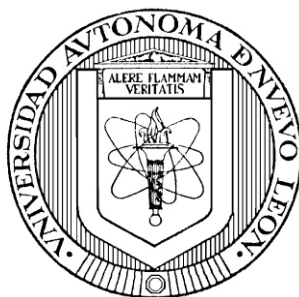


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E INMUNOLocalIZACIÓN DEL
RECEPTOR DE PROGESTERONA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN
DEL ADULTO DE *Trichinella spiralis*”

POR

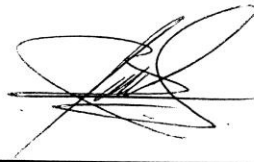
QBP ALVARO COLIN OVIEDO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Diciembre 2014

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E INMUNOLocalIZACIÓN DEL
RECEPTOR DE PROGESTERONA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DEL
ADULTO DE *Trichinella spiralis***

Aprobación de la Tesis:



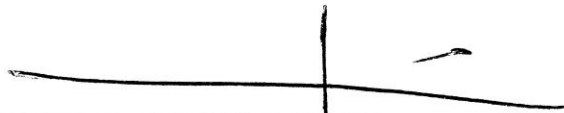
Dr. C. Romel Hernández Bello
Director de Tesis



Dr. C. Gloria María González González
Co-Director de Tesis



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Miembro de la Comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E INMUNOLocalIZACIÓN DEL
RECEPTOR DE PROGESTERONA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN
DEL ADULTO DE *Trichinella spiralis*”

Presentado por: QBP Alvaro Colin Oviedo

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología molecular así como en el Laboratorio de Biología Molecular, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Romel Hernández Bello.

Dr. C Romel Hernández Bello
Director de Tesis

Agradecimientos

A mi madre, por su gran apoyo, su cariño y sus consejos, sin los cuales no hubiera sido posible concluir este trayecto.

Al Dr. Romel, por su presencia incondicional y su guía durante la realización del proyecto.

A la Dra. Gloria González, por haberme recibido en su laboratorio y por su constante seguimiento y asistencia durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. José Palma, por su tiempo y sus consejos durante la realización del presente proyecto.

A mis compañeros Rita, Byron, Abraham, Rogelio, Alexandra, Luis, Liz, Carolina, Mariana, Anita, Mayra por haber compartido este recorrido conmigo. Gracias por darle ese toque lúdico a cada día de trabajo, por permitirme aprender de cada uno de ustedes y a la vez compartirles mis experiencias.

A Rafael, por el apoyo que en todos los aspectos me brindo durante esta etapa, por haberme alentado a aplicar todo mi esfuerzo, perseverancia y paciencia en este trabajo.

A mis amigos Juan Carlos y Jesús, por brindarme su compañía y amistad durante este periodo. Gracias por su apoyo, comprensión y por haber pasado tantos buenos momentos junto a mí.

A mis colegas, Laura, Karina, Alma, Socorro, Caro Becerril, por su constante espíritu servicial y desinteresada colaboración y asesoramiento.

A Aida, Mayra y todo el personal del departamento de Microbiología Médica.

Tabla de Contenido

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Parasitosis	1
1.2. Triquinelosis	2
1.2.1. Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>.	5
1.2.1. Enfermedad clínica de la Triquinelosis	7
1.3. Interacción hospedero-parásito.	11
1.4. Receptores hormonales	14
2. Justificación	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.1. Objetivo General	17
4.2. Objetivos Específicos	17
5. Material y Métodos	18
5.1 Mantenimiento del ciclo de vida del parásito	18
5.2. Extracción de DNA genómico de <i>T. spiralis</i>	18
5.3. Extracción de RNA total y de RNA mensajero de <i>T. spiralis</i>.	19
5.4 Oligonucleótidos empleados en este estudio	20
5.5. Ensayos de PCR y RT-PCR	21
5.6. RACE 5' y 3'.	22
5.7. Análisis de secuencia.	23
5.7. Expresión de la proteína recombinante PRMC.	24
5.8. Purificación de la proteína recombinante PRMC-Ts	25
5.9. Obtención de anticuerpos anti-PRMC-Ts.	26
5.10. Western-blot de la proteína PRMC-Ts	27

5.11. Ensayos de inmunolocalización mediante inmunofluorescencia indirecta en cortes de parásitos.....	28
6. Resultados.....	29
6.1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de PRMC de <i>T. spiralis</i>	29
6.2. Determinación de la expresión de PRMC2 en larvas musculares de <i>T. spiralis</i>	31
6.3. RACE 5' y 3'	32
6.4. Análisis de la secuencia obtenida de la técnica RACES 5' y 3'.....	34
6.5. Obtención de anticuerpos anti-PRMC-Ts	41
6.6. Western-blot de la proteína nativa PRMC2-Ts.	45
6.7. Ensayos de inmunolocalización mediante inmunofluorescencia indirecta en cortes de parásitos.....	46
7. Discusión.....	48
8. Conclusión	55
9. Referencias.....	56

Lista de Tablas

Tabla 1. Signos y síntomas generales y específicos de la triquinelosis.....	10
Tabla 2. Efecto directo de los esteroides sexuales sobre distintos helmintos....	13
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleotidos empleados en los ensayos de PCR y RT-PCR	21

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución de las diferentes especies del género <i>Trichinella</i>)	4
Figura 2. Células nodriza de diferentes especies de <i>Trichinella</i>	5
Figura 3. Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	7
Figura 4. Principales esteroides sexuales.....	13
Figura 5. Análisis in silico de la secuencia de PRMC2 de <i>T. spiralis</i>	29
Figura 6 Análisis in silico de la topología de la proteína PRMC2 de <i>T. spiralis</i>	30
Figura 7. Análisis in silico de los juegos de primers diseñados previamente.	32
Figura 8. Dominio de unión a esteroides encontrado en la proteína PRMC2 de <i>T. spiralis</i>	31
Figura 9. Amplificaciones utilizando los primers PRMC.....	32
Figura 10. Amplificados resultantes de la técnica RACE 5' y 3'.	33
Figura 11. Alineamiento de la secuenciación de los fragmentos amplificados con la técnica de RACE 3'.	35
Figura 12. Alineamiento de la secuenciación de los fragmentos amplificados con la técnica de RACE 5'.	35
Figura 13. Esquema del Vector pCR 4-TOPO.....	34
Figura 14. Transcritos del gen PRMC2-Ts.....	36
Figura 15. Análisis in silico de la proteína PRMC2-Ts	37
Figura 16. Purificación del amplicon PRMC-Ts.....	39
Figura 17. Transformación de células Top10.	40
Figura 18. Construcción del plásmido pET102 d-TOPO utilizada para la expresión de la proteína PRMC-Ts recombinante.....	40

Figura 19. Electroforesis de los plásmidos extraídos de las células transformadas Top10.....	41
Figura 20. Cinética de expresión de células transformadas BL21 en medio LBamp100 e inducidas con IPTG [1mM].....	42
Figura 21. Purificación de la proteína PRMC2-Ts recombinante.....	43
Figura 22. Expresión de la proteína LacZ.....	43
Figura 23. Determinación de la concentración óptima de anticuerpo adsorbido y anticuerpo secundario mediante un ensayo dot blot.....	44
Figura 24. Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-PRMC2-Ts mediante Wester Blot.....	45
Figura 25. Detección de la proteína nativa PRMC2-Ts en la fracción de proteína soluble e insoluble de <i>T. spiralis</i>	46
Figura 26 Ensayos de inmunolocalización de la proteína PRMC2-Ts con el anticuerpo anti-PRMC2-Ts.....	47

RESUMEN

Álvaro Colin Oviedo

Fecha de graduación: Diciembre 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título de estudio: Caracterización Molecular e Inmunolocalización del Receptor de progesterona durante la Diferenciación del Adulto de *Trichinella spiralis*

Número de páginas: 60

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

Área de estudios: Parasitología Molecular

Las parasitosis son enfermedades de tipo infeccioso con una alta incidencia a nivel mundial. entre los diversos agentes causales se encuentra *Trichinella spiralis*, un nematodo que puede causar infecciones crónicas y debilitantes. La triquinelosis es la enfermedad causada por *T. spiralis*, esta carece de métodos terapéuticos y diagnósticos adecuados, debido a esto, es importante la generación de conocimiento que permita desarrollar estrategias para su control adecuado. En el presente estudio se determinó la presencia de un receptor a progesterona en el parásito.

Conclusiones:

- *T. spiralis* posee 2 variantes del transcrito PRMC2-Ts.
- Ambos mensajeros de PRMC2-ts codifican una proteína de 93 residuos.
- El anticuerpo policlonal anti-PRMC2-ts generado en ratones reconoció de manera específica la proteína recombinante PRMC2-Ts y la proteína nativa en *T. spiralis*.
- La proteína nativa PRMC2 de *T. spiralis* tiene un peso molecular aproximado de 12 kDa y se encuentra en la fracción de proteína soluble e insoluble del parásito.
- El anticuerpo anti-PRMC2-Ts reconoció la proteína nativa en las células germinales del parásito.

Dr. C. Romel Hernandez Bello
Director de Tesis

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Parasitosis

Las parasitosis son enfermedades de tipo infecciosos que son causadas por diferentes tipos de organismos, entre los que destacan los protozoarios y los helmintos. Los protozoarios son organismos unicelulares con diversas morfologías. Entre estos se encuentran los flagelados (*Trypanosoma*); sarcodinos (amoebas como *Entamoeba*), coccidios (*Cryptosporidium*), esporozoos (*Plasmodium*). Por otra parte los helmintos son organismos pluricelulares (metazoos) que se clasifican en céstodos, tremátodos o nemátodos, dependiendo de sus características morfológicas. Los parásitos son capaces de causar distintos tipos de enfermedades, estas pueden ser tanto tisulares, sistémicas e intestinales. Las enfermedades intestinales son la forma más común de afecciones parasitarias reportándose incidencias de hasta el 53% en la población general mexicana. Si bien gran parte de las parasitosis intestinales son causadas por amibas, los helmintos también conforman una fracción importante de estas enfermedades.

En México se reportaron más de 200,000 casos de infecciones por helmintos en la semana 37 del año 2014 (Vigilancia Epidemiológica Semana 37, 2014) (1).

A diferencia de otras enfermedades, las parasitosis intestinales no generan síntomas graves, sin embargo, presentan una mayor morbilidad.

La OMS ha reportado incidencias de helmintiasis intestinales transmitidas por suelo de hasta más del 60% en diferentes regiones de América (2). Entre las consecuencias que pueden llegar a tener las infecciones por parásitos a nivel intestinal están problemas en la absorción de nutrientes, lo cual impide el desarrollo normal de la población, especialmente cuando se trata de niños. Por otra parte se sabe que estas infecciones pueden llegar a ocasionar trastornos cognitivos y reducir el rendimiento académico o laboral de las personas infectadas. En este sentido, la OMS ha puesto en marcha iniciativas sobre tratamientos antihelmínticos masivos, las cuales han tenido buenos resultados y demuestran que algunos de estos efectos pueden ser reversibles (3).

1.2. Triquinelosis

La triquinelosis es una enfermedad zoonótica reemergente, extendida a nivel mundial y causada por diferentes especies del nemátodo *Trichinella* (figura 1). La triquinelosis es un problema de gran importancia en el continente Europeo.

En los últimos años, se le ha adjudicado la reaparición de esta enfermedad a los grandes cambios políticos y socioeconómicos que han acontecido en esta región. Además, las costumbres alimenticias (consumo de carne de caballo, así como de productos de carne de cerdo sin un cocimiento apropiado) promueven la prevalencia de la enfermedad.

Esta se considera la infección helmíntica transmitida por alimentos más común (4–6). Principalmente en la parte este de Europa, se ha descrito una incidencia que puede llegar hasta el 50% en ciertas zonas rurales (6).

En el caso de México, la organización mundial de la salud (OMS) reportó 351 casos confirmados en el periodo de 1986-2001 en México, además de mencionar que hay más de 1000 pacientes que han presentado síntomas característicos de triquinelosis (7).

En el 2002 se determinó mediante inmunoensayo ligado a enzimas la presencia de los 3 antígenos de 45, 49 y 55 kDa (seroprevalencia) de la larva muscular en 4% de una población de 250 pacientes de la ciudad de México. Estudios posteriores en el 2012, reportaron una seroprevalencia de 3.8% en muestras de toda la república mexicana (8,9). Lo anterior indica que la tasa de infección ha prevalecido sin cambios en los últimos 10 años, evidenciando la necesidad de métodos de detección y control eficientes.

Las diferentes especies de este parásito, son capaces de infectar una gran variedad de hospederos tanto reptiles, aves y principalmente mamíferos, entre estos destaca el ser humano. La triquinelosis se transmite al ser humano mediante la ingesta de carne que se encuentre infectada con larvas musculares del parásito. En nuestro país, la principal causa de infección es mediante el consumo de la carne de cerdo, uno de los hospederos más frecuente de este parásito (10).

Es importante mencionar que además del riesgo que este parásito representa para la salud pública, los producción ganadera de cerdos pueden verse afectada por la infección por *Trichinella*, lo que resulta en pérdidas económicas significativas.

Actualmente, se han determinado 12 especies diferentes del genero *Trichinella*, hasta el momento 8 de estas han sido reportadas como capaces de establecer infecciones en el ser humano. Las especies de *Trichinella* se clasifican con base en su capacidad de formar una cápsula de colágeno al establecerse en el tejido muscular del hospedero, lo que se denomina, célula nodriza (figura 2) (10–12).

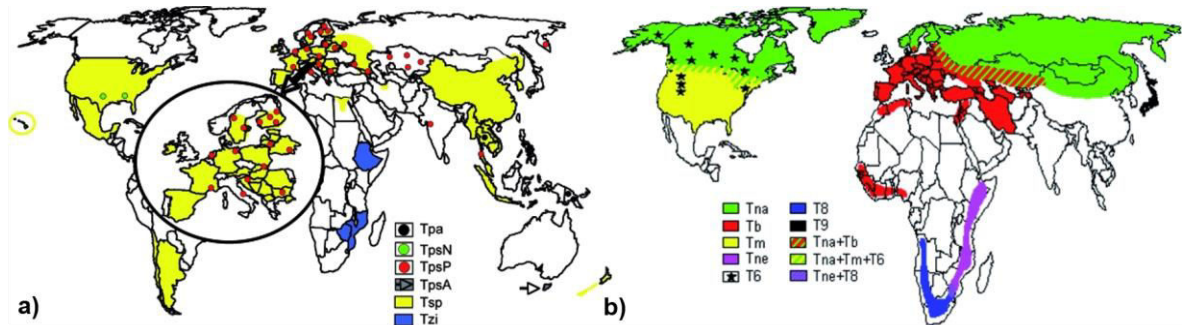


Figura 1. Distribución de las diferentes especies del género *Trichinella* **a)** *Trichinella spiralis* (Tsp), *Trichinella pseudospiralis* de Norte América (TpsN), *T.pseudospiralis* de Europa y Asia (TpsP), *T. pseudospiralis* de Tasmania (TpsA), *Trichinella papuae* (Tpa), y *Trichinella zimbabwensis* (Tzi). **b)** *Trichinella nativa* (Tna), *Trichinella britovi* (Tb), *Trichinella murrelli* (Tm), *Trichinella nelsoni* (Tne), *Trichinella* genotipo T6 (T6), *Trichinella* genotipo T8 (T8), y *Trichinella* genotipo T9 (T9). (5)

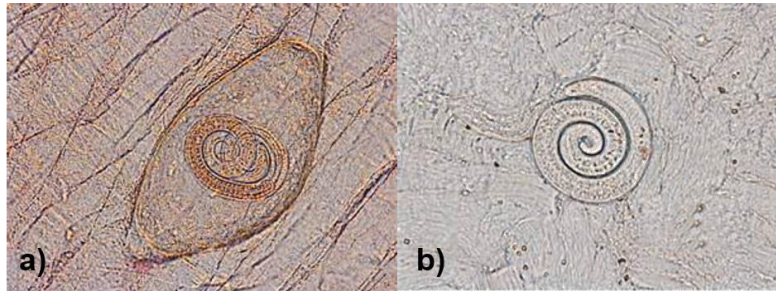


Figura 2. Células nodriza de diferentes especies de *Trichinella*. a) *T. spiralis*, encapsulada. b) *T. pseudospiralis*, no encapsulada.

1.2.1. Ciclo de vida de *T. spiralis*.

El ciclo de vida de *T. spiralis* consta de 2 fases. Primeramente la fase entérica, que comprende el periodo de la ingesta de la carne contaminada con la Larva Muscular (LM o L1) del parásito, posterior a la cual las larvas son liberadas en el estómago del hospedero después de 3 hrs debido a la acción de los jugos gástricos. Posteriormente, los parásitos migran hacia el intestino delgado donde presentan una serie de 4 mudas en 30 hr hasta llegar al estadio de Adulto. Cinco días posteriores a la infección, los parásitos adultos ya han copulado y los adultos hembras comienzan a liberar las larvas recién nacidas (LRN) en la luz intestinal, las cuales penetran el epitelio del intestino e ingresan a la circulación sanguínea y linfática con lo cual se inicia la segunda fase de la infección, es decir, la fase sistémica.

Una vez que las LRN han llegado al torrente circulatorio, pasan a través del conducto torácico y por último a las células musculares del hospedero, las cuales invaden y se establecen. Después de 20 días de haber llegado al músculo, estas larvas recién nacidas alcanzan el estado de larva muscular. Este proceso conlleva ciertos cambios en la morfología del miocito, entre los cuales se pueden observar la desaparición de los filamentos contráctiles del músculo, un aumento en el número de mitocondrias de la célula, así como un desplazamiento del núcleo hacia el centro de la célula.

En la parte exterior de la célula se puede observar una sobre producción de colágenos tipo V e IV, además de que hay un aumento en la vascularización de estas células para proveer de nutrientes a las larvas musculares. Estas modificaciones en las células musculares dan lugar a una “célula nodriza” (10,12,13).

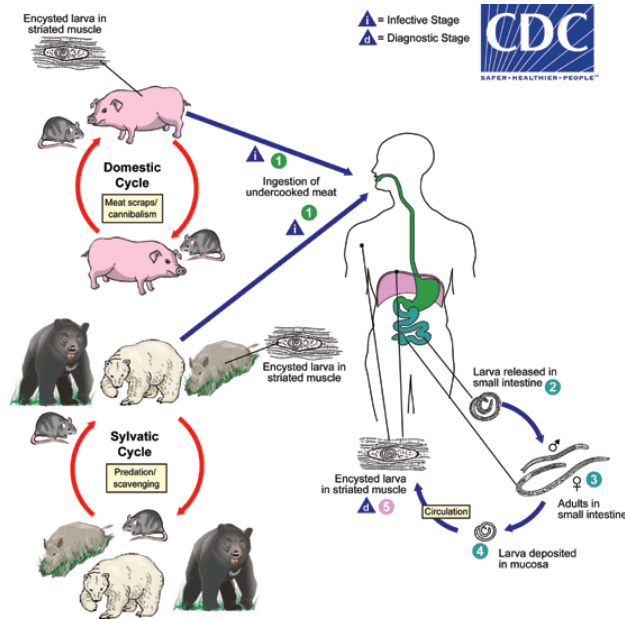


Figura 3. Ciclo de vida de *T. spiralis*. En la figura se muestra el ciclo de vida selvático, así como el doméstico. La forma más común de infección es la ingesta de carne de cerdo infectada con LM (punto 1 en la figura) Las larvas se liberan en el intestino del hospedero (punto 2) donde maduran y se reproducen (punto 3 y 4). Posteriormente las LRN migraran al tejido muscular.

1.2.1. Enfermedad clínica de la Triquinelosis

En el aspecto clínico, los signos y síntomas que presentan los pacientes infectados con *Trichinella*, están directamente relacionados con el ciclo de vida del parásito, así como con la cantidad de larvas que hayan sido ingeridas en primera instancia. Sin embargo, no es común que se presenten todos los síntomas debido a la susceptibilidad que presenta cada individuo frente a la infección con el parásito.

Primeramente, los síntomas son gastrointestinales, debido al establecimiento de las LM y del adulto en el intestino.

En esta etapa se pueden presentar inapetencia, vómito, diarrea, dolor abdominal y otros síntomas gastrointestinales inespecíficos para la enfermedad. Posteriormente, se pueden presentar síntomas parenterales, entre los que podemos encontrar el dolor al respirar o con el movimiento ocular. Se puede observar inflamación de los ganglios linfáticos en ocasiones así como edema periorbital, un signo característico de esta enfermedad. Los síntomas de esta etapa son variables debido a la migración aleatoria de las larvas recién nacidas en el sistema circulatorio del hospedero. En la última fase de la infección hay deshidratación y mialgias debido al establecimiento de la larva muscular en los miocitos del hospedero. Se sabe que en infecciones graves, los pacientes pueden presentar hipotensión, encefalitis, parálisis, coma e incluso la muerte (Tabla 1) (5,10).

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en factores clínicos, epidemiológicos, así como en pruebas de laboratorio clínico, parasitológico e inmunológico.

El aspecto clínico se guía con base en la historia de ingesta de carne mal cocida o cruda, también se pueden registrar brotes epidémicos que llevan a sospechar de esta enfermedad al presentarse un cuadro febril como el de la fase parenteral de la triquinosis. En la fase enteral el diagnóstico es fácilmente confundido con intoxicación, tifoidea, shigelosis o en algunas ocasiones el cuadro es subclínico y no amerita la consulta del paciente.

Los estudios de laboratorio clínico que se emplean para apoyar el diagnóstico son la biometría hemática, donde de manera característica se elevan los niveles de eosinófilos (eosinofilia) por encima de los $500/\text{mm}^3$; y la presencia de las enzimas difosfofructoaldolasa y deshidrogenasa láctica en suero. Cabe destacar que estos resultados se pueden obtener hasta alrededor del día 15 posterior a la infección.

La identificación directa del parásito permite el diagnóstico definitivo. Para esto existen diversas técnicas como la triquinoscopia y la digestión del tejido muscular. En la primera, se utiliza una biopsia de tejido muscular, la cual se coloca entre 2 portaobjetos y se aplica presión para extender el tejido y permitir la visualización de la LM en músculo con el microscopio. La digestión artificial del tejido muscular se lleva a cabo utilizando una mezcla de pepsina y ácido clorhídrico, lo cual permite la degradación total del músculo, y así, la liberación de las larvas musculares (5,10,12).

Tabla 1. Signos y síntomas generales y específicos de la triquinelosis

<i>Signos y Síntomas</i>	<i>Diagnóstico diferencial</i>
<i>Diarrea prolongada</i>	Salmonelosis, shigelosis, infecciones gastrointestinales causadas por virus.
<i>Fiebre y mialgias</i>	Infección por virus de la influenza
<i>Edema periorbital y fiebre</i>	Glomerulonefritis, enfermedad del suero, reacciones alérgicas, polimiositis, dermatomiositis
<i>Fiebre y síntomas neurológicos</i>	Tifoidea
<i>Cefalea, fiebre, irritabilidad</i>	Meningitis, encefalitis, infecciones neurológicas
<i>Petequias y fiebre</i>	Leptospirosis, endocarditis, tifus exantemático
<i>Eosinofilia y mialgias</i>	Diversos síndromes metabólicos
<i>Eosinofilia y fiebre</i>	Fasciolacis, toxocariasis y esquistosomiasis invasiva

Por último el diagnóstico serológico puede ayudar al diagnóstico en la etapa aguda de esta enfermedad. Las técnicas mayormente utilizadas son el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y el Western Blot (10).

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, este es solamente eficiente si se administra en la etapa enteral de la enfermedad, lo cual no corresponde con la mayoría de los diagnósticos, los cuales generalmente se logran en etapas posteriores. Se recomienda el uso de antiparasitarios como el albendazol y el mebendazol, sin embargo el tratamiento se puede prolongar hasta más de 20 días en las etapas parenterales. Algunos autores mencionan que la terapia puede aumentar la larviposición de las hembras y dar lugar a una infección más grave (5,10,12).

Refiriéndose a la profilaxis de esta enfermedad, esta se basa en la educación de los productores, así como de los consumidores de carne de animales posiblemente infectados con *Trichinella*. Existen algunas estrategias que los productores pueden seguir para asegurar la inocuidad de la carne. La congelación a -15°, durante 3-4 semanas, inactiva a las larvas musculares, aunque existen especies como *T. britovi* que llegan a resistir este tratamiento, aunque estas especies generalmente infectan animales de caza. Por otra parte está la irradiación de los productos, este procedimiento se recomienda para la carne empacada, sin embargo, no está permitida en algunos países. La curación de la carne por diversos métodos como la salazón, ha demostrado ser un método inconsistente en este aspecto, ya que no siempre tiene la capacidad de inactivar las larvas musculares del parásito.

En el caso de los consumidores el método que se recomienda para la prevención de esta enfermedad es la cocción de la carne a una temperatura de 71° C por al menos 1 minuto (5).

1.3. Interacción hospedero-parásito.

Como se mencionó anteriormente, los parásitos tiene la capacidad de infectar un gran número de hospederos; sin embargo, se ha observado un fenómeno peculiar en donde el parásito muestra cierta tendencia a incrementar la carga parasitaria en uno de los sexos del hospederos.

Este fenómeno denominado “susceptibilidad asociada el sexo” se ha estudiado en algunos otros parásitos helmintos. En algunos casos la incidencia se puede invertir dependiendo de la parasitosis (Tabla 2).

Uno de los factores que predispone a uno de los dos sexos a una prevalencia mayor de una enfermedad parasitaria específica, son los esteroides sexuales. Estos últimos son moléculas de carácter lipídico que tienen funciones fisiológicas diversas entre las cuales destaca el brindar el dimorfismo sexual a los organismos vertebrados (15). Interesantemente, se ha observado que los esteroides sexuales también pueden ejercer diferentes efectos directos en los parásitos helmintos (Tabla 2); de tal forma que estos pueden verse beneficiados o perjudicados en presencia de dichos componentes. Por ejemplo, cuando el parásito nemátodo *Schistosoma mansoni*, es tratado con testosterona, su fertilidad se ve reducida. Del mismo modo, *Taenia crassiceps*, decreta su tasa de reproducción cuando es tratada con andrógenos, sin embargo esta se incrementa cuando se utilizan estrógenos (16,17). En el caso específico de *T. spiralis*, los machos tienden a presentar una carga parasitaria mayor en músculo en comparación a las hembras. Interesantemente, Thabet y cols (2008) reportaron que esta tendencia desaparece cuando ratones infectados de ambos sexos son gonadectomizados (14).

Se ha descrito que el mecanismo de acción de estas moléculas sobre los parásitos está dado mediante acción de receptores esteroides que reconocen las moléculas señalizadoras del hospedero y activan vías metabólicas del parásito.

Por otra parte, estas hormonas también tienen un efecto sobre el sistema inmune del hospedero, lo que puede favorecer o impedir el establecimiento de ciertas infecciones parasitarias; lo anterior debido a que las células del sistema inmune presentan receptores para esteroides sexuales los cuales ejercen efectos sobre la activación, regulación, proliferación y diferenciación en estas células (18–21).

Tabla 2. Efecto directo de los esteroides sexuales en distintos helmintos

<i>Hormona</i>	<i>Efecto</i>	<i>Parásito</i>
Estradiol	Aumento en la reproducción	<i>Taenia crassiceps</i>
	Resistencia a la infección	<i>Ancylostoma caninum</i>
Progesterona	Aumento en la tasa de evaginación de escolex	<i>Taenia solium</i>
Testosterona	Resistencia de la infección	Cisticercos (<i>Taenia</i> spp)
	Esterilidad	<i>Schistosoma mansoni</i>
	Susceptibilidad a infección	<i>Ancylostoma caninum</i>

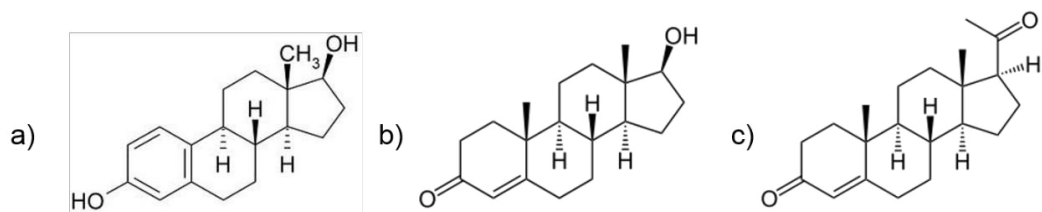


Figura 4. Principales esteroides sexuales. a) Estrógeno b) Progesterona c)

Testosterona

1.4. Receptores hormonales

De manera general se sabe que en los mamíferos los esteroides sexuales ejercen su acción mediante la unión de la molécula señalizadora con su receptor nuclear. A partir de esta unión se generan transcritos que posteriormente modificaran el metabolismo, diferenciación y/o crecimiento de la célula diana (22).

Este tipo de receptores generalmente cuentan con dominios de dedos de zinc y sitios de unión a ligando y de unión a DNA, ya que actúan como factores de transcripción (23). Más recientemente se han descrito moléculas capaces de ligar a los esteroides en las membranas citoplasmáticas de las células. Estos tienen la capacidad de activar vías de señalamiento que juegan diferentes papeles en las funciones celulares (24).

Entre estas moléculas se ha descrito el componente membranal del receptor a progesterona (PRMC) 1 y 2. No existe mucha información sobre estas proteínas, sin embargo, se sabe que pueden tener una expresión en tejidos no reproductivos, como el hígado y el sistema nervioso. A diferencia de los receptores clásicos, estos no parecen actuar como factores de transcripción. (25–27). En parásitos helmintos se han reportado moléculas similares a los PRMC, sin embargo, hasta la fecha, ninguno se ha caracterizado molecularmente. El estudio de este tipo de receptores, podría aportar conocimiento acerca de la biología del parásito en cuando a su diferenciación, reproducción y/o desarrollo, así como para generar posibles blancos farmacológicos que puedan utilizarse como antihelmínticos.

Capítulo 2

2. Justificación

La triquinelosis es una enfermedad crónica y debilitante, que afecta tanto a países de primer mundo como aquellos en vías de desarrollo. Es necesario el diseño de estrategias de control efectivas para esta enfermedad, por lo que el estudio de los procesos implicados en la relación hospedero-parásito así como la biología del mismo generará el conocimiento que servirá como punto de partida para el desarrollo de nuevos blancos farmacológicos y/o vacunas.

Por esta razón el presente trabajo propone el estudio del posible receptor a progesterona en *T. spiralis*.

Capítulo 3

3. Hipótesis

Los efectos reportados de la progesterona en el desarrollo *in vitro* de *T. spiralis*, se llevan a cabo a través de un receptor similar a progesterona presente en el parásito.

Capítulo 4

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular el receptor a progesterona de *T. spiralis* así como la inmunolocalización del mismo para determinar su posible función.

4.2. Objetivos Específicos

- 1.- Identificar la secuencia del receptor a progesterona en el genoma de *T. spiralis* mediante análisis bioinformáticos.
- 2.- Determinar la secuencia nucleotídica y aminoacídica del receptor a progesterona.
- 3.- Generar anticuerpos policlonales contra el receptor a progesterona.
- 4.- Realizar ensayos de inmunolocalización en cortes de parásitos.

Capítulo 5

5. Material y Métodos.

5.1 Mantenimiento del ciclo de vida del parásito.

La cepa (CHN^o2) de *T. spiralis*, se mantuvo en ratones de la cepa BALB/c que fueron infectados con 300 larvas musculares las cuales se obtuvieron como se describe a continuación. La carcasa de ratones o ratas previamente infectados con LM se digirió artificialmente empleando una solución de Pepsina (Sigma) al 1% y HCL (Merck) al 1% y se incubó a 37° C durante 2h en agitación constante. Posteriormente la solución se pasó a través de una malla de 137 µm y se dejó que las larvas sedimentaran por un tiempo de 20 min. El sobrenadante se descartó y las larvas se lavaron varias veces con solución salina 0.9% hasta eliminar cualquier residuo de la solución de digestión (28).

5.2. Extracción de DNA genómico de *T. spiralis*.

El DNA genómico (gDNA) de *T. spiralis*, se obtuvo a partir de la fase de LM. Para ello, 45000 LM (100 µl) se resuspendieron e incubaron en 10 volúmenes de amortiguador de lisis para DNA (10mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5% SDS) con Proteinasa K [2mg/ml] durante toda la noche a 50° C.

Posteriormente se realizó una extracción con Fenol:Cloroformo (1:1 v/v) en relación 1:1 con la cantidad de muestra digerida.

La fase acuosa se trató con RNasa A [50-100µg/ml] durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y la muestra se extrajo dos veces con Fenol:Cloroformo y una vez con Cloroformo:Alcohol:Isoamílico (relación 24:1) (1:1 en relación con la muestra). El gDNA se precipitó incubando la fase acuosa durante 2 h a -20°C empleando AcONH₃ [2-2.5M] y 0.6 volúmenes de isopropanol. La pastilla de gDNA se obtuvo mediante centrifugación a 15000 x g durante 15 min a 4°C. Posteriormente se lavó con EtOH al 70%, se secó a TA y se resuspendió en 70 µl H₂O Milli Q esterilizada. Las muestras se guardaron a -70°C (29).

5.3. Extracción de RNA total y de RNA mensajero de *T. spiralis*.

El RNA total de la LM se extrajo empleando la técnica de Trizol (Invitrogen). Por cada 100 mg de parásitos se añadió 1 ml de Trizol. Los organismos se homogeneizaron durante 5-10 min en hielo, agitando moderadamente a intervalos de 2-3 minutos. El homogenizado se dejó reposar en hielo durante 5 min y se transfirió a microtubos de 1.5 ml. La mezcla se centrifugó a 15000 x g durante 15 min a 4° C.

Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 5 μ l de DNasa I (Roche 10U/ μ l) por cada 1 ml de fase acuosa y posteriormente se incubó a 37° C por 30 min. A 500 μ l de la digestión se le añadieron 500 μ l de Fenol:Cloroformo-Alcohol isoamílico (P:Cl) relación 5:1 y se agitó moderadamente por 30-45 seg. Después de centrifugar a 15000 x *g* por 15 min a 4°C, se transfirieron 400 μ l de la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió 1 ml de isopropanol, dejando incubar toda la noche, a una temperatura de -20° C.

Posteriormente se centrifugó a 15000 x *g* durante 15 min a 4° C. La pastilla se lavó con alcohol al 75% y se centrifugó a 15000 x *g* durante 5 min. El líquido residual se decantó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente (TA). Dependiendo del tamaño de la pastilla, ésta se resuspendió en 50 μ l de H₂O *Milli Q-DEPC* (dietil-pirocarbonato) como volumen final. Para la obtención del RNA mensajero, este fue recuperado a partir del RNA total empleando el kit MicroPoly(A)Purist™ (LifeTechnologies) acorde a las instrucciones del fabricante. Posteriormente las muestras se guardaron a -70° hasta su posterior uso.

5.4 Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Las secuencias de oligonucleótidos específicos se diseñaron empleando en el programa Oligo v4.1. Los oligonucleótidos designados con F y R indican la dirección “sentido” y “antisentido” respectivamente.

La Tabla 3 resume la información de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Todos los oligonucleótidos tienen una T_m de 56° C a excepción de los que se utilizaron para la secuenciación (T_m: 68° C).

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleotidos utilizados en los ensayos de PCR y RT-PCR

Amplicón	Clave del oligonucleotido	Secuencia (5'-3')	Tamaño del Fragmento (pb)
Caveolina Amino terminal	CTNT-F	ACCATGTCATCTGAGGAA	442
	CTNT-R	GCGCAATGTGTTAAACG	
PRMC (Detección)	PRMC-F	TGAACAACCTTCGACAGTATGAC	209
	PRMC-R	CTGCAAGATCATCGTATGTATC	
PRMC (Secuenciación)	PRMC2-F	CACCGCCCATGAAACGACGCTAT	179
	PRMC2-R	CCTTGAAGCGTCCCTCCCGGCAAA	
PRMC (Clonación)	PRMC-CT-F	GAACAACCTTCGACAGTA	392
	PRMC-CT-R	ACTGATCATCAACATCACAATCAG	
RNA ribosomal 18s (<i>T. spiralis</i>)	18s-F	ACGAAAGTTAGAGGTTTCGAA	419
	18s-R	CCCTCTAAGAAGTGATCAGC	

5.5. Ensayos de PCR y RT-PCR.

Para la síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA), se emplearon 500 ng de RNA total del parásito, un oligonucleótido d(T) además de la enzima SuperScriptII RT (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl de acuerdo con las especificaciones descritas por el fabricante.

La temperatura de síntesis que se empleó fue 45°C por 1h seguida de 15 min a 70°C para inactivar la enzima. El cDNA se almacenó a -70° C hasta su uso. La amplificación de los fragmentos de cDNA de se realizó empleando los oligonucleótidos PRMC (Detección y Clonación) además del CTNT y RNA 18s ribosomal como controles de la reacción y 3 µl de la reacción de cDNA en las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	30 ciclos			Extensión final
94° C - 5 min	94° C - 30 s	56° C - 30 s	72° C - 30 s	72° C - 7 min

Todas las reacciones anteriores de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl, conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 0.5 µM de cada oligonucleótido específico seleccionado y 1.5 unidades de Taq DNA Polimerasa Recombinante (Life Technologies).

En todos los casos 5 µl de las reacciones de PCR se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 0.7-1.5% con bromuro de etidio y se obtuvo el registro fotográfico de estos geles empleando luz UV.

5.6. RACE 5' y 3'.

La obtención de los extremos 5' y 3' faltantes del transcrito se realizó utilizando el kit GeneRacer® Kit con la enzima SuperScript® III RT y siguiendo las especificaciones recomendadas del fabricante. Para las amplificaciones se utilizaron las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	5 ciclos		5 ciclos		25 ciclos		Extensión final
94° C - 5 min	70° C - 30 s	68° C - 30 s	68° C - 30 s	68° C - 30 s	65° C - 30 s	68° C - 30 s	68° C - 7 min

Los productos obtenidos fueron purificados utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up. Posteriormente los fragmentos seleccionados fueron clonados en el vector pCR™4-TOPO® (Life Technologies).

Las construcciones resultantes fueron utilizadas en ensayos de transformación en células TOP10 y su posterior plaqueo en cajas con ampicilina (100 µg/ml) como medio de selección. Se seleccionaron 8 colonias y se realizó un miniprep para la obtención de más plásmido. El plásmido resultante fue secuenciado empleando los servicios del LANBAMA del IPICYT, San Luis Potosí, México

5.7. Análisis de secuencia.

Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron alineadas usando el programa computacional DIALING disponible en red (<http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/dialign/>, Morgenstern, 2004). La predicción de la secuencia aminoacídica se realizó empleando las herramientas Translate tool (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

5.7. Expresión de la proteína recombinante PRMC.

El fragmento de 387 pb que codifica para la región carboxilo terminal de la proteína PRMC de *T. spiralis* se amplificó mediante la técnica de PCR y posteriormente se clonó en el vector pET-102 TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las construcciones así obtenidas se emplearon para transformar bacterias quimiocompetentes TOP 10, las cuales se sembraron en cajas LB-Amp100 durante toda la noche. Se eligieron al azar varias colonias aisladas, a partir de las cuales se obtuvieron los plásmidos para su análisis mediante ensayos de restricción.

Así, se observaron dos fragmentos, uno de 5879 pb y otro de 823 pb al digerir los plásmidos en presencia de las enzimas de restricción Hind III y Xba I (New England Biolab).

Las construcciones que se seleccionaron como candidatos se emplearon para los ensayos de expresión en bacterias BL21 (DE3) Star (Invitrogen).

La inducción de la expresión de la proteína recombinante PRMC de *T. spiralis* (PRMC-Ts) se realizó añadiendo al medio LBamp100 1 mM de isopropyl β -d-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) a una densidad óptica OD600 de 0.5 durante 6 h. Las fracciones solubles e insolubles se separaron y se cargaron 20 μ l de cada una de ellas en geles SDS-PAGE al 10%.

5.8. Purificación de la proteína recombinante PRMC-Ts.

Diez mililitros de medio de cultivo con bacterias previamente transformadas con el plásmido PRMC-Ts e inducidas con IPTG durante 6 hrs, se centrifugaron para formar una pastilla de células. Se agregó 1ml de buffer de lisis y se incubó 1h a TA en agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 10,000g por 30 min a TA y se recuperó el sobrenadante. Este fue conservado a -20° C o bien utilizado inmediatamente para la purificación.

Para equilibrar la agarosa Ni-NTA se vertieron 300 ml de resina a un tubo de 1.6 ml. Este se centrifugó 1 min a 800g, se aspiró el sobrenadante y este fue desechado. Todas las centrifugaciones posteriores fueron a 800g. Después se agregó 1 mL de agua destilada estéril, se resuspendió la agarosa, se centrifugó y se desecho el SN. Posteriormente se agregaron 300 µl de Denaturing Binding Buffer, se resuspendió la agarosa y se centrifugo para después desechar el SN. Este paso se realizó 2 veces. Para la purificación se agregaron 300 µl de lisado celular a la agarosa previamente equilibrada y se incubó 30 min a TA.

Se centrifugo y se guardó el SN para su análisis en SDS-PAGE. Se lavó con 200 µl de Denaturing Binding Buffer se centrifugó, y se guardó una fracción de SN. Estos lavados se llevaron a cabo 2 veces con los 2 buffers de lavado (Denaturing Wash Buffer pH 5.3 y pH 6). Por último la proteína se eluyó con 200 µl de Denaturing Elution Buffer. La mezcla fue centrifugada y en el sobrenadante se obtuvo la proteína recombinante purificada.

5.9. Obtención de anticuerpos anti-PRMC-Ts.

La proteína recombinante PRMC-Ts se cuantificó usando el kit Quick standard Bradford (BioRad) y posteriormente se separó electroforéticamente en geles SDS-PAGE 10%. El gel se tiñó en azul de Coomassie y la banda correspondiente a la proteína PRMC se cortó y homogeneizó en 700 μ l de PBS 1X estéril. Esta proteína, se empleó para la obtención de suero anti-PRMC-Ts.

Para ello, cinco ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad se inmunizaron por un periodo de 4 semanas con 4 μ g de proteína PRMC homogeneizada por ratón en intervalos de una semana. Siete días después de la última inmunización los ratones se sangraron a blanco y el suero que contenía los anticuerpos anti-PRMC-Ts fue almacenado a -20°C.

Para los ensayos de Western-blot y de inmunofluorescencia indirecta, los sueros se diluyeron en TBST 1X a la concentración final indicada para cada ensayo y se adsorbieron durante 1 hr empleando extractos bacterianos los cuales expresaron una proteína recombinante no relacionada a PRMC-Ts clonada en el mismo vector (pET- 102). El suero adsorbido fue utilizado inmediatamente después de realizado este proceso.

5.10. Western-blot de la proteína PRMC-Ts.

La fracción soluble y la fracción membranal de las LM se obtuvieron de acuerdo al método descrito a continuación. Los parásitos se resuspendieron y se homogeneizaron en amortiguador Tris-P (10mM Tris-HCl pH 8.13 con inhibidores de proteasas 50 µg ml⁻¹ l-1-tosilamida-2-feniletílorometil cetona, 25 µg ml⁻¹ N-α-p-tosil-1-lisina-clorometil cetona-HCl, 1 mM fenilmetil sulfonil fluoruro y 2% desoxicolato de sodio). Los lisados se centrifugaron a 11,000g durante 30 min. La fracción soluble se transfirió a un tubo nuevo y la pastilla se resuspendió nuevamente en amortiguador Tris-P.

La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford (BioRad). Se emplearon 25 µg de cada una de las fracciones los cuales se calentaron a 94°C durante 5 min en amortiguador de Laemmli en presencia de β-mercaptoetanol (β-ME) y se cargaron en geles SDS-PAGE (10%).

Las proteínas se separaron electroforéticamente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con amortiguador TBS-T (20 mM Tris [tris(hidroximetil) aminometane], 150 mM NaCl- 0.05% Tween 20 (v/v), pH 7.5) y 5% (w/v) de leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé) durante 1 h a TA y se lavaron 3 veces con TBS-T por 5 min cada uno.

Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-PRMC-Ts (previamente adsorbido) a una dilución 1:500 en amortiguador TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente (TA), se lavó 3 veces con TBS-T (5 min c/u) y en seguida se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano a una dilución 1:3000 durante 1h a TA.

Para la detección de la señal se usaron reactivos para quimioluminiscencia de BioRad y placas radiográficas marca Kodak. La estimación del peso molecular de la proteína de interés se realizó por comparación con marcadores de peso molecular estándar (Dual color plus, BioRad).

5.11. Ensayos de inmunolocalización mediante inmunofluorescencia indirecta en cortes de parásitos.

Los parásitos obtenidos se lavaron en PBS 1X, se colocaron en medio para congelamiento de tejidos (Tissue Freeze Medium, en inglés) (Triangle Biomedical Science) y se congelaron a -80°C.

Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm de grosor y se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS durante 30 min y se lavaron 3 veces en PBS. Los cortes se permeabilizaron en una solución de PBS-SDS 1% durante 5 min a 37°C y se bloquearon con medio RPMI conteniendo ASB 0.5% y SFB al 5% durante 30 min a TA. Posteriormente los cortes de parásitos se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-PRMC (previamente adsorbido) a una dilución 1:500 en amortiguador PBS durante 1 h a TA. Los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, en inglés) (Sigma) a una dilución 1:200 durante 1h a TA. Después de tres lavados con PBS, se montaron en Vectashield (Vector Laboratories Inc.). Los cortes se analizaron usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss, con filtros para FITC.

Capítulo 6

6. Resultados

6.1. Análisis *in silico* de la secuencia de PRMC de *T. spiralis*

Se encontró un transcrito predicho en el genoma de *T. spiralis* que codifica para una proteína que tiene similitud con PRMC2 de otros organismos (XM_003375886). Esta secuencia cuenta con 705 pares de bases, sin embargo, carece de regiones no transcritas (UTR's) además de que no presenta un sitio de poliadenilación, característica de todos los RNA's mensajeros (figura. 5).

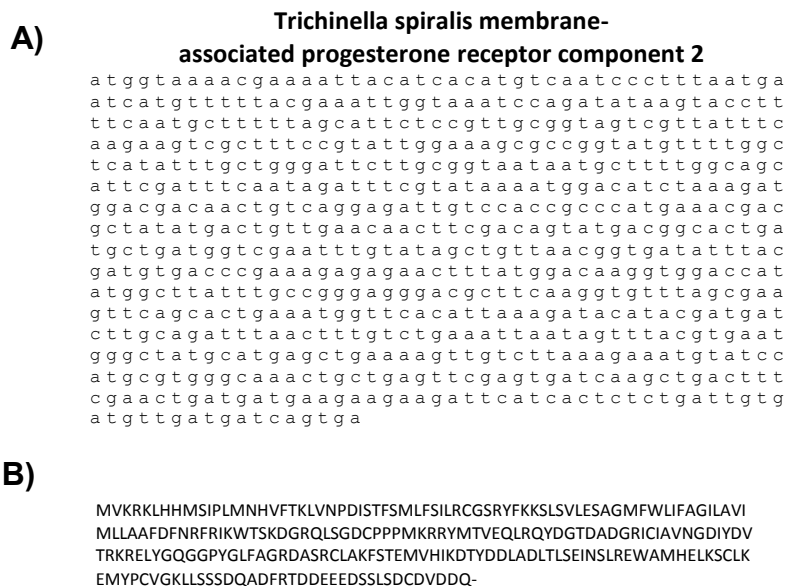


Figura 5. Análisis *in silico* de la secuencia de PRMC2 de *T. spiralis*. A) Secuencia reportada en el Genbank. B) Traducción *in silico* del transcrito PRMC2 de *T. spiralis*.

Se realizó una transcripción *in silico* de este transcrito la cual mostró una proteína hipotética de 234 aminoácidos con un peso molecular estimado de 26.71 kDa (figura 5).

Así mismo, se utilizó la herramienta TMHMM Server v. 2.0, la cual permite determinar sitios transmembranales en una secuencia de proteína. El análisis mostró que la proteína codificada por el transcrito cuenta con un sitio transmembranal, además de un sitio citoplasmático y un sitio extracelular (figura 6). Posteriormente un análisis de la secuencia en la plataforma BLAST se determinó que cuenta con un dominio de unión a esteroides (figura 8).

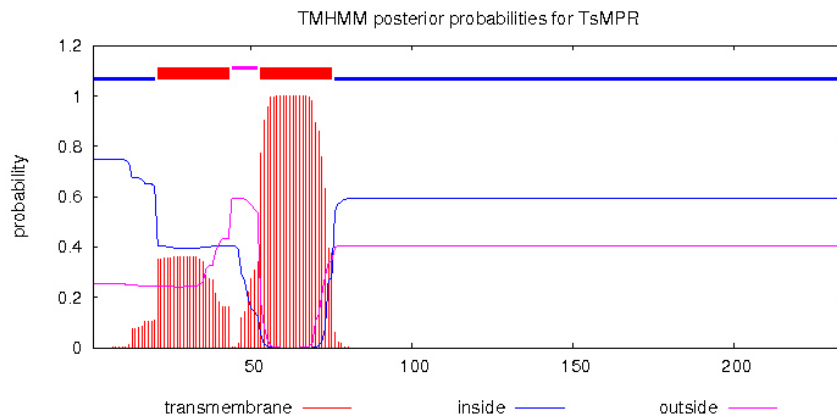


Figura 6 Análisis *in silico* de la topología de la proteína PRMC2 de *T. spiralis*. Las líneas rojas indican la posibilidad de que esa fracción de la proteína este en una región transmembranal, las azules, una región citosólica y las rosas una región extracelular.

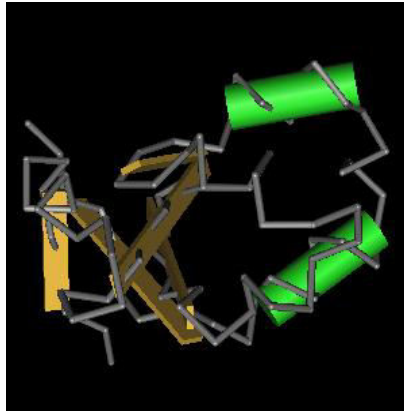


Figura 7. Dominio de unión a esteroides encontrado en la proteína PRMC2 de *T. spiralis*

6.2. Determinación de la expresión de PRMC2 en larvas musculares de *T. spiralis*

Se realizó una RT-PCR para obtener cDNA de LM, este fue utilizado como templado para una PCR utilizando los pares de primers PRMC (figura 7). En el análisis por electroforesis se observa una banda de alrededor de 200 pb, que corresponde al amplicón esperado, y otra de alrededor de 300pb, la cual no se esperaba y se determinó que podría ser contaminación con DNA genómico (gDNA) (figura 9a). Se adicionó DNAsa al cDNA para eliminar la posibilidad de contaminación con gDNA. A pesar de la adición de la enzima la banda de 300 pb siguió amplificándose (Fig. 9b).

NewSequence:315F22		NewSequence:284F23		NewSequence:316F17	
5' TGAACAACCTCGACAGTATGAC 3'	22-mer	5' CACCGCCCATGAAACGACGCTAT 3'	23-mer	5' GAACAACCTCGACAGTA 3'	17-mer
Length:	819 points	Length:	841 points	Length:	775 points
Score:	315	Score:	284	Score:	316
5' Position:		5' Position:		5' Position:	
T _m /T _m :	55.2	T _m /T _m :	64.2	T _m /T _m :	49.2
ΔG/Δg (25 °C):	-31.8	ΔG/Δg (25 °C):	-38.9	ΔG/Δg (25 °C):	-24.9
ΔS/Δs:	-480.8	ΔS/Δs:	-527.2	ΔS/Δs:	-381.5
ΔH/Δh:	-175.2	ΔH/Δh:	-196.1	ΔH/Δh:	-129.9
3'ΔG:	-6.2 kcal/mol	3'ΔG:	-6.0 kcal/mol	3'ΔG:	-5.8 kcal/mol
Degeneracy:	1	Degeneracy:	1	Degeneracy:	1
P.E.#:	452/452	P.E.#:	548/548	P.E.#:	387/387
1/E:	4.56 nmol/A ₂₆₀ 31.0 μg/A ₂₆₀	1/E:	4.61 nmol/A ₂₆₀ 32.5 μg/A ₂₆₀	1/E:	5.72 nmol/A ₂₆₀ 30.2 μg/A ₂₆₀

NewSequence:444R22		NewSequence:585R24		NewSequence:692R23	
5' GACACCTACGACGACTGGCCG 3'	22-mer	5' TTGCGGGAGGGACGCTTCAAGG 3'	24-mer	5' CTGATTGTGATGTTGATGATCAG 3'	23-mer
Length:	395 points	Length:	493 points	Length:	193 points
Score:	444	Score:	585	Score:	692
3' Position:		3' Position:		3' Position:	
T _m /T _m :	4.4	T _m /T _m :	--	T _m /T _m :	--
ΔG/Δg (25 °C):	-7.9	ΔG/Δg (25 °C):	-1.5	ΔG/Δg (25 °C):	-31.7
ΔS/Δs:	-157.6	ΔS/Δs:	-79.9	ΔS/Δs:	-489.3
ΔH/Δh:	-54.9	ΔH/Δh:	-25.3	ΔH/Δh:	-177.3
3'ΔG:	-179.8 kcal/mol	3'ΔG:	-6.8 kcal/mol	3'ΔG:	-6.0 kcal/mol
Degeneracy:	1	Degeneracy:	1	Degeneracy:	1
P.E.#:	579/594	P.E.#:	579/37	P.E.#:	451/53
1/E:	4.86 nmol/A ₂₆₀ 32.9 μg/A ₂₆₀	1/E:	4.39 nmol/A ₂₆₀ 33.0 μg/A ₂₆₀	1/E:	4.43 nmol/A ₂₆₀ 31.9 μg/A ₂₆₀

Figura 8. Análisis *in silico* de los juegos de primers diseñados previamente.

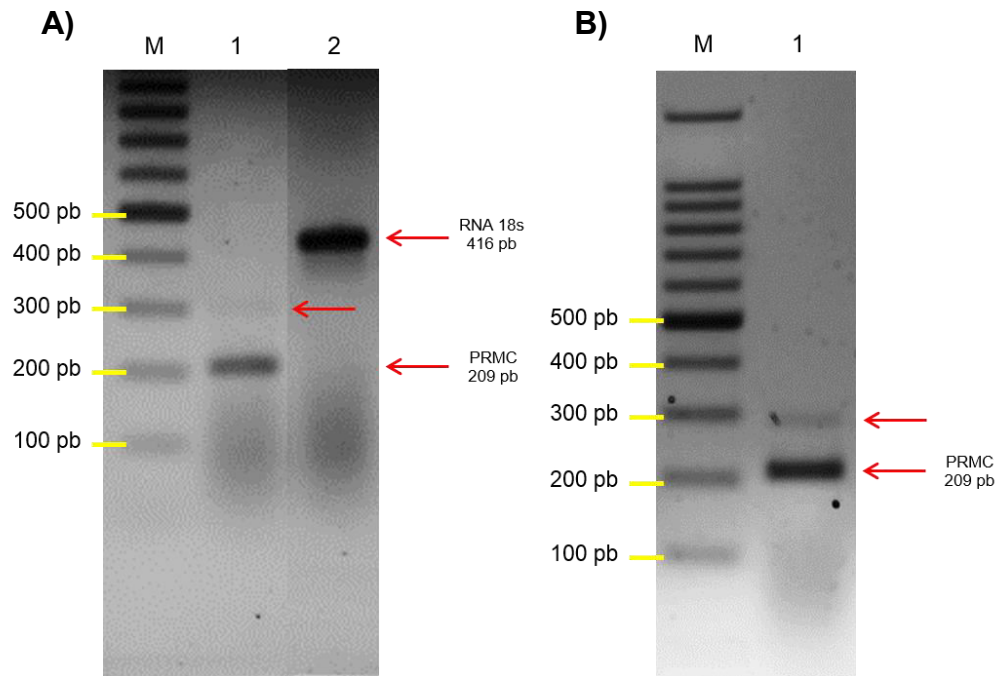


Figura 9. Amplificaciones utilizando los PRIMERS PRMC. A) PCR utilizando cDNA como templado Primers PRMC y 18s como control de reacción. B) PCR utilizando cDNA que fue obtenido a partir de RNA tratado con DNasa

6.3. RACE 5' y 3'

Para obtener la secuencia completa del transcrito de PRMC2 de *T. spiralis* se realizó un ensayo de RACE (por sus siglas en inglés Rapid Amplification of cDNA Ends) 5' y 3'. Esta técnica permite la amplificación de los extremos faltantes de la secuencia. En el caso del extremo 5' se encontraron 2 fragmentos de 485 pb y 580 pb (figura 10a); mientras que en el extremo 3' se encontraron 4 fragmentos de 321, 388, 434 y 858 pb (figura 10b).

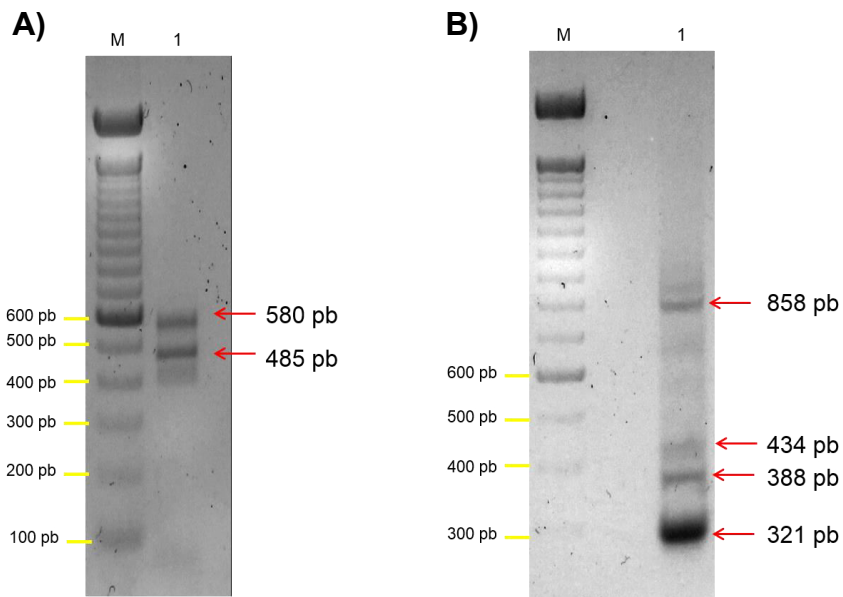


Figura 10. Amplificados resultantes de la técnica RACE 5' y 3'. A) RACE 5'. B) RACE 3'

6.4. Análisis de la secuencia obtenida de la técnica RACES 5' y 3'.

Los fragmentos obtenidos a partir del RACE 5' y 3' fueron purificados y utilizados para una reacción de clonación utilizando el vector pCR™4-TOPO® (figura 13). Posteriormente estos fueron enviados a secuenciar. En el caso del extremo 5' prima se observa que la secuencia de mayor peso molecular (550 pb) se extiende rio arriba aún más que la secuencia previamente reportada. Además, en ambos casos (460 y 550) se encontró una región de alrededor de 40 pb entre las bases 150 a 190 (figura 12). En el caso del extremo 3' se encontraron las regiones de poliadenilación que faltaban en la secuencia reportada previamente (figura 11).

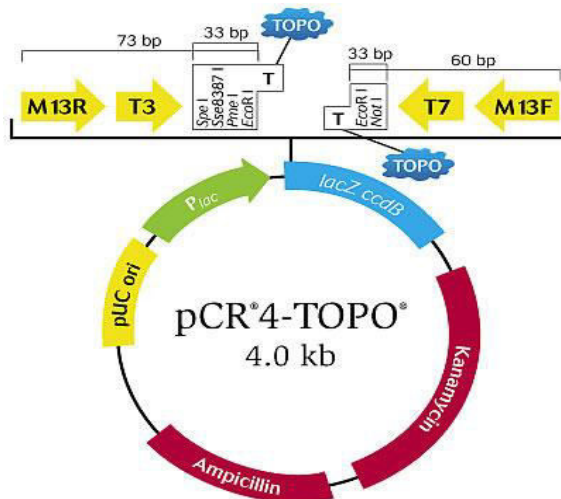


Figura 11. Esquema del Vector pCR 4-TOPO

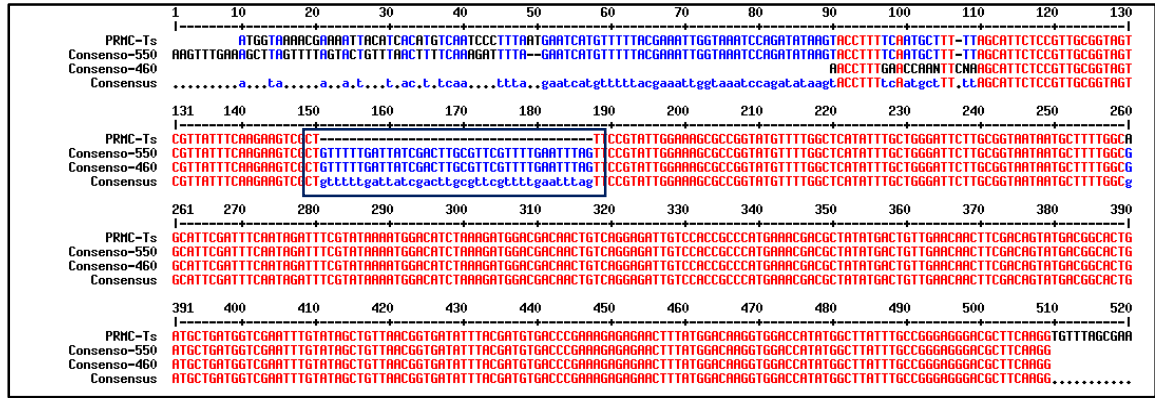


Figura 12. Alineamiento de la secuenciación de los fragmentos amplificados con la técnica de RACE 5'. En el recuadro se muestran los fragmentos que no habían sido reportados previamente

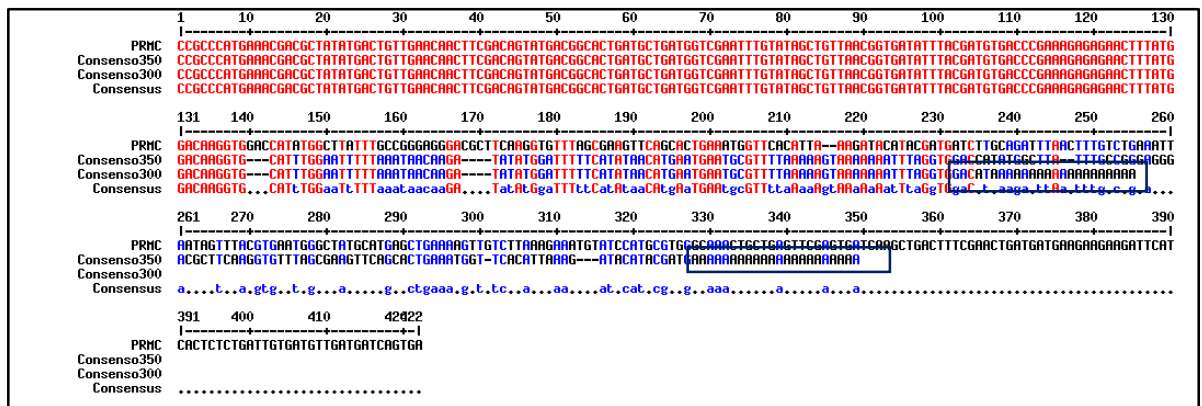


Figura 13. Alineamiento de la secuenciación de los fragmentos amplificados con la técnica de RACE 3'. En el recuadro se muestran los fragmentos que no habían sido reportados previamente

A partir de las secuencias obtenidas se construyeron 2 variantes diferentes del transcrito de 462 y 665 pb respectivamente. Se realizó una traducción *in silico* de ambas secuencias y se encontro que los 2 transcritos codifican una proteína de 93 residuos (figura 14).

A)

PRMC2 *T. spiralis* var. 1

```
tccttttcaatgcttttttagcattctccgttgccggtagtcggtat
ttcaagaagtcgctgtttttgattatcgacttgcgttcggttttga
athtagttccgtattggaagcgcgggtatgtttggctcatatt
tgctgggattcttgcggttaataatgcttttggcggcattcgattt
caatagatttctgtataaaatggacatctaaagatggacgacaact
gtcaggagattgtccaccgccatgaaacgacgctataatgactgt
tgaacaacttcgacagtatgacggcactgatgctgatggtcgaat
ttgtatagctgttaacggtgatatttacgatgtgacccgaaagag
agaactttatggacaaggtgcatttgaatttttaataacaaga
tataatggattttcatataacatgaatgaatgcgttttaaaaagt
aaaaaaaaatttaggtggacataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

462 pb

B)

PRMC2 *T. spiralis* var. 2

```
aagtttgaaagcttagtttttagtactgtttaacttttcaaga
ttttagaatcatgtttttacgaaattggtaaatccagatataa
gtaccttttcaatgcttttttagcattctccgttgccggtagtcg
ttatttcaagaagtcgctgtttttgattatcgacttgcgttcg
ttttgaatttagttccgtattggaaagcgcgggtatgttttg
ctcatatttgcgtgggattcttgcggttaataatgcttttggcgg
cattcgatttcaatagatttctgtataaaatggacatctaaaga
tggacgacaactgtcaggagattgtccaccgccatgaaacga
cgctatatgactgttgaacaacttcgacagtatgacggcactg
atgctgatggtcgaatttgtatagctgttaacggtgatattta
cgatgtgacccgaaagagagaactttatggacaaggtgcattt
ggaatttttaataacaagatatatggatttttcatataacat
gaatgaatgcgttttaaaaagtaaaaaaaaatttaggtggacat
atggcttatttgcgggagggacgcttcaaggtggttagcgaa
gttcagcactgaaatgggttcacattaaagatacatatcgatgaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

665 pb

93 residuos 10.8 kDa pI 9.29

MFWLI FAGILAVIMLLAAFDNFNRFRIKWTSKDGRQLSGDCPPPMKRRYMTVEQLRQYDGTADGRICIAVNGDIYDVTRKRELYGQGAFGIFK

Figura 14. Transcritos del gen PRMC2-Ts. a) Variedades del transcrito PRMC2-Ts. b) Traducción *in silico* de los transcritos PRMC2-Ts (ambos transcritos codifican la misma proteína)

Al realizar ensayos *in silico* sobre la topología de esta proteína, se determinó que cuenta con las características topológicas de las proteínas PRMC. Además, utilizando la plataforma BLAST para realizar lineamientos con otras proteínas similares, se determinó que esta secuencia posee un dominio de unión a esteroides (figura 15).

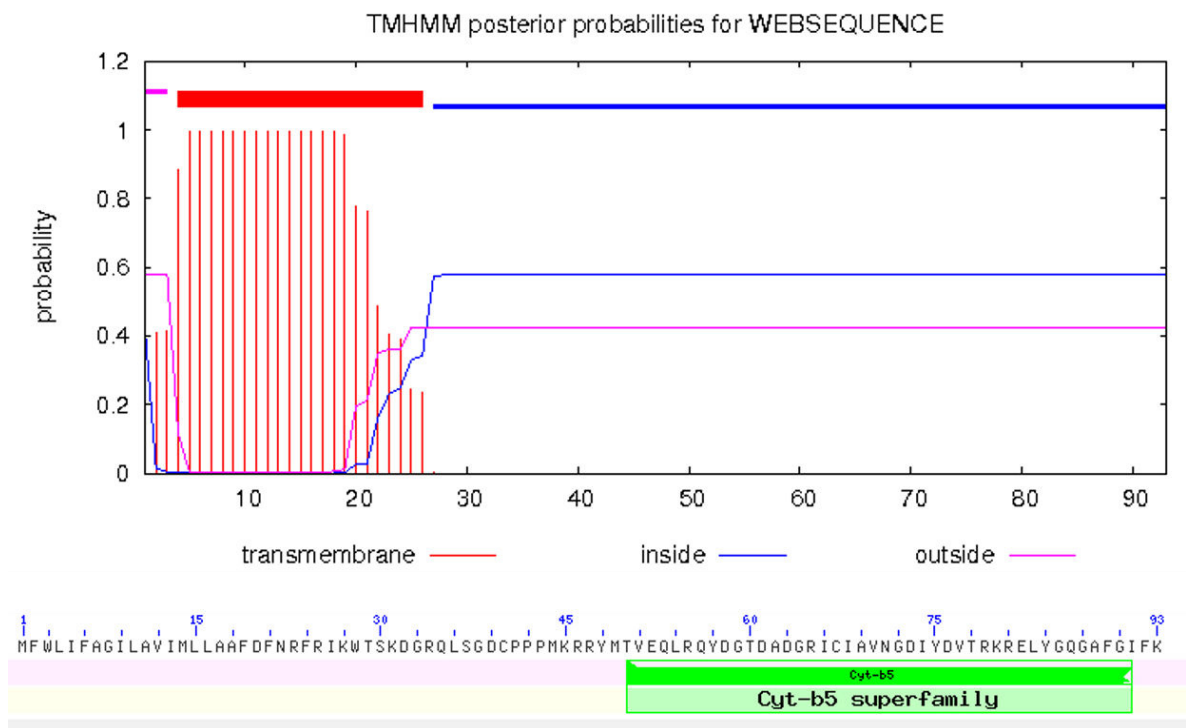


Figura 15. Análisis *in silico* de la proteína PRMC2-Ts a) Topología de la proteína PRMC2-Ts. b) Dominio de unión a esteroides presente en la proteína PRMC2-Ts

Se utilizaron los primers PRMC-CT, para la amplificación de un fragmento del transcrito de PRMC-Ts que corresponde al extremo carboxilo terminal de la proteína, estos dieron lugar a una banda de aproximadamente 380 pb, concordante con lo que se esperaba al diseñar estos primers.

El amplicón de esta reacción fue purificado utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System para descartar la posibilidad de contaminación con la otra variante del transcrito (figura 16).

El fragmento purificado fue utilizado para llevar a cabo una reacción de clonación utilizando el vector Champion™ pET102 Directional TOPO® (Life Technologies) utilizando una relación inserto:vector de 3:1.

La reacción resultante fue utilizada para transformar células TOP10 y posteriormente plaqueadas en agar LBamp100. En la figura 17 se observa la presencia de colonias correspondientes a las bacterias que fueron correctamente transformadas. A partir de estos cultivos se seleccionaron 10 colonias las cuales fueron cultivadas nuevamente en medio LBamp100 para realizar extracciones del plásmido y de esta manera caracterizar las clonas que habían insertado correctamente el fragmento. La construcción de plásmido e inserto tuvo un tamaño teórico de 6702 pb. Para la caracterización de las clonas se utilizó la herramienta NEBcutter, de esta manera se determinó que debían usarse las enzimas XbaI y HindIII en conjunto para liberar el fragmento donde se encontraba el inserto. Las digestiones fueron analizadas electroforéticamente (figura 18 y 19).

Una vez determinado cuales clonas contenían el fragmento estas fueron utilizadas para transformar bacterias BL21, las cuales permitieron la expresión de la proteína recombinante.

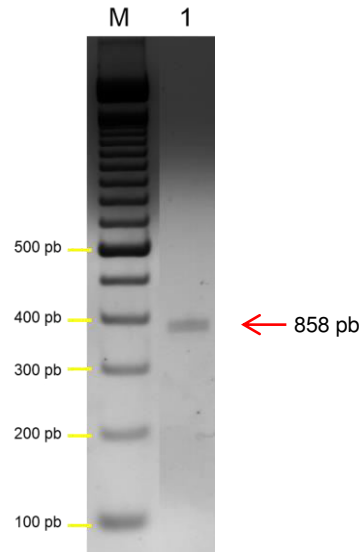


Figura 16. Purificación del amplicon PRMC-Ts. Este fue usado para la reacción de clonación en el vector pET102-TOPO

Se seleccionaron algunas de estas colonias para realizar una cinética de expresión. Estas se cultivaron toda la noche en medio LBamp100. Este cultivo fue utilizado la mañana siguiente para inocular medio fresco, el cual se cultivó por 2 h, se tomó muestra para posteriormente realizar la inducción con IPTG 1 mM. Después de la inducción se tomaron muestras cada 2h.

Las muestras fueron centrifugadas para obtener una pastilla celular y realizar una extracción de proteína. Posteriormente se analizó por electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Se observa la aparición de una banda de aproximadamente 30 kDa a las 2 h posteriores a la inducción. El peso molecular concuerda con el esperado durante el diseño de la proteína recombinante (figura 20).

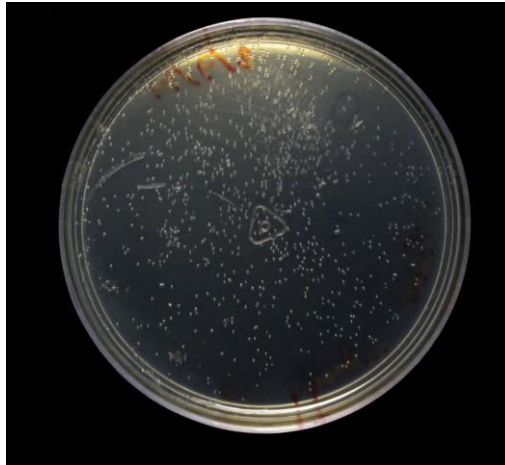


Figura 17. Transformación de células Top10. Las colonias corresponden a bacterias que integraron el plásmido con el inserto.

Se eligió una sola clona para seguir con la producción de la proteína recombinante PRMC2-Ts. Esta clona fue utilizada para realizar cultivos de 50 ml en caldo LBamp100. Estos fueron cultivados por 6h con una inducción de 1mM de IPTG y posteriormente la pastilla celular fue recuperada y dividida en 5 fracciones.

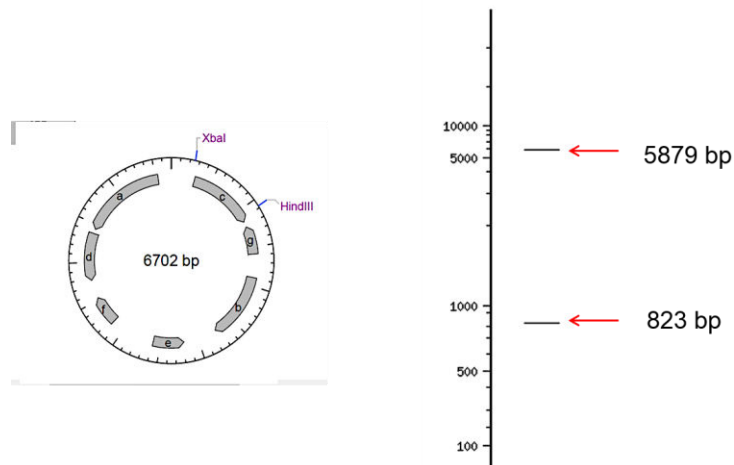
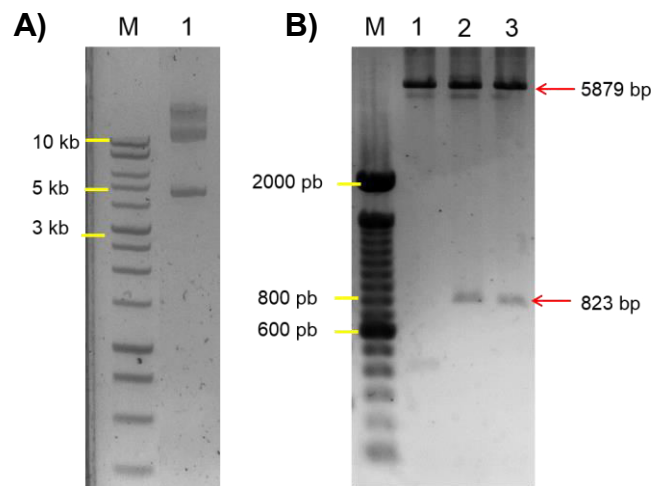


Figura 18. Construcción del plásmido pET102 d-TOPO utilizada para la expresión de la proteína PRMC-Ts recombinante.

Estas fracciones fueron utilizadas para llevar a cabo la purificación de la proteína recombinante mediante el uso de cromatografía de afinidad. Se utilizó el kit Ni-NTA Purification System, este consiste en una serie de lavados seguidos de una elución que permite la purificación de la proteína.

Los lavados así como la elución fueron analizados electroforéticamente en geles de acrilamida al 10%. En el carril correspondiente a la elución se observa la proteína recombinante sin presencia de proteínas de la bacteria (figura 21).



6.5. Obtención de anticuerpos anti-PRMC-Ts

La proteína recombinante purificada fue utilizada para la inmunización de ratones BALB/C hembra. Se realizó una electroforesis con la proteína purificada en un gel de acrilamida al 12%. Posteriormente se realizó una tinción con azul de coomassie para localizar la proteína, se cortó el fragmento de gel donde se encontraba la proteína y este fue homogenizado con PBS.

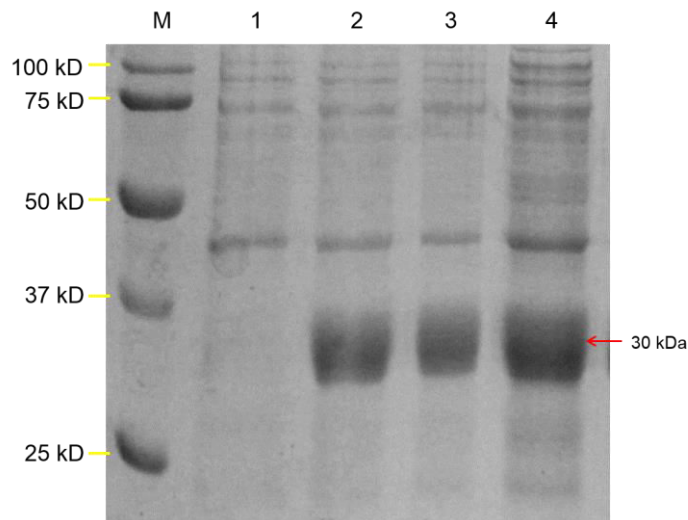


Figura 20. Cinética de expresión de células transformadas BL21 en medio LBamp100 e inducidas con IPTG [1mM]. Carriles: 1) 2 hr sin inducción; 2) 2 hr post-inducción; 3) 4 hr post-inducción; 4) 6 hr post-inducción.

Se prepararon alícuotas de 4 micro gramos, esta fue la dosis de cada inmunización. Se llevó a cabo un esquema de inmunización de 4 semanas, a la quinta semana los ratones fueron sangrados a blanco y la sangre se centrifugo por 15 min a 3000 RPM para la obtención del suero inmune.

Una vez obtenido el suero, este fue adsorbido utilizando membranas de PVDF, las cuales habían sido incubadas con proteína de células BL21 transformadas con el plásmido pET102/D/lacZ (figura 22). Esta adsorción permitió eliminar los anticuerpos inespecíficos que pudieron ser generados, incluyendo los anticuerpos contra la proteína de fusión TRX, el epítopo V5 o el sitio 6xHIS presentes en la proteína recombinante que se utilizó para la inmunización.

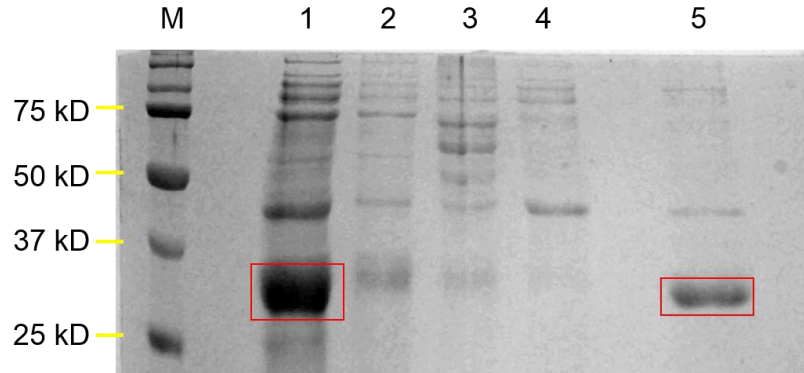


Figura 21. Purificación de la proteína PRMC2-Ts recombinante. Carril 1. Proteína de bacterias BL21 transformadas, inducidas con 1mM IPTG, cultivadas durante 6h. Carril 2-4 Lavados de la columna de cromatografía de afinidad utilizando buffers con un pH mas ácido cada vez. Carril 5 Elución de la proteína recombinante PRMC2-Ts.

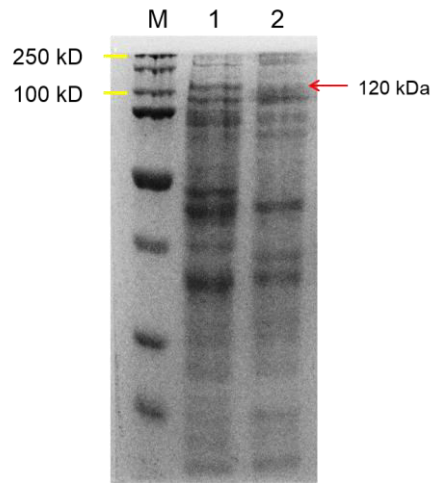


Figura 22. Expresión de la proteína LacZ. Carril 1. Proteína de bacterias BL21 sin transformar. 2. Proteína de bacterias BL21 transformadas con pET102 d-TOPO/LacZ.

Una vez que se adsorbió del anticuerpo, este fue utilizado para un ensayo tipo *Dot Blot*. Para ello se utilizaron alícuotas de 1 microgramo de proteína recombinante las cuales fueron transferidas a una membrana de PVDF.

Posteriormente se probaron diluciones del anticuerpo adsorbido de 1:500 hasta 1:5000; además se probaron 2 diferentes concentraciones de anticuerpo secundario (anti-Ratón) 1:1000 y 1:2000. La detección se realizó utilizando un kit de quimioluminiscencia de GE y se reveló en placas radiográficas Kodak. De esta manera, se determinó que las concentraciones óptimas del anticuerpo para usarse en los ensayos posteriores fueron de 1:500 (anticuerpo primario) y 1:2000 (anticuerpo secundario) (figura 23).

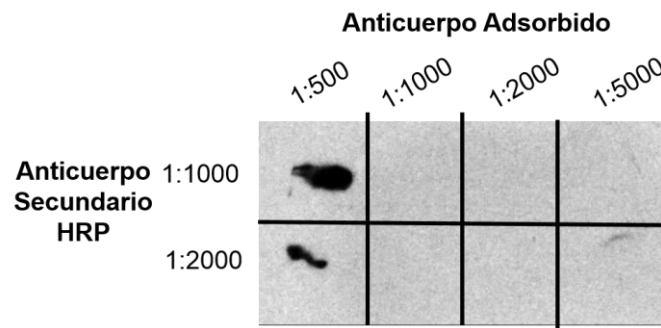


Figura 23. Determinación de la concentración óptima de anticuerpo adsorbido y anticuerpo secundario mediante un ensayo *dot blot*.

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de anticuerpo se llevó a cabo un western blot donde se utilizaron diferentes extractos de proteínas para determinar la especificidad del anticuerpo. El anticuerpo demostró ser específico al solo reconocer la proteína PRMC2-Ts recombinante en el extracto total de proteínas de las bacterias transformadas así como la proteína recombinante purificada (figura 24).

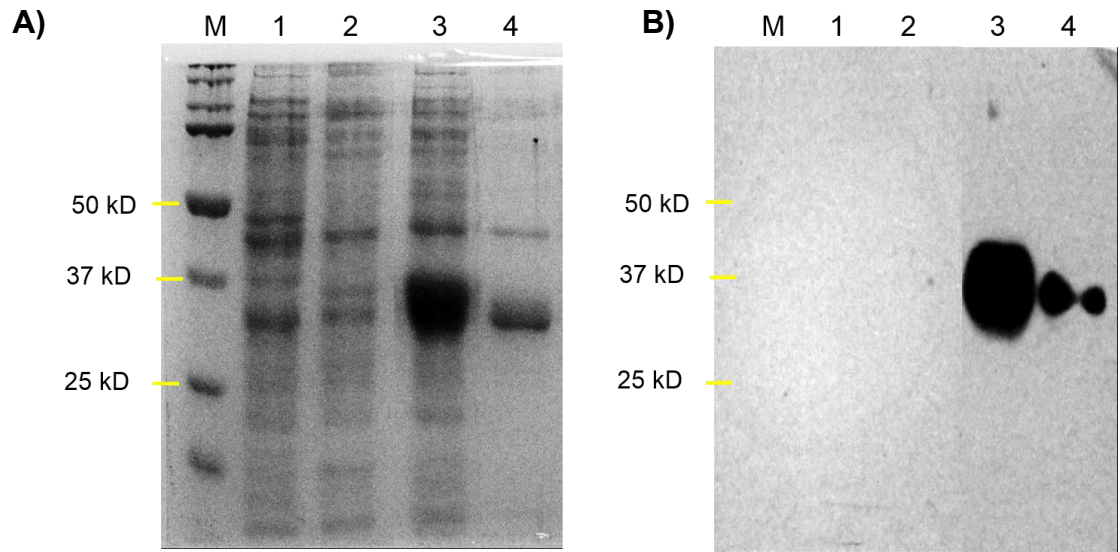


Figura 24. Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-PRMC2-Ts mediante Western Blot. A) Electroforesis en gel de acrilamida de diferentes extractos proteicos. Carril: 1) Células BL21, 2) Células BL21+ pET102/D/lacZ, 3) Células BL21+ pET102/D/PRMC2-Ts, 4) PRMC2-Ts purificada. B) Western blot de las proteínas del gel “A” utilizando el anticuerpo anti-PRMC2-Ts a una concentración de 1:500 y anticuerpo secundario HRP a una concentración de 1:3000.

6.6. Western-blot de la proteína nativa PRMC2-Ts.

Una vez determinada la concentración óptima del anticuerpo anti-PRMC2-Ts, así como la especificidad de este se procedió a realizar un ensayo de Western Blot utilizando las proteínas de la larva muscular de *T. spiralis*. Debido a la naturaleza de la técnica de extracción de proteínas, estas se dividen en 2 fracciones, una soluble y otra insoluble. Se logró detectar una proteína de aproximadamente 11.7 kDa en ambas fracciones del extracto de proteína de *T. spiralis* (figura 25).

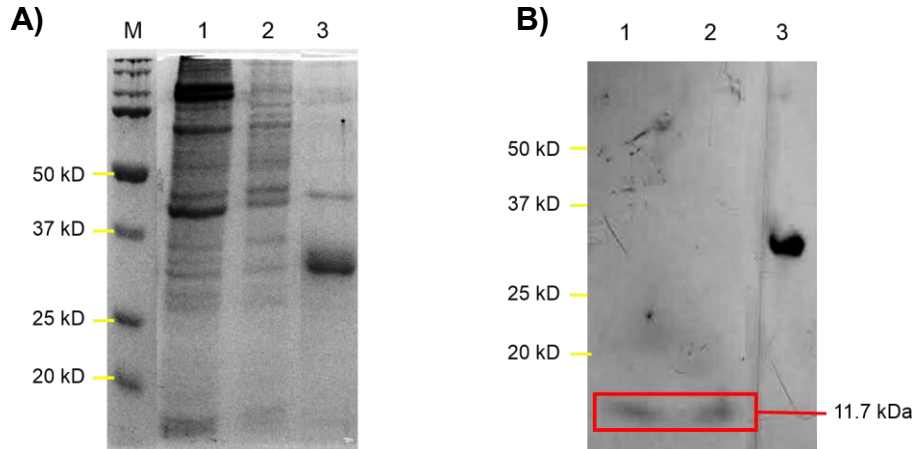


Figura 25. Detección de la proteína nativa PRMC2-Ts en la fracción de proteína soluble e insoluble de *T. spiralis*. a) Electroforesis en gel de acrilamida de proteínas de *T. spiralis*. Carril 1: proteínas solubles de *T. spiralis*; Carril 2: proteínas insolubles de *T. spiralis*; Carril 3: proteína recombinante PRMC2-Ts como control. B) Western Blot de las proteínas observadas en el gel "A", empleando el anticuerpo anti-PRMC-Ts a una concentración de 1:500 y anticuerpo secundario HRP a una concentración de 1:3000.

6.7. Ensayos de inmunolocalización mediante inmunofluorescencia indirecta en cortes de parásitos.

Al realizar la inmunolocalización con el anticuerpo anti-PRMC2-Ts, se observó una señal positiva en el tejido germinal del parásito, específicamente los ovocitos. En la figura 26, se señala la región correspondiente al tejido germinal del parásito. La fluorescencia tenue que presenta el control negativo no se considera positiva.

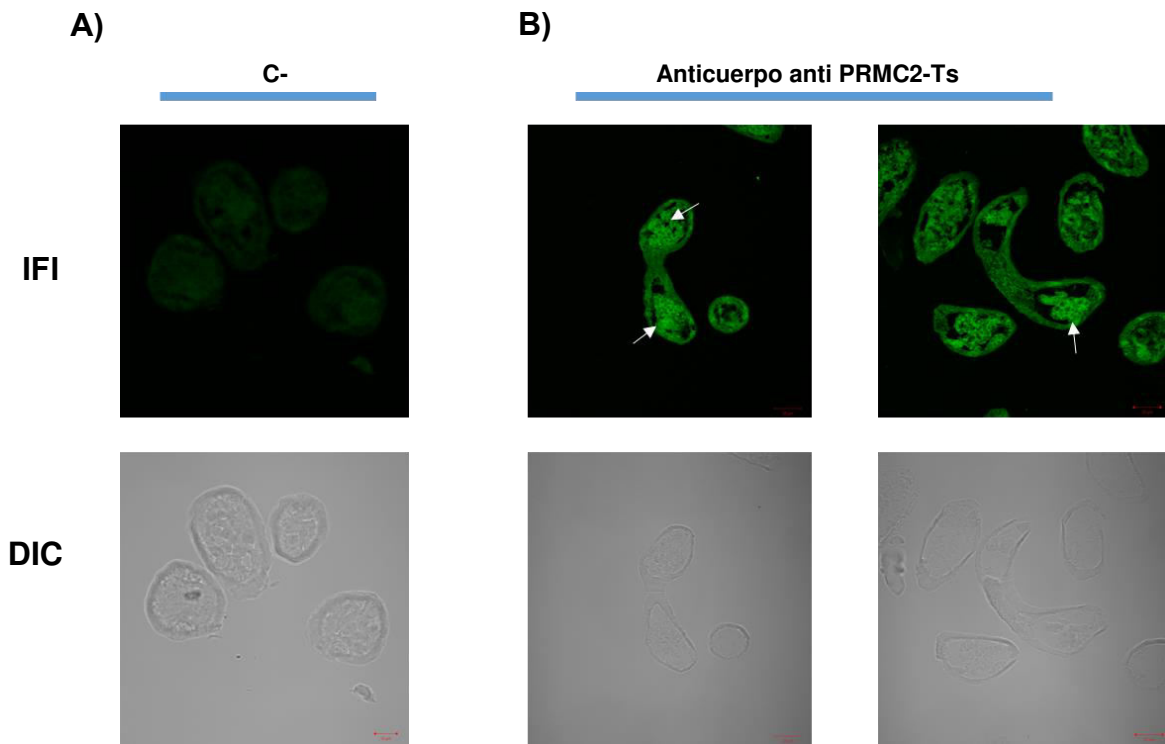


Figura 26 Ensayos de inmunolocalización de la proteína PRMC2-Ts con el anticuerpo anti-PRMC2-Ts. A) Control negativo, se utilizó solamente el anticuerpo secundario. B) Anticuerpo anti-PRMC2-Ts a una concentración de 1:500. IFI, inmunofluorescencia indirecta; DIC, Diferencial de contraste de interferencia.

Capítulo 7

7. Discusión

El genoma de *T. spiralis* fue secuenciado en el 2011 por Mitreva y cols, utilizando la estrategia de “shotgun genome sequencing”. A partir de estos fragmentos se llevó a cabo una construcción de los genes presentes en el genoma del nemátodo. Estos genes abrieron la posibilidad de utilizar herramientas de análisis para detectar la presencia de las diferentes secuencias codificantes que pudiera contener el genoma del parásito. Estos análisis, realizados con herramientas bioinformáticas como EAnnot, SNAP y FgenesH, se basan en algoritmos que encuentran regiones conservadas, tales como los sitios de empalme de secuencias de exones-intrones, sitios de poliadenilación, etc, a partir de los cuales se encontró el transcrito predicho para la proteína PRMC2 (30–32).

Como fue mencionado en los resultados, esta secuencia carece de las regiones no codificantes (UTR's) en los extremos 5' y 3', además del sitio de poliadenilación. Dichas regiones son características de un RNA mensajero y previamente ha sido descrito que los transcritos de *T. spiralis* las poseen (33,34).

El análisis de la traducción *in silico* de este transcrito da lugar a un marco de lectura abierto correspondiente a toda la secuencia de RNA. Utilizando esta secuencia aminoacídica se llevaron a cabo los análisis *in silico* sobre la topología de la proteína.

Como se representó en la figura 6, la proteína cuenta con dominios transmembranales y extracelulares. Esto es concordante con los que se ha reportado previamente para este tipo de proteínas, así como para la proteína análoga PRMC1, encontrada en otras especies (25,27,35).

Por otra parte, al utilizar la plataforma BLAST, para encontrar dominios conservados en la secuencia de esta proteína; se determinó que esta posee un sitio de unión a esteroides en el extremo carboxilo terminal (aa's 118 a 168). Esto está en desacuerdo con lo reportado por Petersen (2012), ya que menciona que el sitio de unión a esteroides se encuentra en el dominio transmembranal de esta proteína (36).

Los primers para la detección del transcrito PRMC2 fueron diseñados a partir de la secuencia del transcrito que previamente estaba reportada. De esta manera al realizar las amplificaciones, usando cDNA de LM como templado, se esperaba un peso molecular del amplicon de 382 pb. Como se mostró en la figura 9, en la electroforesis de esta amplificación se observa una banda del peso molecular correspondiente, sin embargo, se observa otra de mayor peso molecular, es decir de alrededor de 100pb más.

En primera instancia se planteó la posibilidad de una contaminación con DNAg, ya que se sabe que el genoma de *T. spiralis* cuenta con intrones,(37) lo que pudiera aumentar el peso molecular del amplicón. Sin embargo, al utilizar cDNA tratado previamente con DNAsa I como templado de la amplificación, la banda aún se amplificaba. Debido a esto, se consideró el hecho de que el segundo amplicón pudiera ser un producto de transcripción alterna en el gen de PRMC2-Ts.

Previamente se ha descrito que *T. spiralis* puede presentar un fenómeno de “splicing” alternativo en algunos otros transcritos de su genoma (38).

Por otra parte, existen otros reportes de caracterización de receptores hormonales, aunque no de hormonas esteroideas, en helmintos. En estos, generalmente se encuentran más de una forma del gen (alelo) o bien del transcrito; además, estas variaciones se expresan diferencialmente dependiendo del desarrollo del organismo.

Para ejemplificar, se sabe que en el nemátodo de vida libre, *C. elegans*, existen receptores tipo DAF, los cuales tienen una localización nuclear, y diferentes alelos del gen que codifica para el receptor se expresan dependiendo del estado larvario del nematodo (39).

Por otra parte, Pakharukova y cols (2014), determinaron 2 variantes del gen que codifica para el receptor a hormonas tiroideas en el trematodo *Opisthorchis felineus*, además, se observa que los transcritos alcanzan el mayor nivel de expresión en la etapa adulta del helminto (40). Hemer y cols (2014), describieron la presencia de 2 variantes del gen que codifica receptores de insulina, uno de los cuales se expresa de manera predominante (41).

Por lo tanto, es posible que la otra variante del transcrito de PRMC2 de *T. spiralis* pueda expresarse con mayor intensidad en un estado de desarrollo más avanzado del parásito.

Al realizar la técnica de RACE 5' y 3' se observaron diferentes amplicones del transcrito de PRMC2-Ts.

Está claro que esta metodología promueve la aparición de artefactos en las amplificaciones, por este motivo se realizó una reacción anidada, con el fin de eliminar dichos artefactos. Sin embargo, encontramos que los amplicones seguían presentes. Posterior a la purificación y clonación de estos amplicones, se realizó la secuenciación. Se utilizaron las herramientas CHROMAS y Multialin para su análisis. De esta manera se removieron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos de la técnica RACE, incluyendo las pertenecientes al vector. Al realizar alineamientos de las diferentes clonas secuenciadas se llegó a obtener una secuencia consenso, la cual se mostró en la figura 12. En esta se observa un fragmento que no estaba reportado en la secuencia del transcrito de PRMC2 previamente reportada. Dicha secuencia es de alrededor de 40 nucleótidos y va de la posición 150 a 190.

Se realizaron alineamientos de esta secuencia utilizando la plataforma BLAST, sin embargo, no parece codificar para alguna región relevante en la proteína PRMC2.

En cuanto a la región 3', como se muestra en la figura 13, se encontraron 4 amplicones diferentes, sin embargo, al realizar los alineamientos correspondientes, solo se encontró similitud en 2 de ellos (300 y 350 pb). En estos 2 fragmentos se encontraron las regiones de poliadenilación faltantes en la secuencia de PRMC2 previamente reportada. Es importante mencionar que el fragmento de 300 pb presenta el sitio de poliadenilación 100 pb antes que el de 350, esto concuerda con los resultados obtenidos durante las amplificaciones de este transcrito, donde se observan 2 bandas con una diferencia en peso molecular de alrededor de 100pb.

A partir de los resultados de la secuenciación del extremo 5' y 3' se llevó a cabo la construcción de secuencias de las 2 variantes del transcrito de PRMC2-Ts (figura 14). Como se mencionó anteriormente, ambas variantes codifican para la misma cantidad de 93 aa's.

Se ha descrito una variedad del fenómeno de "splicing" alternativo, conocida como "poliadenilación alternativa" (APA). Este proceso consiste en la variación de la región 3' UTR de algún transcrito en particular, la cual puede presentarse de 2 formas: 1) una edición alternativa en la región codificante (CR-APA), la cual afecta a la proteína que será expresada o bien 2) una edición en la región UTR 3' (UTR-APA), en la cual no se modifica el marco de lectura y en donde se expresa la misma proteína en ambos transcritos.

Por otro lado, se ha descrito que el proceso de UTR-APA, puede tener efectos sobre la cantidad de la expresión de una proteína, ya que en el UTR 3', se encuentran regiones que pueden definir la estabilidad del transcrito, así como la localización del producto final, además, en esta región se localizan sitios de unión a micro RNA's así como regiones de regulación tipo *cis*. (42). Aunado a esto, se ha descrito que dicho fenómeno se presenta de manera diferencial dependiendo de las células del organismo, además de su etapa de desarrollo (43).

En lo que se refiere a la detección de la proteína en ambas fracciones del extracto de *T. spiralis* (soluble e insoluble), se ha reportado previamente la detección de esta proteína por inmunofluorescencia en diferentes localizaciones celulares, que incluyen al citosol, la membrana e incluso el núcleo (26).

Se determinó que el peso molecular de la proteína PRMC2 detectada en *T. spiralis* es de 11.7 kDa (figura 25). En general, las proteínas de este tipo se encuentran en el rango de 18-25 kDa (25). Anteriormente se mencionó el reporte de un receptor a hormona tiroidea en el parásito *O. felineus* este presenta 3 diferentes variantes del receptor, las cuales tienen diferentes cantidades de aminoácidos (664, 721,930 respectivamente) y se expresan de manera diferencial durante el desarrollo del parásito (40). Todos estas variantes son diferentes al rango promedio de este receptor en mamíferos, el cual se encuentra alrededor de 400-500 aminoácidos (44–46). De esta manera, podemos inferir que el tamaño de los receptores en invertebrados, especialmente con tanta divergencia como en el caso de *Trichinella*, puede variar.

Por otra parte, aún existe la necesidad de analizar la otra variante del transcrito PRMC2 de *T. spiralis* que fue identificada durante el estudio

La proteína PRMC2 de *T. spiralis*, fue detectada en el tejido germinal del parásito. Esta proteína ha sido reportada en tejidos reproductivos como lo son el útero, ovario y endometrio de mamíferos Además de esto, se ha asociado con los procesos de maduración, diferenciación y proliferación de las células de estos tejidos (26).

Hernández-Bello y cols (2011), demostraron que existe un efecto de las hormonas progesterona, estradiol y testosterona sobre el desarrollo de *T. spiralis*. En específico, la progesterona inhibe el proceso de muda del parásito, lo que lleva a su muerte (47). De esta manera, este efecto puede ser explicado debido a los fenómenos de señalamiento intracelular que rige PRMC2 en *T. spiralis*.

Capítulo 8

8. Conclusión

Se demostró que el parásito *T. spiralis* posee 2 variantes transcripcionales del gen PRMC2. Estas 2 variantes del transcrito tienen el mismo marco de lectura, por lo que codifican para la misma proteína de 93 aa; sin embargo, podría haber un fenómeno de poliadenilación alternativa en la edición de estos transcritos.

La proteína recombinante producida demostró ser eficiente para la inmunización de ratones, ya que esta permitió la obtención de un anticuerpo policlonal que reconoció la proteína PRMC2-Ts en las fracciones soluble e insoluble de *T. spiralis* en condiciones desnaturalizantes (Western Blot), así como en condiciones nativas (inmunofluorescencia indirecta).

La proteína nativa PRMC2 de *T. spiralis*, presentó un peso molecular de 11.7 kDa, tanto en la fracción de proteínas soluble como en la insoluble.

La proteína PRMC2-Ts fue localizada en células germinales del parásito, lo que probablemente le confiere una relevancia sobre el desarrollo, así como la diferenciación de sus células.

9. Referencias

1. SSA. Boletín Epidemiológico Sinave.
2. WHO | Intestinal worms [Internet]. WHO. [cited 2014 Nov 14]. Available from: http://www.who.int/intestinal_worms/more/en/
3. Bundy DAP, Walson JL, Watkins KL. Worms, wisdom, and wealth: why deworming can make economic sense. *Trends Parasitol*. 2013 Mar;29(3):142–8.
4. Pozio E. New patterns of *Trichinella* infection. *Vet Parasitol*. 2001 Jul 12;98(1-3):133–48.
5. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):127–45, Table of Contents.
6. Hotez PJ, Gurwith M. Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2011 Sep;15(9):e611–9.
7. Murrell KD, Pozio E. Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011 Dec;17(12):2194–202.
8. Tinoco-Velázquez I, Gómez-Priego A, Mendoza R, de-la-Rosa J-L. Searching for antibodies against *Trichinella spiralis* in the sera of patients with fever of unknown cause. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002 Jun;96(4):391–5.
9. Martínez-Barbabosa I, Quiroz MG, Romero-Cabello R, Presas AMF, Tsuji ÓV, León MJP, et al. Inmunoepidemiología de la triquinelosis. *Rev Mex Patol Clin*. 2000;47(3):156–61.
10. Marco Antonio Becerril Flores. *Parasitología Médica*. 4ª Ed. McGraw-Hill; 2014.
11. Bruschi F, Chiumiento L. *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy? *Parasit Vectors*. 2011 Mar 23;4:42.
12. J. Tay. *Parasitología medica*. 8a ed. Méndez Editores; 2010.
13. CDC - Trichinellosis - Biology [Internet]. [cited 2014 Nov 25]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/biology.html>

14. Thabet HS, Thabet SS, Ali NM, Ahmed NS. Effects of ovariectomy and thyroidectomy on course and outcome of *Trichinella spiralis* infection in rat. *J Egypt Soc Parasitol.* 2008 Apr;38(1):29–46.
15. Maekawa F, Tsukahara S, Kawashima T, Nohara K, Ohki-Hamazaki H. The mechanisms underlying sexual differentiation of behavior and physiology in mammals and birds: relative contributions of sex steroids and sex chromosomes. *Front Neurosci.* 2014;8:242.
16. Fallon PG, Richardson EJ, Jones FM, Dunne DW. Dehydroepiandrosterone Sulfate Treatment of Mice Modulates Infection with *Schistosoma mansoni*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998 Mar;5(2):251–3.
17. Escobedo G, Camacho-Arroyo I, Hernández-Hernández OT, Ostoa-Saloma P, García-Varela M, Morales-Montor J. Progesterone Induces Scolex Evagination of the Human Parasite *Taenia solium*: Evolutionary Implications to the Host-Parasite Relationship. *BioMed Res Int.* 2009 Dec 13;2010:e591079.
18. Enninga EAL, Holtan SG, Creedon DJ, Dronca RS, Nevala WK, Ognjanovic S, et al. Immunomodulatory effects of sex hormones: requirements for pregnancy and relevance in melanoma. *Mayo Clin Proc.* 2014 Apr;89(4):520–35.
19. Muñoz-Cruz S, Togno-Pierce C, Morales-Montor J. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(13):1714–27.
20. Ghosh M, Rodriguez-Garcia M, Wira CR. The immune system in menopause: pros and cons of hormone therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Jul;142:171–5.
21. Habib P, Beyer C. Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Mar 4;
22. Daniels G, Jha R, Shen Y, Logan SK, Lee P. Androgen receptor coactivators that inhibit prostate cancer growth. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(1):62–70.
23. Manavathi B, Samanthapudi VSK, Gajulapalli VNR. Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:34.
24. Gupta N, Mayer D. Interaction of JAK with steroid receptor function. *JAK-STAT.* 2013 Oct 1;2(4):e24911.

25. Alexandra Wendler MW. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids*. 2012;
26. Pru JK, Clark NC. PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2013 Sep 19 [cited 2013 Oct 23];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3776937/>
27. Rohe HJ, Ahmed IS, Twist KE, Craven RJ. PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): A targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther*. 2009 Jan;121(1):14–9.
28. Dennis DT, Despommier DD, Davis N. Infectivity of the Newborn Larva of *Trichinella spiralis* in the Rat. *J Parasitol*. 1970 Oct;56(5):974.
29. Connolly B, Ingram LJ, Smith DF. *Trichinella spiralis*: cloning and characterisation of two repetitive DNA sequences. *Exp Parasitol*. 1995 May;80(3):488–98.
30. Ding L, Sabo A, Berkowicz N, Meyer RR, Shotland Y, Johnson MR, et al. EAnnot: a genome annotation tool using experimental evidence. *Genome Res*. 2004 Dec;14(12):2503–9.
31. Korf I. Gene finding in novel genomes. *BMC Bioinformatics*. 2004 May 14;5:59.
32. Mitreva M, Jasmer DP, Zarlenga DS, Wang Z, Abubucker S, Martin J, et al. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):228–35.
33. Pettitt J, Philippe L, Sarkar D, Johnston C, Gothe HJ, Massie D, et al. Operons Are a Conserved Feature of Nematode Genomes. *Genetics*. 2014 Aug;197(4):1201–11.
34. Gao F, Wang R, Liu M. *Trichinella spiralis*, potential model nematode for epigenetics and its implication in metazoan parasitism. *Front Physiol* [Internet]. 2014 Jan 10 [cited 2014 Nov 22];4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887316/>
35. Cahill MA. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Jul;105(1-5):16–36.

36. Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, Brewer DN, Del Pino Sans J, Lopez JA. Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front Neurosci* [Internet]. 2013 [cited 2014 Nov 22];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnins.2013.00164/full>
37. Bartschat S, Samuelsson T. U12 type introns were lost at multiple occasions during evolution. *BMC Genomics*. 2010 Feb 11;11(1):106.
38. Jagielska E, Płucienniczak A, Dąbrowska M, Dowierciał A, Rode W. *Trichinella pseudospiralis* vs. *T. spiralis* thymidylate synthase gene structure and *T. pseudospiralis* thymidylate synthase retrogene sequence. *Parasit Vectors*. 2014;7:175.
39. Fisher AL, Lithgow GJ. The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell*. 2006 Apr;5(2):127–38.
40. Pakharukova MY, Ershov NI, Vorontsova EV, Shilov AG, Merkulova TI, Mordvinov VA. Identification of thyroid hormone receptor homologs in the fluke *Opisthorchis felinus* (Platyhelminthes). *Mol Biochem Parasitol*. 2014 Mar;194(1–2):64–8.
41. Hemer S, Konrad C, Spiliotis M, Koziol U, Schaack D, Förster S, et al. Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol*. 2014 Jan 27;12:5.
42. Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL. Mechanisms and Consequences of Alternative Polyadenylation. *Mol Cell*. 2011 Sep 16;43(6):853–66.
43. Ji Z, Lee JY, Pan Z, Jiang B, Tian B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Apr 28;106(17):7028–33.
44. Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(22):8444–8.
45. Thompson CC, Weinberger C, Lebo R, Evans RM. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science*. 1987 Sep 25;237(4822):1610–4.

46. Nakai A, Seino S, Sakurai A, Szilak I, Bell GI, DeGroot LJ. Characterization of a thyroid hormone receptor expressed in human kidney and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Apr;85(8):2781–5.
47. Hernández-Bello R, Ramirez-Nieto R, Muñiz-Hernández S, Nava-Castro K, Pavón L, Sánchez-Acosta AG, et al. Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:625380.