R.C., Correa D. (2002). Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(6):2115-2118.

Rajkovic A., Davis R., Simonsen N., Rottman F. (1990). A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(22):8879-8883.

Restrepo B., Aguilar M., Melby P., Teale J. (2001). Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 65(4): 366-370.

Rey L. Parasitología. 3ª ed. Río de Janeiro. Guanabara Koogan. 1993. pag 496 -503.

Rittinger K., Walker P., Eccleston J., Nurmahomed K., Owen D., Laue E., Gamblin S., Smerdon S. (1997). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*. 388:693-697.

Rodrigues AC., Garcia HA., Batista JS., Minervino AH., Goes-Cavalcante G., Maia da Silva., Ferreira RC., Campaner M., Paiva F., Teixeira MM. (2010). Characterization of Spliced leader genes of *Trypanosoma (megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*. 137(1):111-122

Rodriguez-Canul R., Allan J., Fletes C., Sutisna P., Kapti N., Craig P. (1997). Comparative Evaluation of Purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 4(5):579-582.

Román G., Sotelo J., Del Brutto O., Flisser A., Dumas M., Wadia N., Botero D., Cruz M., Garcia H., Bittencourt P.R., Trelles L., Arriagada C., Lorenzana P., Nash T.E., Spina-Franca A. (2000). A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bulletin of the World Health Organization*. 78(3):399-406.

Rosas G., Cruz-Revilla C., Fragoso G., Lopez-Casillas F., Perez A., Bonilla M. et al. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology*. 84: 516-523.

Rudolph C, Sigrüener A., Hartmann A., Orso E., Bals-Pratsch M., Gronwald W., Seifert B., Kalbitzer H.R., Verdorfer I., Luetjens C.M., Ortman O., Bornstein S.R., Schmitz G.(2007). ApoA-I-binding protein (AI-BP) and its homologues hYjeF_N2 and hYjeF_N3 comprise the YjeF_N domain protein family in humans with a role in spermiogenesis and oogenesis. *Hormone and Metabolic Research*. 39(5):322-335.

Sako Y., Nakao M., Ikejima T., Piao X., Nakaya K., Ito A. (2000). Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(12):4439-4444.

Sambrook J., Russel D. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3^a (Ed.). New York. Cold Spring Harbor. 2001.

Sammeth M., Foissac S., Guigó R. (2008). A general definition and nomenclature for alternative splicing events. *Plos computational biology*. 4(8):e1000147

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12):5463-5467.

Sanpool O., Tantrawatpan C., Thanchomnang T., Janwan P., Intapan P., Rodpai R., Lulitanond V., Taeweethavonsawat P., Maleewong W. (2016). Pyrosequencing Using SL and 5S rRNA as molecular markers for identifying zoonotic filarial nematodes in blood samples and mosquitoes. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 16(5):326-333

Sarti E., Flisser A., Schantz P.M., Gleizer M., Loya M., Plancarte A., Avila G., Allan J., Craig P., Bronfman M., Wijeyaratne P. (1997). Development and evaluation of a health

education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56(2):127-132.

Schantz P., Moore A., Muñoz J., Hartman B., Schaefer J., Aron A., Persaud D., Sarti E., Wilson M., Flisser A. (1992). Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York city. *The New England Journal of Medicine*. 327(10):692-695.

Schantz P., Tsang V. (2003). The Us Center for Disease Control and Prevention (CDC) and research and control of cysticercosis. *Acta Tropica*. 87(1):161-163.

Schmidt A., Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Development*. 16(13):1587-609.

Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, Cervantes J, Aluja A, Larralde C. Development of the S3Pvac vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review. *Journal of Parasitology*. 2013a; 99(4): 686-92.

Sheu D.S., Wang Y.T., Lee C.Y. (2000). Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology*. 146(8):2019-2023.

Stowell M., Marks B., Wigge P., McMahon H. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biology*. 1(1):27-32

Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernández C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y. *Taenia solium* Genome Consortium, Cai X, Soberón X, Olson PD, Lacleste JP, Brehm K, Berriman M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 4;496(7443):57-63.

Takayanagui O.M., Leite J.P. (2001). Neurocisticercose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34(3):283-290.

Talavera D., Sheoran R., Lovell S. (2013). Analysis of genetic interaction networks shows that alternatively spliced genes are highly versatile. *Plos one*. 8(2) :e55671. doi: 10.1371/journal.pone.0055671.

Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-80.

Thompson J., Hopkins M., Taylor C., Wang T. (2004). Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. *Trends in plants science*. 9(4):173-179

- Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernandez M. et al. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity*. 67(5): 2522-2530.
- Toquero M., Morocoima A., Ferrer E. (2016). Seroprevalencia y factores de riesgo de cisticercosis en dos comunidades rurales del norte del estado Anzoátegui, Venezuela. *Biomédica* 37(2) (Aceptado, en prensa).
- Tsang V.C., Brand J.A., Boyer A.E. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases*. 159(1):50-59.
- Valadas E., Badura R., Marques T., Neno M., Boura M., Sutre A., Beato S., Gracio M., Cordeiro J. (2015) A case of imported neurocysticercosis in Portugal. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 9(1):114-117.
- Vila-Sanjurjo A., Ridgeway W., Seymaner V., Zhang W., Santoso S., Yu K., Doudna J. (2003). X-ray crystal structures of the WT and a hyper-accurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(15):8682-8687.
- Villalobos-Perozo R, Cheng R, Diaz O, Estevez J, Beauchamp S, Cava J, et al. (2007). Seroprevalencia y factores de riesgo de cisticercosis en trabajadores de granjas porcinas y criadores de cerdos artesanales del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Kasmera*. 35(1):26-37.
- Vinaud M.C., Junior R., Bezerra J. (2007). *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Experimental Parasitology*. 116:335-339.
- Vinaud M.C., Ferreira C.S., Junior R., Bezerra J. (2009). *Taenia crassiceps*: Fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Experimental Parasitology*. 122(3):208-211.
- Wallin M.T., Kutzke J.F. (2004). Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. *Neurology*. 63(9):1559-1564.
- Wang C.Y., Zhang H.H., Ge L.Y. (1992) A MAb-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma*. 11(6):825-827.
- Wang Y.Y., Chang X.L., Tao Z.Y., Wang X.L., Jiao Y.M., Chen Y., Xia H., Yang X.D. Sun X., Shen J.L., Fang Q., (2015). Optimized codon usage enhances the expression and immunogenicity of DNA vaccine encoding *Taenia solium* oncosphere TSOL18 gene. *Molecular Medicine reports*. 12(1):281-288.
- Willms K., Fernandez A., Jimenez J., Landa A., Zurabian R., Juarez M., Robert L. (2005). Taeniid tapeworm responses to *in vitro* glucose. *Parasitology Research*. 96(5):296-301.

Yera H, Dupont D, Houze S, Ben M'rad M, Pilleux F, Sulahian A, Gatey C, Gay Andrieu F, Dupouy-Camet J. (2011). Confirmation and follow-up of neurocysticercosis by real-time PCR in cerebrospinal fluid samples of patients living in France. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(12):4338-40.

Zammarchi L, Strohmeyer M, Bartalesi F, Bruno E, Muñoz J, Buonfrate D, et al. (2013). COHEMI Project Study Group. Epidemiology and management of cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in Europe, systematic review 1990-2011. *PLoS One*.;29:8(7):e69537.

Zeng W., Alarcon C., Donelson J. (1990). Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genome contain the spliced leader sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Cellular Biology*. 10(6):2765-73.

Zeng Y., Cai X. Luo X., Hu Z., Jing Z. (2008). Characterization of new gene (SLC10) with a spliced leader from *Taenia solium*. *Veterinary Journal*. 175(1):96-101.