

201
198

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DEL EMBRIOFORO DEL HUEVECILLO DE Taenia saginata.

T E S I S

Que para obtener el Título de Biólogo

P r e s e n t a

VELIA TREJO GOMEZ

México, D.F. 1985.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	4
II. MATERIALES Y METODOS.....	12
III. RESULTADOS.....	31
IV. DISCUSION.....	35
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. REFERENCIAS.....	45
VII. QUERATINAS.....	50

RESUMEN

Los huevecillos de los ténidos están constituidos por un embrión hexacanto, rodeado por varias envolturas de las cuales la más prominente es el embrioforo. El embrioforo es la envoltura más importante en la protección del embrión en el medio ambiente. El embrioforo está formado por bloques protéicos unidos entre sí por un material cementante. En el tubo digestivo del huésped intermediario las enzimas gástricas e intestinales digieren el material cementante, provocando la liberación del embrión.

Esta tesis aporta información acerca de la composición del embrioforo del huevecillo de Taenia saginata. Se obtuvieron bloques embriofóricos de huevecillos de T. saginata con y sin material cementante, siguiendo el método de Morseth (1965) con algunas modificaciones. Se hicieron análisis de aminoácidos tanto de bloques embriofóricos como de embrioforos completos, en los que se encontró que el 40% de los residuos de aminoácido del material cementante son sitios sensibles a tripsina y pepsina y que los bloques embriofóricos tienen un 10.5% de residuos de cisteína. Este valor sugiere que la organización de los bloques embriofóricos se mantiene debido a una gran cantidad de puentes disulfuro.

Por taxonomía numérica se hicieron comparaciones entre los contenidos de aminoácido de los bloques embriofóricos y los contenidos de algunas queratinas y sedas, encontrándose que la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos se parece(n) más a las queratinas de pluma que a las otras queratinas analizadas.

La composición polipeptídica de los bloques embriofóricos se determinó por geles de poliacrilamida, analizando muestras solubilizadas con ácido per fórmico y NaOH 0.1 y 0.5 N. Aunque se encontraron varias bandas, en condiciones reductoras, las bandas más abundantes fueron, una de 65,000 y una de 65,000 d. Se postula que los bloques embriofóricos están constituidos por estas dos cadenas polipeptídicas y que las restantes son producto de su hidrólisis durante el procedimiento de solubilización.

Por otro lado, se hicieron espectros de infrarrojo de bloques embriofóricos y de otras proteínas, entre ellas queratinas, observándose los mismos enlaces para todas las proteínas analizadas. Sin embargo, la abundancia de grupos azufrados en la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos resultó similar a las queratinas y diferente de las otras proteínas.

Cuando se hicieron pruebas de inmunopunto haciendo reaccionar la(s) proteínas de los bloques embriofóricos con anticuerpos específicos anti-queratina humana, no se obtuvo reacción específica.

Finalmente, a través de un microanálisis de rayos-X se encontró que los bloques embriofóricos contienen trazas de silicio. Asimismo, este método permitió la detección del azufre de las cisteínas.

I. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria producida por la forma de metacéstodo o cisticerco de varias especies de ténidos. Estos parásitos presentan ciclos de vida que involucran a dos huéspedes: definitivo e intermediario. El huésped definitivo aloja al gusano adulto en su tubo digestivo, mientras que el intermediario aloja al metacéstodo en sus tejidos. Generalmente, el huésped definitivo es depredador del intermediario. De este modo, se pueden mencionar varios ejemplos de relaciones huésped-parásito: Taenia solium cuya forma adulta parasita al hombre y cuyo metacestodo parasita al cerdo (humano-cerdo); T. saginata: humano-bovino; T. ovis: canino-ovino; T. taeniiformis: felino-murino; Echinococcus granulosus: canino-humano; etc.

I.1. Ciclo de vida del parásito (Fig. 1)

El ciclo de vida de la Taenia saginata se puede comenzar a describir con el gusano adulto habitando en el intestino delgado del hombre. El gusano adulto consta de un escólex o cabeza que posee 4 ventosas con las que se adhiere a la pared intestinal, así como de un rostelo desarmado (sin ganchos). El escólex se adelgaza en su parte inferior formando un cuello productor de proglótidos. Los proglótidos unidos en cadena constituyen el

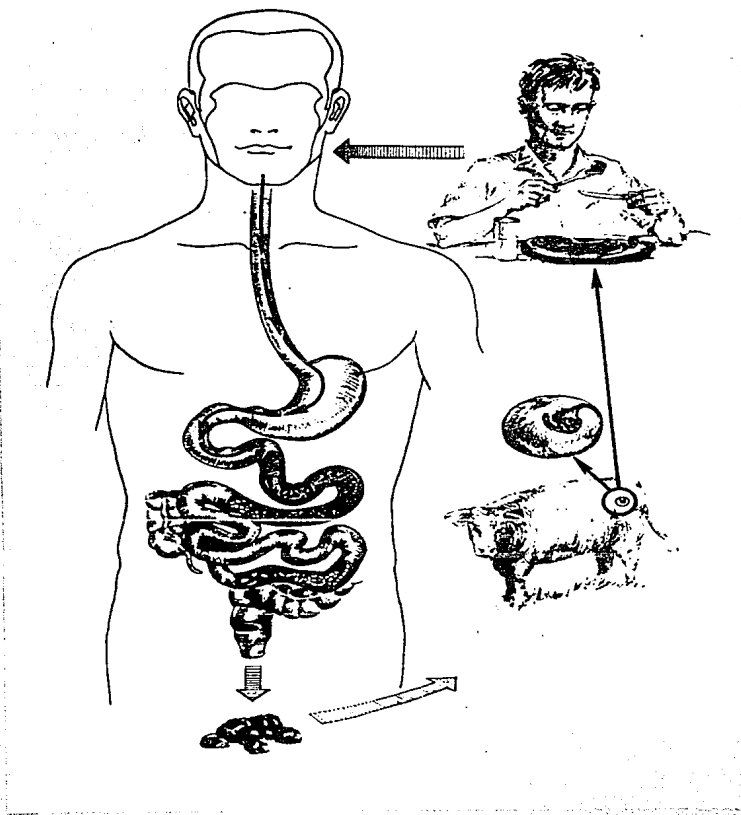


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia saginata* (ver explicación en el texto).

Tomada de Beck y Davies, 1976.

cuerpo o estróbilo. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados, mientras que los más distales presentan aparato reproductor tanto masculino como femenino. Los proglótidos cuyos úteros están llenos de huevecillos se denominan grávidos.

Estos proglótidos grávidos se desprenden espontáneamente del cuerpo de la tenia y son evacuados en las heces fecales del huésped definitivo (humano). En el exterior, la putrefacción de los proglótidos permite la dispersión de los huevecillos que pueden contaminar forrajes y aguas.

Los embriones hexacanto u oncosferas, contenidos en los huevecillos permanecen infectantes por largos periodos gracias a una serie de envolturas protectoras (Gemmell, 1978), hasta que son ingeridos por el huésped intermediario (bovino). En el tubo digestivo del huésped intermediario, la enzimas proteolíticas destruyen las envolturas protectoras liberando las oncosferas, que son activadas por la acción de las sales biliares (Silverman, 1954). Las oncosferas activadas atraviesan la pared intestinal, alcanzando los capilares linfáticos o sanguíneos, que las distribuyen a diversos órganos y tejidos en donde se implantan y se desarrollan hasta convertirse en cisticercos.

El ciclo se cierra cuando un humano ingiere carne cruda o insuficientemente cocida, proveniente de un bovino cisticercoso. Similarmente, las enzimas gástricas e intestinales junto con las sales biliares, activan al cisticerco, cuyo escólex evagina, se fija en la pared intestinal y se desarrolla en una tenia adulta productora de proglótidos.

I.2. Morfología y ultraestructura de los huevecillos

Es bien sabido que los huevecillos de distintas especies de ténidos son muy similares morfológicamente (Inatomi, 1962; Morseth, 1965; Nieland, 1968). Los huevecillos de *T. saginata* son indiferenciables de los de *T. solium* aún con la ayuda del microscopio electrónico (Laclette, et al, 1982). En consecuencia, la descripción de los huevecillos de *T. solium* que se presenta a continuación, es totalmente aplicable a los de *T. saginata*.

Los huevecillos maduros son de forma esférica y miden entre 32 y 42 μ de diámetro. Al microscopio óptico presentan una coloración parda y una envoltura prominente de apariencia radiada (Fig. 2). Poseen varias envolturas (Figs. 3 y 4), la más externa de las cuales se denomina vitelo (Laclette et al, 1982). Esta envoltura es de naturaleza celular con abundantes mitocondrias y glucógeno. La siguiente envoltura es el embrioforo, formado por bloques protéicos unidos entre sí por un material cementante. El embrioforo es sin lugar a dudas la envoltura que más contribuye en la protección de la oncosfera, debido a su impermeabilidad y a su gran resistencia a diversos agentes físicos y químicos (Mackie y Parnell, 1967). De acuerdo con Lee y cols. (1959), el embrioforo es sintetizado por una envoltura citoplásmica interna, de apariencia granular, conocida como célula embrioforal. Los bloques embriofóricos presentan la forma de un paralelepípedo con 2 bases, una superior más amplia hacia afuera del huevecillo y la inferior hacia el embrión con protuberancias en forma de picos. En sus caras laterales, los bloques embriofóricos presentan pequeños

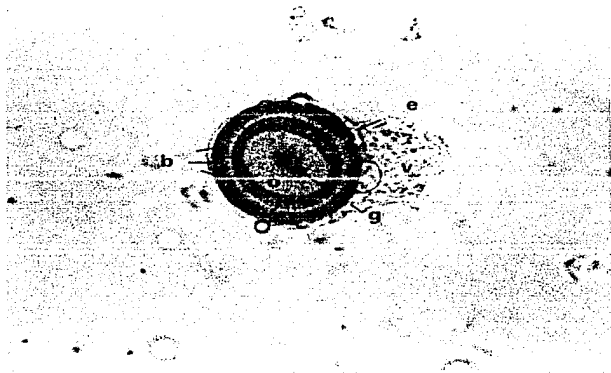


Figura 2. Fotografía al microscopio óptico de un huevecillo de Taenia saginata.

e= embriofo
 b= bloques embriofóricos
 g= ganchos
 o= oncosfera
 v= vitelo

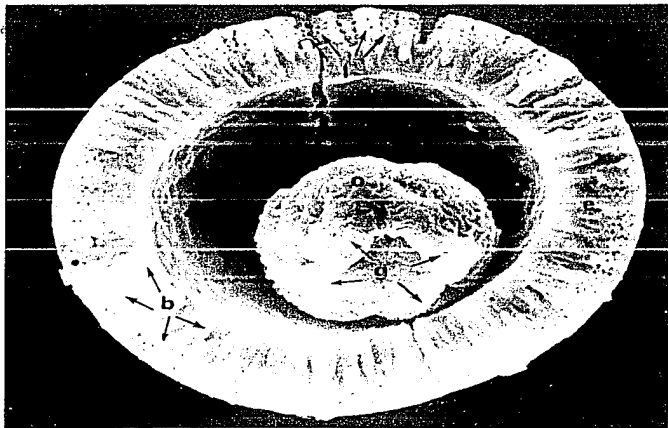


Figura 3. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de un huevecillo de Taenia solium.

b= bloques embriofóricos
 e= embriofo
 g= ganchos
 o= oncosfera
 l= lacunee

Tomada de Laclette, et al, 1982.

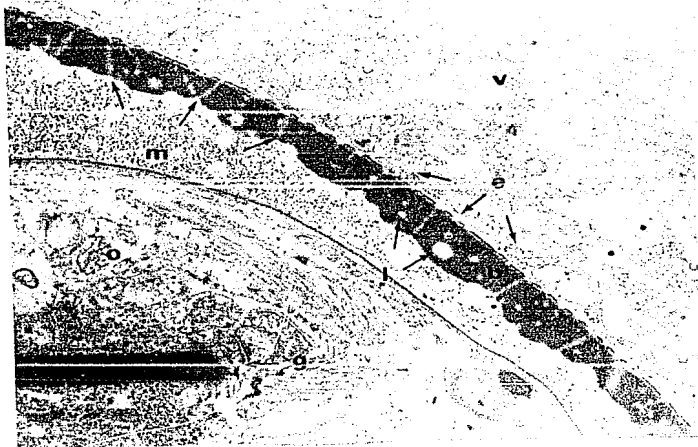


Figura 4. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión, de un corte de un huevecillo de *Taenia solium*.

b= bloques embriofóricos
e= embrioforo
g= ganchos
l= lacunae
m= material cementante
o= oncosfera
v= vitelo

Tomada de Laclette, et al., 1982.

presentan pequeños orificios de forma irregular que reciben el nombre de lacunae y que son los huecos dejados por las mitocondrias que estuvieron presentes durante la formación del embrioforo. La apariencia radiada de los huevecillos se debe precisamente a los bloques embriofóricos. Por dentro de la célula embrioforal se encuentra una envoltura lipoprotéica que rodea al embrión, denominada membrana oncosferal (Huffman y Jones, 1962). Por último, se encuentra la oncosfera multicelular que posee 3 pares de ganchos birrefringentes.

I.3. Fisiología de la activación oncosferal

Cuando el huevecillo es ingerido por el huésped intermediario, el ácido clorhídrico y la pepsina gástrica debilitan al material cementante del embrioforo (Silverman, 1954). Posteriormente, las condiciones alcalinas presentes en el intestino delgado, neutralizan al ácido gástrico y permiten la acción de las enzimas intestinales, principalmente de la tripsina (Silverman, 1954), ocasionando la degradación completa del material cementante. En consecuencia, los bloques embriofóricos se dispersan para dejar libre a la oncosfera envuelta por la membrana oncosferal. Las sales biliares provocan un aumento en la permeabilidad de la membrana oncosferal, hecho que provee la señal para la activación de la oncosfera, que a base de movimientos de sus 3 pares de ganchos se deshace de la membrana. La oncosfera comienza a moverse como resultado de la interacción antagónica entre músculos somáticos y músculos de los ganchos (Letbridge, 1980). En este

momento, se considera que la oncosfera activada es capaz de atravesar la pared intestinal por una combinación de la acción mecánica de los ganchos y la acción lítica de enzimas liberadas por las glándulas de penetración (Silverman, 1954; Ogren, 1957). Lethbridge en 1980 encontró que la secreción de estas glándulas posee actividad de hialuronidasa, mientras que Lewert y Lee en 1955, encontraron actividad de colagenasa. Las glándulas de penetración tienen forma de "U" y se localizan en la base de los ganchos, de tal modo, que el movimiento de estos produce la expulsión de la secreción almacenada.

I.4. Justificación del trabajo

Los huevecillos son el único estadio en el desarrollo de los ténidos que abandona las condiciones favorables existentes en el huésped. Las envolturas de los huevecillos capacitan a la oncosfera para sobrevivir en un medio cambiante y potencialmente hostil (Gammell y Lawson, 1983). Como se mencionó anteriormente, la envoltura protectora más importante es el embrioforo, cuya resistencia está bien documentada (Mackie y Parnell, 1967). Sin embargo, la resistencia del embrioforo en el medio ambiente contrasta con su gran susceptibilidad a las condiciones presentes en el tubo digestivo del huésped intermediario. Se trata pues, de una envoltura con propiedades aparentemente opuestas.

La morfología de los huevecillos de las diferentes especies de ténidos es tan parecida que se piensa que la composición química del embrioforo es idéntica o por lo menos muy similar. El conocimiento de la naturaleza química del embrioforo es de gran interés ya que permitiría no solamente, seleccionar agentes químicos con actividad ovicida (Morseth, 1965), sino que posibilitaría también, un mejor conocimiento de los mecanismos que producen la liberación de la oncosfera en el tubo digestivo del huésped intermediario. Cabe hacer notar que se desconoce si la oncosfera mantiene algún tipo de intercambio con el medio ambiente, necesario para llegar a ser infectante. En este sentido, se ha propuesto que el huevecillo continúa su desarrollo aún en el exterior (Gammell, 1978).

I.5. Antecedentes del trabajo

Existen algunos estudios sobre la composición del embrioforo de los huevecillos de ténidos. En 1957, ensayos citoquímicos realizados por Johri en huevecillos de Multiceps smithii, mostraron resultados negativos con tinciones específicas para quitina y esclerotina. Sin embargo, los embrioforos se teñían intensamente cuando utilizó ácido per fórmico de Schiff, que reacciona con uniones disulfuro. A partir de estos resultados, se sugirió que la proteína que componía al embrioforo podría ser del tipo de las queratinas. En 1965, Morseth llevó a cabo reacciones histoquímicas con ácido per fórmico de Schiff, en huevecillos de T. hvdatigena, T. ovis y T. pisiformis, obteniendo también resultados positivos. Además, purificó

los bloques embriofóricos de estos ténidos e hizo análisis cualitativos de aminoácidos, espectros de infrarrojo, determinaciones de nitrógeno y contenido de azufre. A partir de sus resultados Morseth propuso que la proteína que componía a los bloques embriofóricos era del tipo de las queratinas.

Por otro lado, en base a estudios histoquímicos similares se ha propuesto que los ganchos rostelares de los ténidos están constituidos por una proteína similar a las queratinas (Crusz, 1947). En 1969, Dvorak purificó los ganchos rostelares de T. taeniaeformis y realizó análisis elementales (determinaciones de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre, etc.), análisis cuantitativos de aminoácidos, así como espectros de infrarrojo, concluyendo que la proteína que componía los ganchos era similar a la proteína de los bloques embriofóricos. Finalmente, resultados de ensayos histoquímicos en metacercarias de Fasciola hepática (Dixon y Mercer, 1967; Dixon, 1968) y de Cloacitrema narrabeensis (Dixon, 1975), han sugerido que la proteína de la capa externa de la pared vesicular tiene propiedades tipo queratina. Estudios de microscopía electrónica en metacercarias de Fasciola hepática muestran que esta envoltura está formada por pequeños paquetes protéicos (en forma de elipsoide) unidos por un material cementante (Dixon y Mercer, 1964). Incluso se han identificado las células responsables de su síntesis (Dixon, 1968; Mercer y Dixon, 1967).

El hecho de que los estudios mencionados anteriormente, sugieran la existencia de una proteína de tipo queratina en helmintos y tremátodos, es interesante ya que se había considerado a las queratinas como exclusivas

de vertebrados superiores (reptiles, aves y mamíferos) (Fraser, 1969). Sin embargo la información existente al respecto de la composición química de la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos se basa exclusivamente en estudios histoquímicos y análisis cualitativos. Dada la importancia que representa el embrioforo para el entendimiento de los mecanismos de la protección y liberación de la oncosfera, el objetivo del presente trabajo fué el de aportar información acerca de la composición química de las proteínas del embrioforo del huevecillo de la Taenia saginata.

II. MATERIALES Y METODOS

En vista de la escasa información que existe acerca de la infectividad de los huevecillos de Taenia saginata para el humano, estos se consideraron riesgosos. En consecuencia, todos los procedimientos relacionados con el manejo de proglótidos y huevecillos, se realizaron en un área especialmente equipada y destinada para el manejo de organismos patógenos, utilizando una campana de seguridad biológica (clase II).

II.1. Obtención de los especímenes de T. saginata:

Dos ejemplares de Taenia saginata fueron obtenidos por tratamiento de pacientes (previamente diagnosticados) con Yomesan (clorosalicilamida), que produce la expulsión de los gusanos intactos. Las tenias extraídas de las heces mediante el uso de pinzas, fueron colocadas en vasos de precipitados de 100 ml que contenían una solución estéril de NaCl 0.15 M, amortiguada con 0.01 M de fosfatos, pH 7.4 (PBS), adicionada con los siguientes antibióticos: sulfato de gentamicina (40 mg/ml); ácido nalidixico (10 mg/ml); ampicilina (10 mg/ml) y cloramfenicol (1mg/ml). Las tenias se lavaron hasta quedar libres de residuos de excremento. Los lavados se efectuaron dentro del vaso de precipitados, agitando varias veces, procurando no dañar los proglótidos. Después del último lavado, los

especímenes se mantuvieron en 50-100 ml de PBS.

II.2. Identificación de especie:

La identificación de especie se llevó a cabo determinando el número de ramas uterinas en proglótidos grávidos (Beck y Davis, 1976), de acuerdo al siguiente procedimiento:

Varios proglótidos grávidos fueron colocados entre dos portaobjetos y fijados en solución de Bouin (ácido picrico a saturación, formol y ácido acético) durante 24 a 48 hr a temperatura ambiente. Los proglótidos fueron deshidratados en etanol al 70% hasta que desaparecía el color amarillo del Bouin (24-72 hr), antes de continuar su deshidratación con alcohol al 96% por 10 min. Los proglótidos fueron teñidos con Paracarmin de Mayer durante 8 a 10 min, lavando el exceso de colorante con etanol al 96%, durante 5 min. Posteriormente, fueron transferidos a etanol acidulado con ácido clorhídrico al 2%, hasta que los bordes de los proglótidos se observaron pálidos (10 a 15 min). El exceso de ácido clorhídrico fue lavado con etanol absoluto durante 20 ó 25 min. Los proglótidos se aclararon con creosota-xilol (unos minutos) y se obtuvieron preparaciones permanentes, montando los especímenes en bálsamo de Canadá. Las preparaciones se observaron al microscopio de luz para contar el número de ramas uterinas en cada proglótido. Todos los proglótidos revisados poseían más de 16 ramas uterinas.

II.3. Obtención de los huevecillos:

Se utilizaron únicamente aquellos proglótidos que de acuerdo a su forma y tamaño (los más angostos y alargados), se consideraron como grávidos, aprovechándose aproximadamente 2/3 de ambos estróbilos. Una vez separados los proglótidos grávidos, fueron macerados con tijeras y pinzas quirúrgicas, manteniéndolos en 50-100 ml de PBS. El macerado fué agitado en la solución de PBS y posteriormente, se dejó sedimentar, decantándose el sobrenadante que contenía a los huevecillos. El macerado fué resuspendido varias veces más en 25 ml de PBS, repitiéndose el procedimiento de agitación-decantación, hasta que con ayuda del microscopio, no se observaron huevecillos en el sobrenadante. Finalmente, todos los sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados a 3,500 rpm, durante 5 min, para sedimentar a los huevecillos. La pastilla de huevecillos fué resuspendida en un pequeño volumen de PBS y almacenada a -20°C, hasta su uso.

II.4. Aislamiento de los bloques embriofóricos (Fig. 5):

Los bloques embriofóricos fueron aislados siguiendo la técnica descrita por Morseth (1965), con algunas modificaciones. La suspensión de huevecillos fué contada al microscopio óptico usando un hemocitómetro de

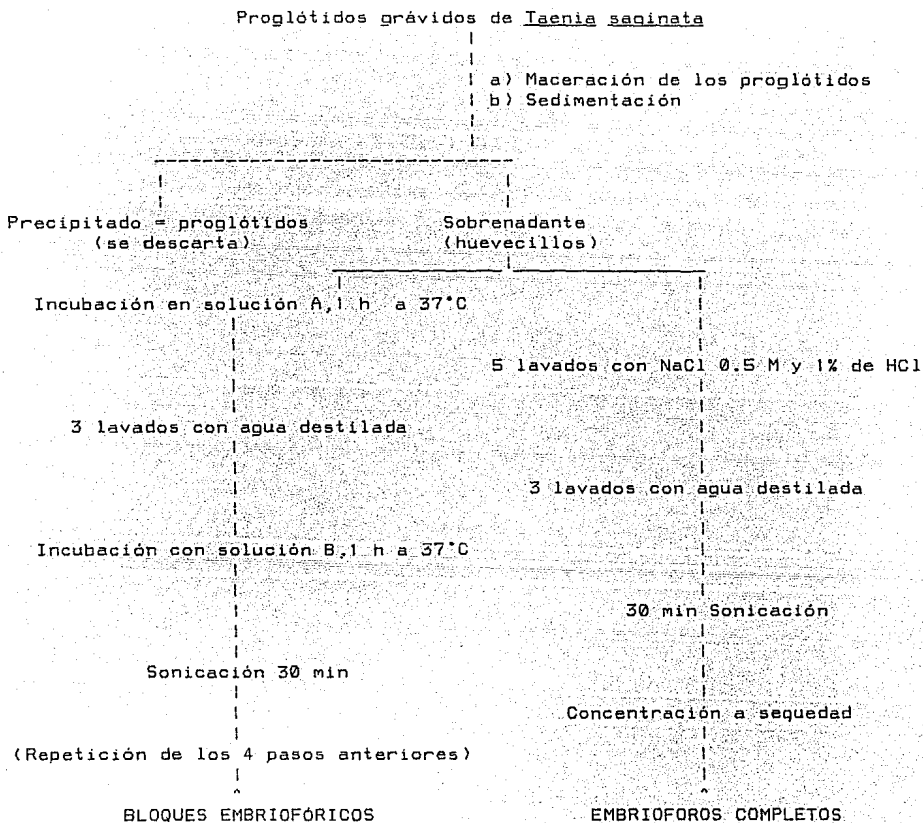


Figura 5. Metodología utilizada en el aislamiento de bloques embriofóricos y de embrioforos de huevecillos de Taenia saginata. Solución A = pepsina 1%; NaCl 0.85% y HCl 1%. Solución B = pancreatina 1%; bicarbonato de sodio 1%; bilis de buey 2% y tripsina = 0.04%.

Newbauer, sumando los números determinados en los cuadros de los cuatro extremos de la cámara (60 cuadros). El número total se dividió entre 4 y se multiplicó por 10,000, para obtener el número de huevecillos por ml (la capacidad de la cámara es de 10 ul). Finalmente se multiplicó por la dilución de la muestra utilizada para el conteo, y por el volumen final total de la suspensión. El número de huevecillos obtenidos de cada ejemplar de T. saginata fué de aproximadamente cuatro millones y se guardaron como lotes individuales. Cada lote de huevecillos se lavó 5-10 veces en agua destilada, por centrifugación a 3,500 rpm, durante 3 min a temperatura ambiente, cada vez. Posteriormente, los lotes se lavaron dos veces más, centrifugando a 500 rpm, constatándose en el microscopio que los huevecillos estaban libres de restos de tejido.

Para la liberación de los bloques embriofóricos, los huevecillos aislados fueron incubados con 2 ml de la solución "A" que contiene NaCl al 0.85%; HCl al 1% y pepsina al 1%, pH 1.17, durante 1 h a 37°C. La solución "A" fué eliminada mediante tres lavados con 10ml de agua destilada, centrifugando la suspensión a 3,500 rpm, durante 5 min cada vez. Los huevecillos fueron entonces incubados en 2 ml de solución "B": Na₂CO₃ al 1%; pancreatina al 1%; bilis de buey al 2% y tripsina al 0.04%, pH 8.24, durante 1 h a 37°C y lavados tres veces por centrifugación en agua destilada. La suspensión de bloques embriofóricos que contenía embriones y algunos huevecillos no digeridos fué sonicada a máxima potencia con un sonicador de vástago (Soniprep, modelo 150), durante 30 min. El material sonicado fué centrifugado en agua destilada a 3,500 rpm, 15 min,

eliminándose el sobrenadante por decantación (el precipitado contenía los bloques embriofóricos).

Con el fin de eliminar totalmente el material cementante, se repitieron las incubaciones con las soluciones "A" y "B". Después de lavar tres veces como se describió anteriormente, los bloques embriofóricos fueron secados en un concentrador Savant y almacenados a -20°C hasta su uso.

II.5. Obtención de los embrioforos (Fig. 5):

Se obtuvieron embrioforos enteros (bloques embriofóricos + material cementante), a partir de un millón de huevecillos, sometiéndolos a un tratamiento con ácido clorhídrico al 1% en NaCl al 0.85%, pH 1.17, para romperlos, sin digerir el material cementante. Los huevecillos fueron lavados cinco veces con esta solución, centrifugándose a 3,500 rpm, 15 min cada vez. La ruptura de los huevecillos fué constatada al microscopio de luz. El exceso de HCl, fué eliminado mediante 10 lavados en agua destilada y centrifugación a 3,500 rpm por 5 min, cada vez. Después del último lavado, la muestra fué resuspendida en 10 ml de agua destilada y sonicada como se describió anteriormente, durante 30 min para destruir restos de tejido u oncosferas resistentes al ácido clorhídrico. El material sonicado fué centrifugado a 3,500 rpm, 5 min, desechándose el sobrenadante. El precipitado que contenía fragmentos de embrioforo fué secado y almacenado a -20°C , hasta su uso.

II.6. Análisis de aminoácidos:

El contenido de aminoácidos de bloques embriofóricos y de embrioforos enteros se realizó siguiendo la técnica de Spackman y cols. (1952), con modificaciones. Muestras de ambos materiales fueron sometidas inicialmente a un tratamiento con ácido trifluoroacético para promover una cierta solubilización de las proteínas de los bloques.

Después de evaporar el ácido, los embrioforos y los bloques embriofóricos, fueron hidrolizados en 150 μ l de HCl 6N, durante 20 hr a 110°C. Las muestras fueron secadas en un concentrador Savant.

Posteriormente, ambas muestras fueron resuspendidas cada una en 200 μ l de la solución amortiguadora de aplicación que contenía citrato de sodio 0.2 N pH 2.2, utilizándose 35 μ l de la muestra de embrioforos y 20 μ l de la muestra de bloques embriofóricos. Ambas muestras fueron procesadas en un analizador de aminoácidos (Durrum, Modelo D-500), utilizándose tres soluciones de citrato de sodio para las corridas: con 0.2 N de (iónico), pH 3.25; con 0.2 N de Na, pH 4.25 y con 1.1 N de Na, pH 7.9. Para determinar el contenido de cisteína de las proteínas, muestras de bloques embriofóricos y de embrioforos enteros fueron incubadas previamente con ácido perbórmico durante toda la noche, tratamiento que produce la oxidación de las cisteínas en ácido cistéico, que resiste la posterior digestión en HCl 6 N.

Debido a la escasez de material, no fué posible determinar e igualar la cantidad de proteínas aplicada al analizador en cada muestra. Por lo tanto, los resultados obtenidos de los cuatro análisis (bloques embriofóricos y embrioforos enteros con y sin ácido perfórmico) fueron igualados entre sí, ajustando las nanomolas de aminoácidos totalmente estables a la hidrólisis con HCl (asp, glu, ala y gli) (Crestfield, et al et al, 1963). El contenido de aminoácidos del material cementante fué determinado calculando la diferencia entre el contenido de los embrioforos y el de los bloques embriofóricos.

Los resultados serán referidos como mol % de cada residuo de aminoácido, obtenidos al dividir las nanomolas correspondientes a cada uno entre la suma de nanomolas totales (de todos los aminoácidos). También se calculó el porcentaje de azufre de la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos, a partir de su contenido de cisteína, ya que como se sabe, el 26.5% de la cisteína es azufre.

II.7. Taxonomía numérica:

Debido a que algunos autores (ver sección I.5) han propuesto que la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos son del tipo queratina, se hizo un análisis de taxonomía numérica para estimar el parecido de estas proteínas con la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos, por lo que se

recopilaron de la literatura los contenidos de aminoácidos de algunas queratinas, sedas, así como de dos proteínas globulares.

La taxonomía numérica se realizó mediante un programa de computadora según el método de promedios (Johnson, 1967), que consiste en agrupar a los elementos de estudio, tomando en cuenta el valor promedio de la diferencia entre ellos y de acuerdo a los valores de sus coeficientes de correlación. Los datos que se procesaron fueron los de los contenidos de aminoácidos de todas las proteínas, incluyendo a la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos.

En la figura 6, se observa el procedimiento seguido por la computadora para la obtención de la matriz de correlación a partir de la cual fue construido un dendograma, el cual incluye el cálculo de la inversa de la tangente hiperbólica, que se llevó a cabo siguiendo el método de Johnston and Beringer, 1979. Cabe mencionar que el uso de los inversos de la tangente hiperbólica, amplifica las diferencias entre los elementos que se comparan.

II.8. Solubilización de las proteínas de los bloques embriofóricos (Fig. 7):

La solubilización de las proteínas de los bloques embriofóricos se efectuó aplicando dos tratamientos químicos diferentes:

TABLA DE DATOS DE CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS

CÁLCULO DE SIMILITUD
(Coeficientes de Correlación)

CÁLCULO DE LA INVERSA DE LA TANGENTE HIPERBÓLICA ($1/\text{Tang } h$)

AGRUPACIÓN POR MÍNIMOS

CONVERSIÓN DE LOS VALORES DE $1/\text{Tang } h$ A COEFICIENTES DE CORRELACIÓN

MATRIZ DE CORRELACIÓN

Figura 5. Metodología seguida por la computadora para la construcción de una matriz de correlación.

BLOQUES EMBRIOFÓRICOS

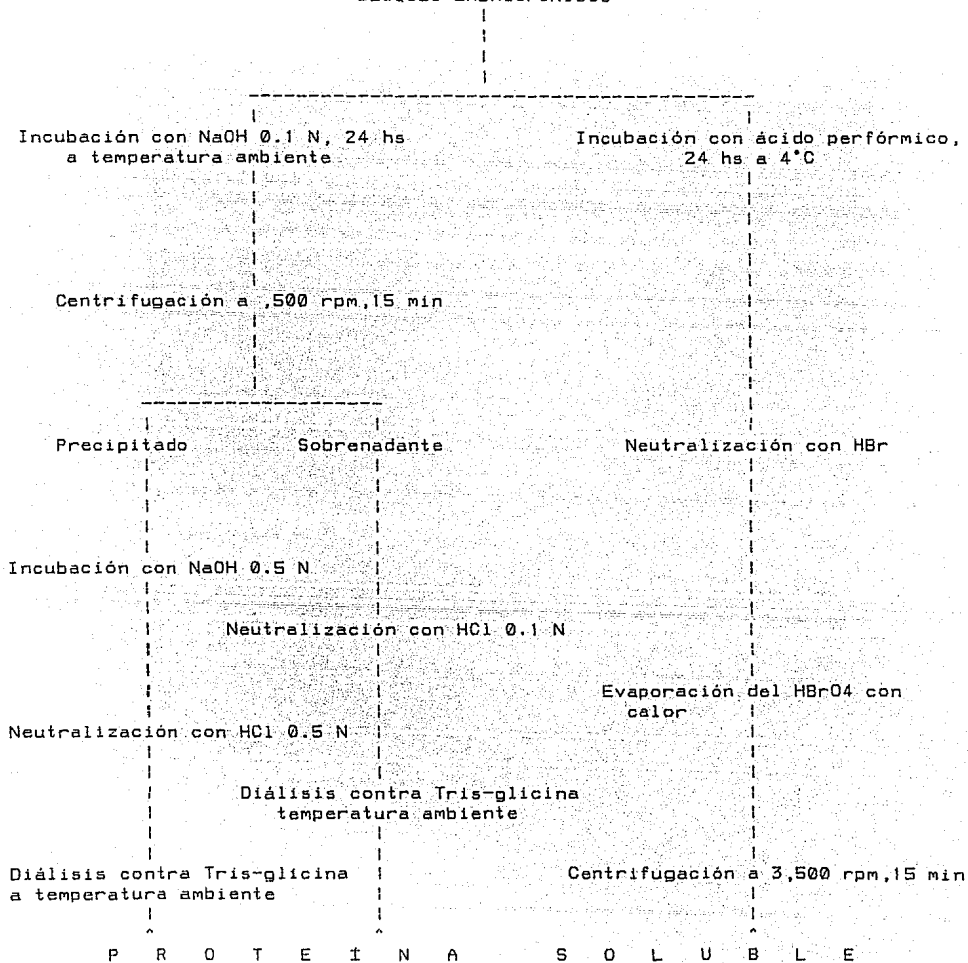


Figura 7. Metodología utilizada en la solubilización de las proteínas de bloques embriofóricos de Iaenia saquinata, con los siguientes tratamientos: ácido per fórmico e hidróxido de sodio 0.1 N y 0.5 N.

1.- Solubilización con Hidróxido de sodio: Los bloques embriofóricos correspondientes a 300,000 huevecillos, fueron incubados en 100 ul de NaOH 0.1 N, durante 24 hr, en agitación continua con vórtex, a temperatura ambiente. Al terminar la incubación la muestra fue centrifugada a 3,500 rpm durante 15 min, colectándose por separado el sobrenadante y el precipitado. Al sobrenadante, que contenía las proteínas solubilizadas se le agregaron 100 ul de HCl 0.1 N para neutralizar la acción del NaOH y se dializó a temperatura ambiente contra PBS para eliminar el NaCl formado de la reacción. Al precipitado, que contenía las proteínas no solubilizadas, se le agregaron 100 ul de NaOH 0.5 N, incubándose durante 24 hr en agitación continua con vórtex. Posteriormente, se le agregaron 100 ul de HCl 0.5 N para neutralizar la acción del NaOH y se dializó contra Tris-glicina a temperatura ambiente para eliminar las sales formadas. El dializado se dividió en dos alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.- Solubilización con ácido per fórmico: Los bloques embriofóricos correspondientes a 300,000 huevecillos fueron incubados en 500 ul de ácido per fórmico preparado previamente (1.8 ml de ácido fórmico por cada 200 ul de peróxido de hidrógeno, mantenido durante 1h a temperatura ambiente antes de ser utilizado) durante 24 hr, en agitación continua con vórtex, a 4°C. Después de la incubación se neutralizó el ácido per fórmico con 70 ul de HBr. Tanto la muestra como el HBr, fueron enfriados previamente en hielo seco con acetona

para evitar desnaturalización de las proteínas. La neutralización se llevó a cabo manteniendo una agitación energética con vórtex para después secar el material solubilizado en un concentrador Savant. Finalmente, se dializó el exceso de sales contra Tris-glicina a temperatura ambiente. La muestra se dividió en dos alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

II.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE):

La SDS-PAGE de la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos, solubilizadas por los dos procedimientos, se realizó en geles de placa, siguiendo la técnica de Laemmli (1970). El gel separador se preparó a una concentración de acrilamida al 10%, mientras que el concentrador se preparó al 5%.

Mezcla para la preparación del gel separador:

Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0.8%.....	11.00 ml
Tris-Base 2M, pH 8.8.....	6.00 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.....	0.30 ml
Persulfato de amonio a 10 mg/ml.....	0.50 ml
Agua destilada.....	11.25 ml

Los reactivos fueron agregados agitando continuamente. La polimerización fué iniciada al agregar 30 ul de N'N'N'N'tetrametilendiamina (TEMED) y se vació la mezcla en una placa para cámara de electroforesis (BIO-RAD) previamente armada, prosiguiendo la polimerización durante 30 min.

Mezcla para la preparación del gel concentrador:

Acrilamida al 30%, Bisacrilamida al 0.8%.....	3.50 ml
Tris - HCl 2M, pH 6.8.....	0.65 ml
SDS al 10%.....	0.10 ml
Persulfato de amonio a 10 mg/ml.....	0.20 ml

Los reactivos fueron agregados agitando continuamente. La polimerización fué iniciada al agregar 10 ul de TEMED y se vació la mezcla en la placa de la cámara de electroforesis, sobre el gel separador, dejándose polimerizar durante 30 min.

Los dos compartimientos de la cámara de electroforesis fueron llenados con una solución de:

Tris-glicina, pH= 8.6.....	300 ml
SDS al 10%.....	12 ml

aforado a 1.5 l con agua destilada.

A su vez, la solución de Tris-glicina contenía 12g de Tris-hidroximetil-aminometano + 57.6 g de glicina, por cada litro de agua destilada.

Antes de realizar la electroforesis, una alícuota de cada muestra (proteínas solubilizadas de los bloques embriofóricos) se sometió a un proceso desnaturizante en condiciones reductoras, incubándolas en la mezcla siguiente:

SDS.....	100.0 mg
EDTA (ácido etilendiaminotetracético).....	7.4 mg
Mercaptoetanol.....	0.1 ml
Glicerol.....	1.0 ml
Azul de bromofenol.....	trazas
aforado a 10 ml con Tris-HCl 0.05M, pH 6.8 .	

A 100 ul de cada una de las muestras tratadas con NaOH 0.1 N, 0.5N ó ácido per fórmico se le agregaron 50 ul de la mezcla desnaturizante y se incubaron en baño maria a ebullición durante 5 min. Como patrones de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas conocidas (BIO-RAD), que contiene:

Proteína	Peso Molecular
Fosforilasa B.....	92,500
Albúmina sérica bovina.....	66,200
Ovalbúmina.....	45,000
Anhidrasa carbónica.....	31,000
Inhibidor de tripsina.....	21,500
Lisozima.....	14,000

Tanto las muestras desnaturalizadas como las no reducidas fueron aplicadas a los geles, corriéndose la electroforesis con una corriente de 20-40 mA aproximadamente durante de 3 hr. tiempo en que el azul de bromofenol alcanzó el borde inferior del gel. Al terminar la electroforesis, las bandas protéicas fueron reveladas tñiendo los geles siguiendo la técnica del Nitrato de Plata. Esta técnica permite detectar cantidades de proteína en el orden de los ng.

II.10. Tinción de las bandas protéicas resueltas en los geles:

La técnica utilizada para la tinción de la(s) proteína(s) de los bloques embrifóricos fué la de Oakley y cols. (1980). Debido a la alta

sensibilidad que alcanza esta técnica, los geles de poliacrilamida fueron manejados con guantes desde el momento de sacarlos de la cámara de electroforesis. Los geles fueron colocados en un recipiente de vidrio sobre un agitador rotatorio manteniendo agitación continua. Cada uno de los reactivos fué filtrado inmediatamente antes de usarse.

Inicialmente, las proteínas en los geles fueron precipitadas sumergiéndolo en una solución de 25% de isopropanol en 10% de ácido acético, durante 10 min. El exceso de SDS se eliminó lavando los geles en una solución de isopropanol al 25%, por 10 min. La fijación de las proteínas se realizó sumergiéndolo durante 1 hr en una solución amortiguada con 10% de glutaraldehído (40 ml de glutaraldehído al 25%, 57 ml de Na_2HPO_4 0.2 M, 3 ml de NaH_2PO_4 0.2 M y 36 ml de agua destilada). El exceso de glutaraldehído se eliminó enjuagando exhaustivamente los geles con agua destilada.

Primeramente se hicieron 4 cambios cada 15 min y posteriormente los geles se dejaron en 400 ml de agua destilada durante toda la noche. La tinción de las proteínas se realizó con una solución argéntica amoniacal recién preparada que contenía 1.4 ml de NH_4OH , 21 ml de NaOH al 0.36% y 4 ml de AgNO_3 al 19.4%, aforada a 100 ml con agua destilada. La tinción se realizó sumergiéndolo durante 15 min. El exceso de colorante se eliminó lavando los geles exhaustivamente con agua destilada. Las proteínas fueron reveladas con una solución recién preparada de ácido cítrico al 0.005% y formaldehído al 0.019% en agua destilada, durante 10-15 min. El revelado se detuvo lavando los geles varias veces con agua destilada.

II.11. Microscopía electrónica:

Una muestra de bloques embriofóricos fué incluida en Epón 820 sin fijación ni postfijación previa. Una vez incluidos, se obtuvieron cortes semifinos y finos en un ultramicrotomo LKB modelo 8800. Los cortes se colocaron en rejillas de cobre con malla del 400, y fueron observados en un Microscopio electrónico de transmisión (ME), JEOL, modelo JEM 100B.

II.12. Análisis elemental de rayos X:

Una muestra pequeña de bloques embriofóricos fué depositada en rejillas de níquel (para microscopía electrónica de transmisión), sobre cinta conductiva adherida al porta-especimen, y recubierta con carbono en una evaporadora JEOL, modelo JSS 1100. El análisis elemental se llevó a cabo enfocando los bloques en un microscopio electrónico de barrido, JEOL, modelo JSM 35C, con dispositivo KEVEX para análisis de rayos-X.

II.13. Espectroscopia de infrarrojo:

Se determinó el espectro de absorción en infrarrojo de los bloques embriofóricos y de otras proteínas (albúmina sérica bovina, hemoglobina humana, queratina de uñas y lana de merino). Muestras de cada una de las proteínas fueron aplicadas sobre una de las superficies de pastillas de bromuro de potasio y se analizaron por separado en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 599 B. Los bloques embriofóricos y la lana de merino fueron analizados en un espectrofotómetro Nicolet, de mayor resolución. Ambas muestras fueron colocadas en celdillas de metal para su análisis. Una vez graficados los espectros, se localizaron los picos de mayor absorción y se identificaron los enlaces correspondientes, para comparar los espectros de las cinco proteínas.

II.13. Ensayos inmunoenzimáticos en papel de nitrocelulosa:

Se realizaron ensayos inmunoenzimáticos sobre papel de nitrocelulosa siguiendo las técnicas de inmunopunto descritas por Hawkes y cols, 1982; Herbrink, 1982 y Stenberg y cols, 1983. Se utilizaron muestras de bloques embriofóricos y de proteínas solubilizadas por ácido per fórmico, enfrentadas con anticuerpos anti-queratina de estrato córneo de pie humano (Dako Corp.), de acuerdo al siguiente protocolo: Un millón de bloques embriofóricos en

PBS pH 7.4, con 0.3% de tween-20 (polioxietilensorbitanomonolaurato) (PBS-tween) o la(s) proteína(s) solubilizada(s) por ácido per fórmico a partir de un millón de bloques y resuspendidas en PBS-tween, fueron aplicados en volúmenes iguales, sobre 14 pozos con papel de nitrocelulosa en una cámara Bio-Dot (Bio-Rad), dejándose incubar durante 15 min. Después de secar la solución aplicando vacío a la cámara, los bloques embriofóricos o la(s) proteína(s) solubilizada(s), fueron incubados 15 min con albúmina sérica bovina al 1% en PBS-tween, con el fin de reducir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Después de este tiempo, se eliminó la solución amortiguadora de los pozos aplicando vacío a la cámara y se lavaron cinco veces los pozos con volúmenes de 200 μ l de PBS-tween. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de IgG de conejo, anti-queratina humana o de IgG de conejo normal, diluidas 1:100, 1:500 y 1:1,000; dejándose incubar durante 1 hr a temperatura ambiente.

El exceso de anticuerpo fué eliminado mediante cinco lavados con PBS-tween, para después agregar en cada pozo, 100 μ l de IgGs de chivo anti-IgG de conejo acopladas a peroxidasa, diluidas 1:2000 y se dejaron incubar durante 1h a temperatura ambiente. El exceso del segundo anticuerpo fué lavado cinco veces con PBS-tween. La reacción se reveló agregando 400 μ l del sustrato alfa-orto-cloronaftol a una concentración de 0.5 mg/ml (agregando 50 μ l de H₂O₂ por cada 50 ml de ortocloronaftol preparado) en cada pozo dejando incubar durante 2 min, aproximadamente. La reacción enzimática fué detenida secando los pozos al aplicar vacío a la cámara. Como controles negativos algunos pozos que no contenían bloques embriofóricos fueron tratados idénticamente.

La actividad de los anticuerpos anti-queratina humana fue previamente constatada mediante los ensayos descritos a continuación.

II.14. Inmunoperoxidasa indirecta en cortes de cojinete plantar de ratón:

La actividad de los anticuerpos anti-queratina humana (Dako Corp.) fue probada por ensayos de inmunoperoxidasa indirecta en cortes de cojinete plantar de ratón, siguiendo la técnica de Ludwig, (1978). Cortes de 6 μ m de espesor fueron obtenidos de cojinete plantar de ratón previamente incluido en parafina. Los cortes fueron desparafinados con calor, a 60°C, durante 30 min y con dos cambios de xilol de 10 min más uno de 5 min con etanol absoluto. La peroxidasa endógena fue inactivada incubando los cortes con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, durante 30 min. Los cortes fueron hidratados y lavados en 0.05 M de Tris-hidroximetil-aminometano pH 7.2, con 0.85% de NaCl (Tris-NaCl).

Inicialmente, los cortes fueron incubados con suero normal de chivo, diluido 1:20, durante 30 min, para reducir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Después de lavar los cortes cinco veces con Tris-NaCl, se incubaron con el primer anticuerpo: IgG de conejo anti-queratina humana o con IgG de conejo normal diluidos 1:50 a 1:800 (4 diluciones) en el mismo amortiguador, durante 30 min. Los cortes fueron lavados cinco veces con Tris-NaCl para eliminar el exceso del primer anticuerpo, e incubados con IgG de chivo anti-IgG de conejo diluida 1:5, durante 30 min. Después de un nuevo ciclo de lavado, los cortes se incubaron con el complejo PAP:

peroxidasa-antiperoxidasa preparada en conejo (Dako Corp.), diluido 1:5 en Tris-NaCl; durante 30 min. Se eliminó el exceso de complejos lavando los cortes con 0.05 M de Tris, pH 7.4 sin NaCl. La reacción se reveló incubando los cortes con 3'3'-dianinobencidina (DAB) (agregando 6 ul de H2O2 por cada ml de DAB, a una concentración de 250 ug/ml) en PBS durante 15 min. La reacción se detuvo lavando los cortes con agua destilada fría. Los cortes fueron contrastados con hematoxilina y montados en bálsamo de Canadá fueron observados y fotografiados en un microscopio óptico.

III. RESULTADOS

La identificación de los estróbilos obtenidos se llevó a cabo contando el número de ramas uterinas en los proglótidos grávidos. Puesto que ninguno de los proglótidos revisados presentó menos de 16 ramas uterinas, se concluyó que se trataba de especímenes de T. saginata.

Los huevecillos fueron extraídos por maceración de los proglótidos grávidos (Fig. 8A). Como se muestra en la figura 8B, la fracción de huevecillos extraídos presentaba algunos restos del tejido de los proglótidos. En cambio, las fracciones obtenidas de bloques embriofóricos y de embrioforos aparecían libres de restos celulares (Fig. 9).

Los resultados del análisis de aminoácidos de los bloques embriofóricos (Tabla I), mostraron que la(s) proteína(s) que los constituye(n) presenta(n) un contenido considerablemente alto en residuos de cisteína (10.5%). Otros aminoácidos que resultaron abundantemente representados fueron: glicina (18.9%), ácido glutámico (17.7%) y serina (11.2%). El contenido de aminoácidos del material cementante mostró altos porcentajes en residuos que confieren susceptibilidad a proteasas gástricas e intestinales: arginina (14.2%), lisina (9.4%), fenilalanina (12.5%) y tirosina (4.0%) (Tabla I). El contenido de azufre de los bloques embriofóricos, calculado a partir de su contenido de cisteína, resultó ser del 2.7%.

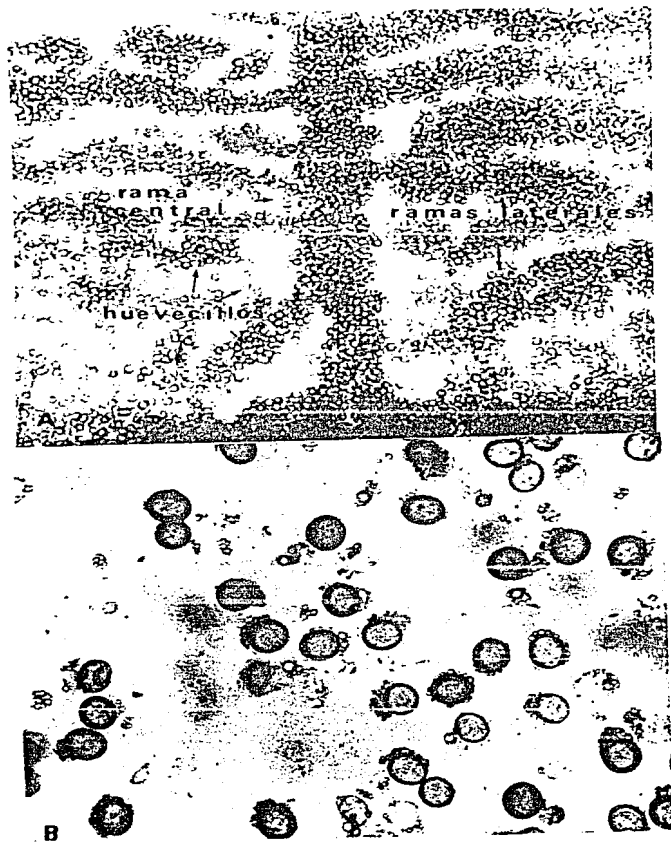


Figura 8. A, Sección de un proglótido grávido de *T. saginata*. B, huevecillos extraídos de los proglótidos.

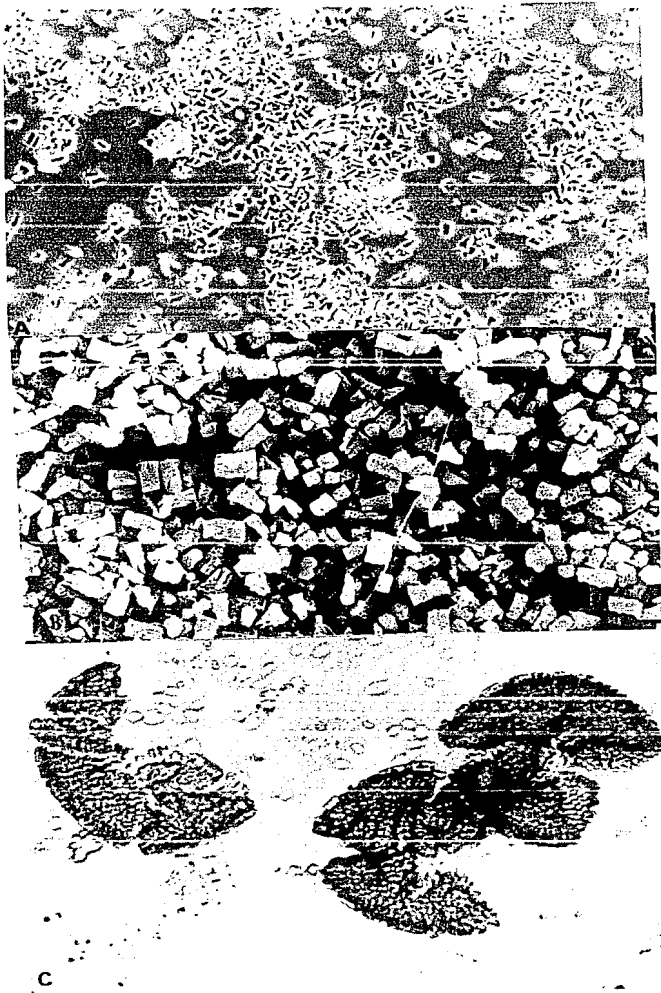


Figura 9. A y B. Fotografías de bloques embriofóricos de huevecillos de Taenia saginata. (A, al microscopio de luz ; B, al microscopio electrónico de barrido)
C. fotografía de embrioforos de Taenia saginata, vistos al microscopio de luz.

Tabla I. Contenido de aminoácidos del embrioforo de huevecillos de Taenia saginata.

	EMBRIOFORO	BLOQUES EMBRIOFÓRICOS	MATERIAL CEMENTANTE*
aa	mol%	mol%	mol%
asp	4.3	3.5	5.9
tre	3.5	2.3	8.7
ser	9.5	11.2	0.0
glu	17.4	17.7	0.0
pro	7.8	7.3	3.3
gli	11.9	18.9	0.0
ala	8.0	7.5	3.0
val	5.0	4.0	5.3
met	2.0	1.4	4.1
ile	2.1	0.9	9.3
leu	5.0	3.2	13.7
tir	3.8	3.2	4.0@
fen	2.3	0.6	12.5@
his	2.0	1.2	6.3
lis	8.0	6.7	9.4&
arg	2.0	0.0	14.2&
cis [^]	6.0	10.5	0.0
trp	N.D.	N.D.	N.D.

* Este análisis se obtuvo por diferencia entre los contenidos de aminoácidos de embrioforos y de bloques embriofóricos .

@ = sitios sensibles a pepsina = 16.5%

& = sitios sensibles a tripsina = 23.6%

^ = determinado como ácido cistéico.

Algunos autores han propuesto que los bloques embriofóricos están constituidos por una proteína semejante a las queratinas (ver sección I.5). Se realizó una comparación entre el contenido de aminoácidos de los bloques embriofóricos obtenidos en este trabajo y el de varias queratinas, sedas y proteínas globulares, obtenidos de la literatura (Tabla II). Para ello, se emplearon métodos de taxonomía numérica (análisis matricial de promedios: Johnson, 1967). Los valores de la matriz de correlación (Tabla III), permitieron establecer el dendograma mostrado en la figura 10, que distribuye a las proteínas comparadas en tres grupos. El grupo A que incluye a las sedas, presenta el mayor grado de identidad (98%) entre todas las proteínas estudiadas. El grupo C, constituido por queratinas de mamíferos (lana, pelo y cuerno) presentó de 97% a 95% de identidad. El grupo B, constituido por proteínas con una menor identidad (77%), incluye a la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos y a las queratinas de pluma. Las proteínas globulares y una lana de mamífero (Lehninger, 1975) presentaron un grado de correlación del 51% o menor.

Los estudios de SDS-PAGE en condiciones reductoras (en presencia de 2-mercaptoetanol) del material solubilizado a partir de bloques embriofóricos, mostraron resultados casi totalmente coincidentes entre sí (Fig. 11). Tanto la solubilización con ácido per fórmico como con hidróxido de sodio, presentaron dos bandas principales con pesos moleculares aparentes de 66,000 y 65,000; además de varias bandas menos prominentes y de menor peso molecular. El mismo patrón de bandeo se obtuvo cuando la electroforesis se corrió en condiciones no reductoras (datos no mostrados).

Tabla II. Comparación de los contenidos de aminoácido de la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos, y de algunas queratinas, sedas y proteínas globulares.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	PBE	SEDA	LANA	PLUMA	SEDA	LANA	LANA	PELO	CUERNO	HH	IgGH
asp	5.6	3.4	6.1	6.2	1.3	7.3	6.3	5.4	7.0	8.5	7.9
tre	3.6	1.0	6.6	4.4	0.9	0.0	6.1	7.2	5.5	6.3	8.4
ser	15.2	8.3	9.3	14.8	12.2	2.9	7.7	8.4	6.1	7.8	14.9
glu	16.3	1.9	11.6	7.3	1.0	15.0	13.4	13.0	12.5	3.5	11.6
pro	9.9	3.4	6.8	9.7	0.4	4.4	6.3	6.5	7.4	4.9	4.6
gli	18.4	35.4	9.1	10.7	44.5	0.6	5.4	3.9	8.7	4.9	6.0
ala	9.0	21.8	5.2	6.8	29.3	4.4	3.6	2.6	2.2	14.8	6.0
val	3.3	4.4	5.4	8.3	2.2	2.8	5.0	4.8	4.9	9.2	7.0
met	1.1	0.0	0.5	0.3	0.0	0.7	0.5	0.7	1.0	1.4	1.4
ile	1.8	0.5	3.4	5.1	0.6	11.5	3.5	4.4	4.1	0.0	2.8
leu	3.7	1.0	7.0	6.8	0.5	11.5	7.2	6.9	7.2	12.7	7.0
tir	2.2	11.2	3.3	1.3	5.1	4.8	4.8	2.4	4.2	2.1	4.2
fen	1.6	1.9	2.6	3.6	0.6	0.0	3.4	2.8	3.2	4.9	3.7
his	1.9	1.0	2.3	0.6	0.2	0.7	0.8	0.8	0.7	7.0	0.9
lis	5.3	2.4	0.7	1.3	0.3	2.8	2.8	2.3	2.7	7.8	7.0
arg	0.9	1.5	6.7	4.8	0.5	10.2	9.1	9.2	7.0	2.1	2.3
trp	0.0	0.0	1.2	0.3	0.3	1.8	1.8	0.7	0.9	0.7	1.4
cis	10.5	0.0	12.5	7.6	0.0	13.1	11.4	16.2	11.8	0.7	2.3

PBE= proteína(s) de bloques embriofóricos de huevecillos de Laeina saquinata. Tomadas de Lehninger, 1975 (2 y 6); Fasman, 1969 (7 y 8); Harrow, 1947 (5); Haurowitz, 1950 (2,3 y 4); Corfield y Fletcher, 1969 (11) y Cunningham, et al, 1983 (10).

Tabla III. Matriz de correlación de los contenidos de aminoácido de la(s) proteína(s) de bloques embriofóricos de huevecillos de L. saquinata, de queratinas, sedas y proteínas globulares.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 *****	0.57	0.76	0.77	0.60	0.19	0.57	0.49	0.67	0.16	0.63	
2	*****	0.22	0.40	0.98	0.27	0.05	0.18	0.10	0.29	0.19	
3		*****	0.77	0.25	0.56	0.91	0.89	0.93	0.05	0.51	
4 0.77		0.47	*****	0.44	0.22	0.57	0.54	0.62	0.30	0.67	
5 0.34	0.98			*****	0.25	0.04	0.15	0.09	0.31	0.20	
6					*****	0.73	0.72	0.67	0.15	0.11	
7					0.51	*****	0.95	0.94	0.07	0.49	
8						0.95	*****	0.90	0.15	0.37	
9		0.91				0.92		*****			
10									*****		
11			0.46							0.24	*****

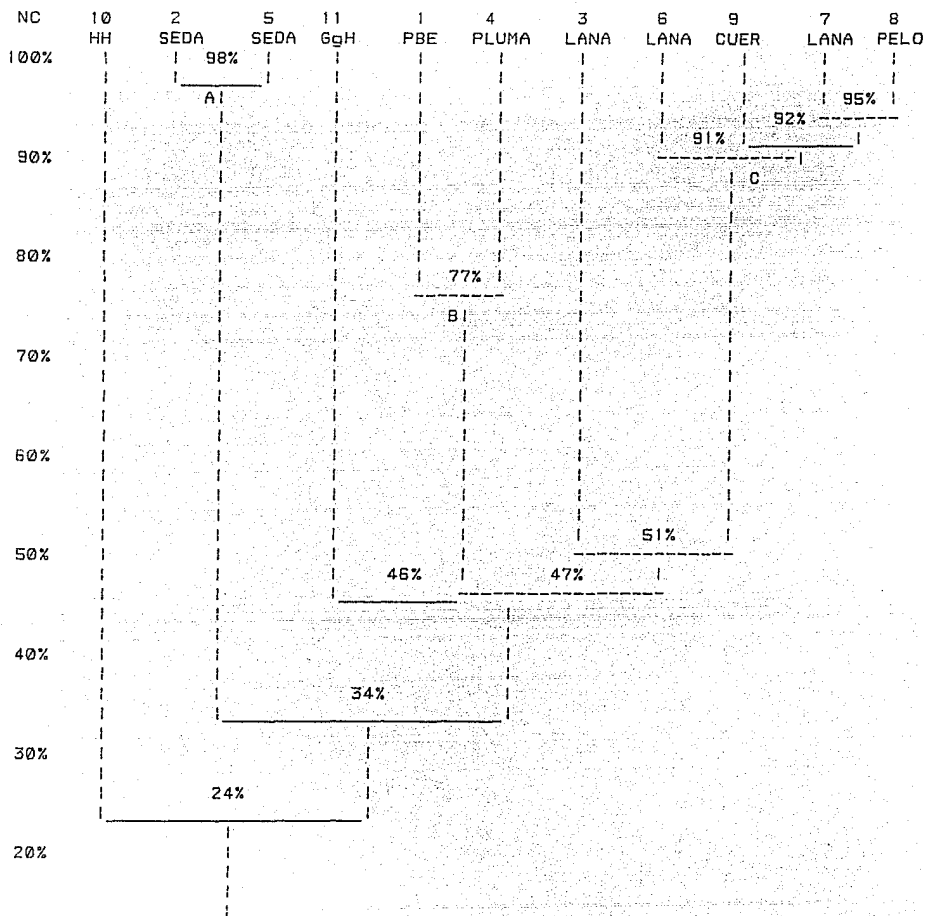


Figura 10. Dendrograma que relaciona las proteínas de los bloques embriofóricos de *I. saqiata* con queratinas y sedas.

A, B y C= grupos de proteínas.

PBE= Proteínas de los bloques embriofóricos.

NC = Niveles de correlación.

Tomadas de Lehninger, 1975 (2 y 6); Fasman, 1969 (7 y 8); Harrow, 1947 (5); Haurowitz, 1950 (2,3 y 4); Corfield y Fletcher, 1969 (11) y Cunningham, et al,

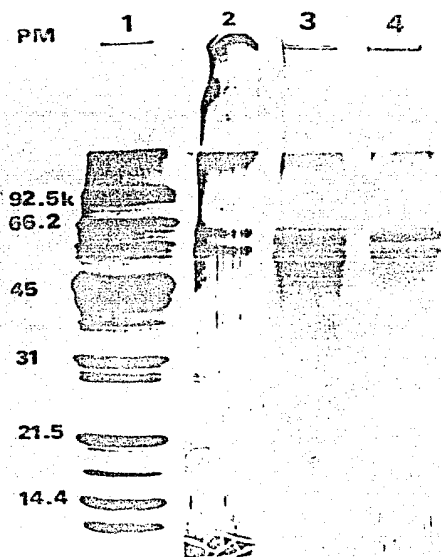


Figura 11. Gels de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Carriles: 2-4, proteína(s) de los bloques embriofóricos en condiciones reductoras con los siguientes tratamientos: 2, hidróxido de sodio 0.1 N; 3, hidróxido de sodio 0.5 N y 4, ácido peracético. 1, patrones de pesos moleculares.

Las imágenes de cortes no teñidos, de los bloques embriofóricos, obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión, muestran una alta densidad electrónica intrínseca a los bloques (Fig. 12). Lo anterior llevó a pensar que la(s) proteína(s) de los bloques podría(n) presentar algún tipo de "impregnación", que explicara su gran densidad electrónica. Para responder esta pregunta, los bloques embriofóricos fueron sometidos a un análisis elemental de rayos-X. Los resultados demuestran la presencia de trazas de silicio (Si) (Fig. 13). Asimismo, esta metodología permite detectar el azufre contenido en los residuos de cisteína tan abundantes en la(s) proteína(s) de los bloques (ver arriba).

Se realizó una comparación entre los espectros de infrarrojo de los bloques embriofóricos y los de otras proteínas de vertebrados (gammaglobulina bovina, hemoglobina humana, queratina de lana y queratina de uñas). Como se observa en la figura 14, los espectros de todas las proteínas son parecidos entre sí. Sin embargo, cuando se comparan los cocientes de absorbancia de los grupos O-H/S-H, C=O/S-H y N-H/S-H para cada proteína (Tabla IV), los valores correspondientes a las queratinas (lana de merino y uña humana) y a los bloques embriofóricos son similares entre sí (1.2-2.2), y claramente diferentes de los correspondientes a las dos proteínas globulares (2.6-6.2).

Con el fin de evaluar si las proteínas de los bloques embriofóricos tienen alguna relación inmunológica con las queratinas, se utilizaron



Figura 12. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de bloques embriofóricos de huevecillos de I. saginata.

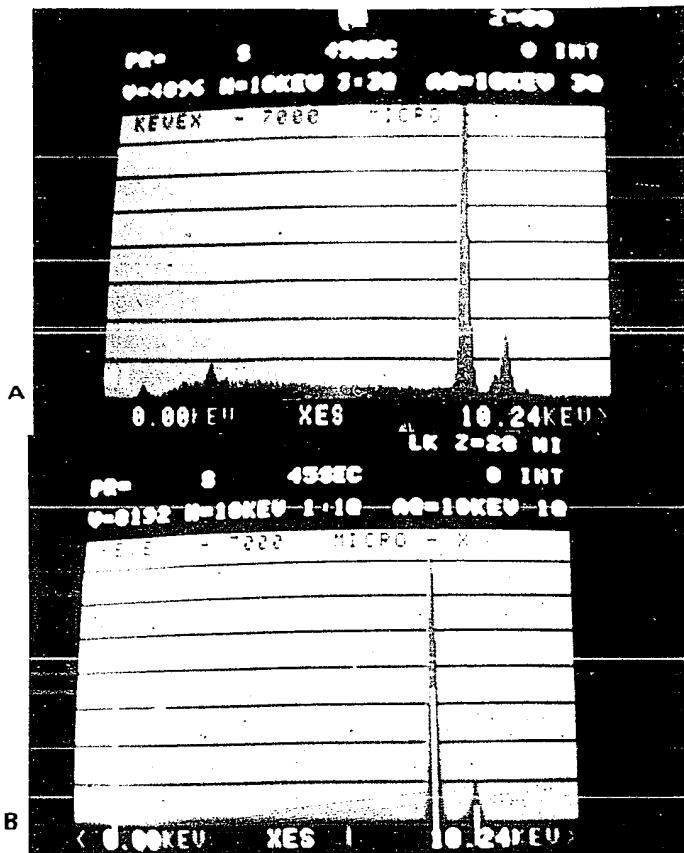


Figura 13. A, Espectros de absorción del silicio (Si) y del azufre (S), localizados en una muestra de bloques embriofóricos. B, Control (rejilla de níquel sobre un porta-especimen).

Ni= níquel

KEV= Kilo Electrón Volts.

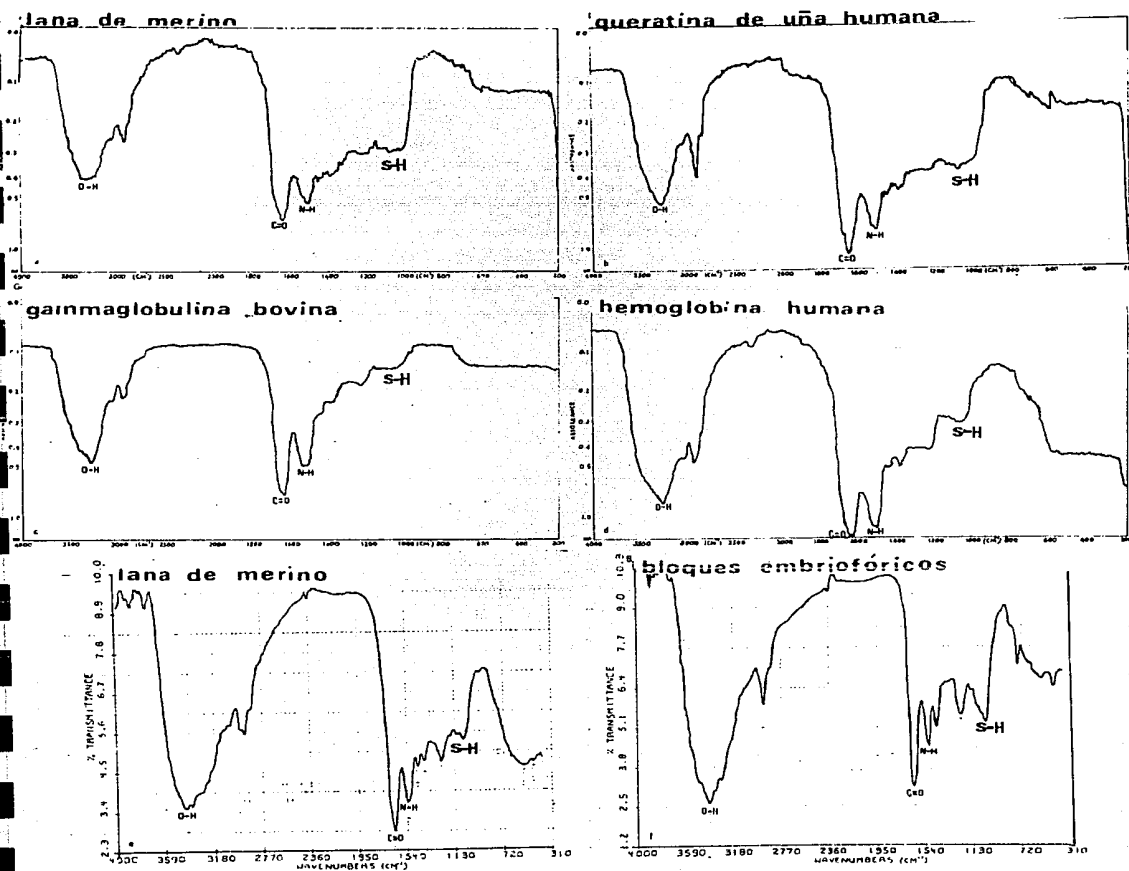


Figura 14. Representación gráfica de los espectros de infrarrojo de diferentes proteínas: a-d, realizados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599-B; e-f, realizados en un espectrofotómetro Nicolet. Se señalan los enlaces localizados y la absorción de las longitudes de onda correspondientes.

Tabla IV. Comparación de los cocientes de absorción en infrarrojo de los bloques embriofóricos de huevecillos de Taenia saginata y de varias proteínas de vertebrados.

ENLACES	B.E.	Q.L.	Q.U.	Q.L.	Igs.H.	Hb.H.
OH/SH	2.0	1.6	1.4	1.4	3.4	2.5
CO/SH	1.6	1.9	3.7	1.9	5.1	6.3
NH/SH	1.2	1.4	2.1	1.9	3.6	5.0

Abreviaturas: B.E., bloques embriofóricos; Q.L., queratinas de lana de merino; Q.U., queratinas de uña humana; Igs.H., gammaglobulinas humanas; Hb.H., hemoglobina humana.

Tabla V. Comparación del contenido de azufre de bloques embriofóricos de huevecillos de Taenia saginata con los contenidos de azufre de bloques embriofóricos de otros ténidos.

CESTODOS	% AZUFRE
<i>T. saginata</i>	2.68
<i>T. hydatigena</i> *	2.0
<i>T. ovis</i> *	3.0
<i>T. pisiformis</i> *	2.1

* Morseth, 1965.

anticuerpos anti-queratina en ensayos enzimáticos de inmunopunto. La actividad y especificidad de los anticuerpos anti-queratina humana se comprobó mediante un ensayo de inmunoperoxidasa en cortes de cojinete plantar de ratón. Como se observa en la figura 15, los anticuerpos anti-queratina humana presentaron reacción cruzada con la queratina de ratón. En cambio, los resultados de los ensayos de inmunopunto con los bloques embriofóricos no mostraron reacción específica alguna cuando se les hizo reaccionar con los anticuerpos (Fig. 16). Este mismo resultado se obtuvo en los experimentos en los que se enfrentó el material solubilizado por ácido per fórmico con los anticuerpos (Fig. 16). Cabe hacer notar que se obtuvo un gran pegado inespecífico de los anticuerpos a los bloques embriofóricos y al material solubilizado a pesar del bloqueo previo con albúmina sérica bovina.



Figura 15. Ensayo enzimático de inmunoperoxidasa indirecta, mostrando reacción cruzada de anticuerpos anti-queratina humana y cojinete plantar de ratón.

E= estrato córneo (queratina).

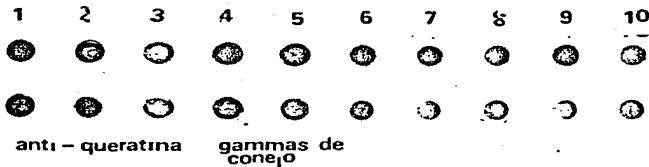


Figura 16. Ensayo enzimático de inmunopunto (pozos por duplicado), de izquierda a derecha: los pozos 1-7 contenían bloques embriofóricos mientras que 8-10 no tenían. Los anticuerpos aplicados a los pozos fueron: 1, 2 y 3, IgG de conejo anti-queratina humana: 130 ug, 26 ug y 13 ug; 4, 5 y 6, gammaglobulina normal de conejo: 130 ug, 26 ug y 13 ug; 7, PBS-tween; 8, anticuerpos anti-queratina humana: 130 ug (pozo superior) y 26 ug (pozo inferior); 9: gammaglobulina normal de conejo: 130 ug (pozo superior) y 26 ug (pozo inferior); 10: PBS-tween. Todos los pozos fueron incubados con IgG de chivo anti-IgG de conejo * peroxidasa. Como sustrato se utilizó alfa-cloronaftol.

IV. DISCUSION

La diferenciación entre especímenes de T.saginata y T.solium es sencilla cuando se recupera el escólex, ya que la primera carece de los ganchos rostellares característicos de la tenia solitaria. Puesto que no se obtuvieron los escólices de los especímenes utilizados en este trabajo, la identificación de especie se realizó contando el número de ramas uterinas laterales en proglótidos grávidos. Sin embargo, puesto que todos los proglótidos revisados presentaron más de 15 ramas uterinas (fuera del rango de sobreposición de ambas especies: 11-13) (Beck y Davies, 1976), se puede asegurar que pertenecían a la especie T.saginata.

El método empleado para el aislamiento de los bloques embriofóricos (Morseth, 1965), imita las condiciones existentes en el tracto digestivo del huésped intermediario de la T.saginata. Los huevecillos fueron sometidos a incubaciones sucesivas con pepsina y tripsina, simulando la secuencia digestiva durante su paso del estómago al intestino delgado. La gran pureza de los bloques embriofóricos obtenidos, resalta su resistencia a la acción de estas proteasas en contraste con la susceptibilidad del material cementante.

Para que el huésped bovino adquiriera la cisticercosis, se requiere la liberación y activación de los embriones durante el paso de los huevecillos por su tubo digestivo. En consecuencia, la disgregación del embrioforo debe

ocurrir dentro de límites temporales bien definidos, por lo que, sería razonable esperar que su notable susceptibilidad a las proteasas digestivas tenga un claro sustrato molecular. El análisis de aminoácidos del material cementante aportó un resultado interesante. El 40% del contenido total lo constituyen residuos que confieren sensibilidad a proteasas digestivas: tir: 4.0% y fen: 12.5% (pepsina), lis: 9.4% y arg: 14.2% (tripsina). Este dato explica por qué el embrioforo se disgrega rápidamente cuando el huevecillo está en el tracto digestivo del huésped intermediario.

Con respecto al análisis de aminoácidos de los bloques embriofóricos (Tabla I), se encontró que el porcentaje de los residuos que favorecen la estructura de alfa-hélice es del 31.6 (ala: 7.5%; leu: 3.2%; fen: 0.6%; tir: 3.2%; cis: 10.5%; met: 1.4%; his: 1.2% y val 4.0%), comparado con 61.5% de los residuos que la desestabilizan (ser: 11.2%; ile: 0.9%; tre: 2.3%; gli: 18.9%; lis: 6.7%; arg: 14.2% y pro: 7.3%). Estos valores sugieren que, a diferencia de las queratinas, grandes regiones de la(s) proteína(s) de los bloques, presenta(n) una estructura secundaria distinta a la de alfa-hélice. Por otro lado, el contenido de cisteína de los bloques embriofóricos resultó ser del 10.5%, comparable solamente con algunas proteasas, hormonas y queratinas (Fasman, 1969).

El contenido de cisteína que presentan las queratinas, por ejemplo, es de entre 6.8 y 29.8 moles% (Bradbury, 1973). Este valor sugiere que, a semejanza de las queratinas, la organización de los bloques embriofóricos se mantiene a través de un gran número de uniones disulfuro intercadena. Adicionalmente, la gran riqueza en residuos de cisteína concuerda con los

resultados de Johri (1957) y de Morseth (1965), quienes encontraron que el embrioforo de los huevecillos de varias especies de ténidos, se tiñen intensamente con ácido perfórmico de Schiff.

La comparación entre el contenido de aminoácidos de los bloques embriofóricos con el de algunas queratinas y sedas, realizada por métodos de taxonomía numérica mostró una identidad del 77% con las queratinas de pluma y una del 47% con las queratinas de mamífero (lanas, pelo y cuerno). Cabe hacer notar, que las queratinas de pluma presentan considerables diferencias con las queratinas epidérmicas de mamíferos (Kemp y Rogers, 1972), por lo que se sugirió que han evolucionado en forma no paralela (Kemp, 1975). Todas las queratinas estudiadas quedaron dentro de un mismo grupo (Fig. 10), excepto las queratinas de pluma y una de las lanas. Entre todas las queratinas analizadas se observó una similitud entre el 47% y el 91%. El resultado de la comparación mostró una marcada agrupación de proteínas idénticas (seda-seda; pluma-PBE y queratinas de mamíferos) y no así de proteínas globulares (gammaglobulina bovina y hemoglobina humana) no relacionadas con las proteínas anteriores.

Sin embargo, la identidad encontrada entre la(s) proteína(s) de los bloques embriofóricos y las queratinas de pluma se refiere al contenido de aminoácidos de las proteínas, por lo tanto, es necesario aclarar en posteriores estudios si esta identidad encontrada en el dendograma, es real.

El resultado del análisis de aminoácidos de los bloques embriofóricos de T. saginata no puede ser comparado con los correspondientes para T. hydatigena, T. ovis y T. pisiformis, reportados por Morseth (1965), ya que este autor solo llevó a cabo análisis cualitativos de aminoácidos.

En cambio, el contenido de azufre (obtenido a partir del contenido de cisteína) determinado en la presente tesis concuerda cercanamente con los reportados por Morseth (Tabla V). Por otro lado, al comparar el contenido de aminoácidos de los bloques embriofóricos de T. saginata y los de ganchos rostelares de T. taeniaeformis (Dvorak, 1959) y de Echinococcus granulosus (Gallagher, 1964), (tabla VI) se observan más diferencias que similitudes. Sin embargo, todos ellos muestran un gran contenido de cisteína, aunque el reportado para los ganchos de T. taeniaeformis es excepcionalmente alto. Estos resultados indican que a pesar de que en los tres casos se trata de proteínas altamente entrecruzadas por uniones disulfuro, es probable que los bloques embriofóricos estén formados por proteína(s) diferentes a la(s) de los ganchos rostelares.

La electroforesis en geles de poliacrilamida del material solubilizado de los bloques embriofóricos muestra varias bandas protéicas (Fig. 11). Se encontró una gran similitud entre los patrones de bandeado de los materiales solubilizados por agentes tan disímboles como el ácido perfórmico y el hidróxido de sodio. Esta similitud sugiere que ambos agentes solubilizaron una muestra representativa de los constituyentes de los bloques.

Tanto en condiciones reductoras como en no reductoras se encontraron dos bandas abundantes de pesos moleculares de 66,000 y 65,000, estas representan el peso molecular de las proteínas nativas, las bandas menos prominentes, probablemente sean producto de hidrólisis durante el tratamiento de solubilización, en vista de que todas son de peso molecular menor. Estos resultados sugieren que los bloques embriofóricos están formados por dos proteínas de 66,000 d y de 65,000 d.

En 1965, Morseth realizó estudios de espectroscopia de infrarrojo de los bloques embriofóricos de varias especies de ténidos. Después de comparar estos espectros con los correspondientes de otros materiales, concluyó que los bloques estaban formados por una proteína similar a las queratinas. Sin embargo, en su comparación Morseth solo incluyó a dos proteínas (púa de puercoespin y uña de humano) y a un polisacárido (quitina). Es claro que su conclusión está basada en evidencias limitadas. Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió ampliar la comparación de Morseth, incluyendo en el estudio a dos proteínas globulares además de algunas queratinas.

De acuerdo con los reportado por Morseth, el espectro de los bloques embriofóricos (Fig. 14) es más parecido al de las queratinas (uña de humano y lana de merino) que al de las proteínas globulares (hemoglobina humana y gammaglobulina bovina). Además, los cocientes obtenidos al dividir la absorción de los grupos O-H, C=O y N-H entre la absorción de los grupos S-H, son más similares entre las queratinas y los bloques embriofóricos,

que entre estos y las proteínas globulares (Tabla IV). En consecuencia, parecería correcto concluir que los bloques embriofóricos contienen una proteína del tipo de las queratinas.

En este punto, es necesario analizar con mayor detalle la evidencia que aportan los estudios de espectroscopia en infrarrojo. Como cualquier otro tipo de espectroscopia, la de infrarrojo solo provee información sobre la abundancia relativa de varios grupos químicos. Los resultados anteriores efectivamente indican que a semejanza con las queratinas, los bloques embriofóricos están formados por una(s) proteína(s) con un alto contenido de grupos S-H, dato que por lo demás, ya se había obtenido de los análisis de aminoácidos.

Es solo en este sentido que es posible proponer (con la información disponible) que una proteína de invertebrados, es similar a proteínas que hasta ahora se consideran exclusivas de vertebrados superiores. Para llevar más allá la analogía es necesario aportar evidencias más directas, vgr: secuencia de aminoácidos.

Finalmente, los resultados de las pruebas inmunológicas efectuadas con anticuerpos específicos anti-queratina humana fueron inconclusos tanto para bloques embriofóricos como para las proteínas solubilizadas con ácido per fórmico, ya que no se encontró reacción específica (Fig. 15).

Una observación de este trabajo fué el hecho de que los huevecillos son altamente adhesivos, en los ensayos inmunológicos, se obtuvieron pegados inespecíficos de los anticuerpos con los bloques embriofóricos probablemente como resultado de la adhesividad antes mencionada. Por otra parte, si bien es cierto que los anticuerpos utilizados fueron producidos contra queratinas de (estrato córneo de pie humano) un vertebrado superior muy lejano filogenéticamente a los helmintos, también se sabe que las queratinas son proteínas altamente conservadas a través de la evolución (Fuchs y Coppock, 1981). Los anticuerpos utilizados se hicieron reaccionar con queratinas de cojinete plantar de ratón, obteniéndose resultados positivos (Fig. 18). Esto sugiere que no existe identidad inmunológica entre las proteínas de los bloques con las queratinas de mamíferos. Sin embargo, no se puede descartar que los resultados negativos se deban a la pobre exposición de los determinantes antigénicos en los ensayos con bloques enteros y (o) a su modificación durante el procedimiento de solubilización, en los ensayos con material solubilizado por ácido per fórmico. En este sentido, el uso de anticuerpos en futuros estudios al respecto, parece tener una utilidad limitada.

Los análisis elementales de rayos-X, demostraron la presencia de trazas de silicio en los bloques embriofóricos, lo que explica la alta densidad electrónica cuando los bloques son observados sin tinción al microscopio electrónico. Sin embargo, se desconoce la forma en que el Si se

asocia con las proteínas de los bloques. Cabe mencionar que en análisis similares se han encontrado trazas de Si en los corpúsculos calcáreos de varias especies de ténidos (von Brand, et al, 1965, 1967; Kegley, et al, 1969; Kegley, et al, 1970 y Baldwin, et al, 1978).

En el presente se inicia el estudio de la composición embrioforal en huevecillos de Taenia saginata, aportando información biológica acerca del mecanismo de la liberación del embrión. Nuevas preguntas surgen, que deberán ser respondidas en futuras investigaciones al respecto.

V. CONCLUSIONES

- 1- El material cementante del embrioforo del huevecillo de T. saquinata es de naturaleza protéica.
- 2- El 40% de los residuos de aminoácido del material cementante son sitios sensibles a las enzimas digestivas tripsina y pepsina, lo que explica su fácil degradación por las enzimas digestivas del huésped.
- 3- El contenido de los residuos de aminoácido de los bloques embriofóricos que forman estructura de alfa-hélice es del 31.6% en comparación con 61.5% de los residuos que la desestabilizan. Esto indica que a diferencia de las queratinas, grandes regiones de las proteínas de los bloques embriofóricos presentan una estructura secundaria diferente a la de alfa-hélice.
- 4- Los datos de los espectros de infrarrojo, de los análisis de aminoácidos, así como los drásticos procesos de solubilización de los bloques embriofóricos sugieren que la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas que los componen se mantiene por un gran entrecruzamiento debido a uniones disulfuro.
- 5- El material solubilizado de los bloques embriofóricos está constituido por varias cadenas polipeptídicas, de las cuales, dos son las más prominentes y sus pesos moleculares son de 66,000 y 65,000. Una

posible interpretación es que los bloques embriofóricos están constituidos por estas dos proteínas y que las cadenas restantes, se originaron por procesos hidrolíticos debidos a los drásticos tratamientos empleados para su solubilización.

- 6- Los bloques embriofóricos de T. saginata contienen Silicio (Si), lo que les confiere una alta densidad electrónica.

VI. REFERENCIAS

- Baden, H.P., Goldsmyth, L.A. and Fleming, B. (1973). The polypeptide composition of epidermal prekeratin. *Biochim. Biophys. Acta.* 317, 303-311.
- Baldwin, J.L.; Berntzen, A.K. and Brown, B.W. (1978). Mesocestoides corti : Cation concentration in calcareous corpuscles of tetrathyridia grown in vitro. *Expl. Parasit.* 44, 190-196.
- Beck, J.W. & Davis, J.E. *Medical Parasitology*. London. 1976. pp. 244.
- Bradbury, J.H. (1973) The Structure and Chemistry of Keratin Fibers. *Advances in Protein Chemistry.* 27, 111-210.
- Brand, T. von; Scott, D.B.; Nylen, M.U. and Pugh, M.H. (1965c). Variations in the mineralogical composition of cestode calcareous corpuscles. *Expl. Parasit.* 16, 382-391.
- Brand, T. von; Nylen, M. U.; Martin, G.N. and Churchwell, F.K. (1967). Composition and crystallization patterns of calcareous corpuscles of cestodes grown in different classes of hosts. *J. Parasit.* 53, 683-687.
- Crestfield, A.M.; Moore, S. and Stein W.H. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 622.
- Crusz, H. (1947). The early development of the rostellum of *Cysticercus fasciolaris* Rud., and the chemical nature of its hooks. *Journal of Parasitology* 33, 87-98.
- Cunningham, Gottlieb, Konigsberg and Edelman (1968). *Biochemistry* 7, 1983 .
- Dixon, K.E. (1968). Encystment of the cercaria of Fasciola hepática. *Wiadomosci Parazytologiczne.* T. XIV, Nr 5-6.
- Dixon, K.E. (1975). The structure and composition on the cyst wall of the metacercaria of Cloacitrema narrabeenensis. (Howell and Bearup, 1967) (Digenea: Philophthalmidae). *International Journal for Parasitology.* 5, 113-118.
- Dixon, K.E. and Mercer, E.H. (1964). The fine structure of the cyst wall of the metacercaria of Fasciola hepática. *Quarterly of Journal of Microscopical Science.* 105 (4). 385-388.
- Dixon, K.E. and Mercer, E.H. (1967). The formation of the cyst wall of the metacercaria of Fasciola hepática L. *Zeitschrift für Zellforschung.* 77, 345-360.

- Dvorak, J.A. (1969). Hydatigera taeniaeformis: Strobilocerci Hooks.I. Collection and Preparation; Elemental, Aminoacid and Infrared Spectrophotometric Analyses Experimental Parasitology. 26, 111-121.
- Dvorak, J. A. (1969). Hydatigera taeniaeformis: Strobilocerci Hooks II. Solubility and Structural Homogeneity. Experimental Parasitology. 26, 122-127.
- Dvorak, J.A. (1969). Hydatigera taeniaeformis: Strobilocerci III. Molecular Weight and N-terminal Aminoacid Determinations. Experimental Parasitology. 26, 128-133.
- Fasman, G.D. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. U.S.A. 1969. pp. 633.
- Fraser, R.D.B. (1969). Keratins. Scientific American. 221 (2), 87-96.
- Fuchs, E.V.; Coppock, S.M.; Green, H.; Cleveland, D.W. (1981). Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance. Cell 27, 75-84.
- Gallagher, I.H.C. (1964). Chemical Composition of Hooks isolated from hydatid scoleces. Experimental Parasitology. 15, 110-117.
- Gemmell, M. A. (1978). The effect of weather on tapeworm eggs and its epidemiological implications. In: Gibson, (Gibson, T.E., Ed.) Weather and parasitic animal disease. World Meteorological Organization, Technical Notes. 159, 83-94.
- Gemmell, M.A. and Lawson, J.R. Ovine Cysticercosis: An epidemiological model for the cysticercosis. I. The free living egg phase. In: Cysticercosis Present State of Knowledge and Perspectives. Ed: Flisser, A.; Willms, K.; Lacroix, J. P.; Larralde, C.; Ridaura, C. New York. 1982. pp. 87-98.
- Harrow, B. Textbook of Biochemistry. London. 1947, pp. 594.
- Haurowitz, F. Chemistry and Biology of Proteins. New York. 1950. pp. 374.
- Hawkes, R.; Niday, E. y Gordon, J.A. (1982). A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Analytical Biochemistry: 119, 142-147.
- Herbrink, P.; Frans, J.; Brussel, V. and Warnaar, S.O. (1982). The antigen spot test: A Highly sensitive assay for the detection of antibodies. Journal of Immunological Methods. 48, 293-298.

- Hill and Konisberg (1962). Journal of Biological Chemistry, 237, 3151.
- Huffman, J.L. and Jones, A.W. (1962). Hatchability, viability and infectivity of Hydatigena taeniaeformis eggs. Experimental Parasitology 12, 120-124.
- Inatomi, S. (1962). Submicroscopic structure of the egg shell of helminths. Journal of the Okayama Medical Society. 74 (Suppl) 31.
- Johnson, S.C. (1967). Hierarchical clustering schemes. Psychometrika. 32, 241-254.
- Johnston, A.W.B. and Beringer J.E. (1975). Identification of the Rhizobium Strains in Pea Root Nodules Using Genetic Markers. Journal of General Microbiology 87, 343-350.
- Johri, L.N. (1957) A morphological and histochemical study of egg formation in a cyclophyllidean cestode. Parasitology. 47, 21-29.
- Kegley, L.M.; Brown, B.W. and Berntzen, A.K. (1969). Mesocestoides corti: Inorganic components in calcareous. Expl. parasit. 25
- Kegley, L.M.; Baldwin, J.; Brown, B.W. and Berntzen, A.K. (1970). Mesocestoides corti: Environmental cation concentration in calcareous corpuscles. Expl. Parasit. 27, 88-94.
- Kemp, J.D. (1975). Unique and repetitive sequences in multiple genes for feather keratin. Nature, 254. 573-577.
- Kemp, D. and Rogers, G.E. (1972). Differentiation of avian keratinocytes. Characterization and relationships of the keratin proteins of adult and embryonic feathers and scales. Biochemistry, 11, 969-975.
- Laclette, J.P.; Ornelas, Y.; Merchant, M.T.; Willms, K. Ultrastructure of the Surrounding Envelops of Taenia solium eggs. In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. ED: Fliesser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. New York. 1982 pp. 375-387.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the Head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Lee, H.H-K; Jones, A.W. and Wyant, K.D. (1959) Development of the taenid embriophore. Tr. Am. Mier. Soc. 78: 355-357.
- Lehninger, A.L. The Molecular Basis of Cell Structure and Function. New York, 1975. pp. 1104.

- Lethbridge, R.C. (1980) Helminthological Abstracts. Commonwealth Institute of Helminthology. 49 (2) 60-73.
- Lewert, R.M. and Lee, C.L. (1955). Studies on the passage of heminth larvae through host tissues III. The effects of Taenia taeniaeformis on the rat liver as shown by histochemical technics. Journal of Infectious Diseases, 97. 177-186.
- Mackie, A. and Parnell, I.W. (1967). Some observations on taeniid ovicides: The effects of some organic compounds and pesticides on activity and hatching. J. Helm. 41: 167-210.
- Mercer, E.H. Keratin and Keratinization. Pergamon. Oxford. (1961).
- Mercer, E.H. and Dixon, K.E. (1967) The fine structure of the cystogenic cells of the cercaria of Fasciola hepatica L. Zeitschrift für Zellforschung. 77, 331-344.
- Morseth, D.J. (1965) Chemical Composition of Embryophoric Blocks of Taenia hydatigena, Taenia ovis, and Taenia pisiformis eggs. Experimental Parasitology 18, 347-354.
- Morseth, D.J. (1965) Ultrastructure of developing taeniid embryophores and associate structures. Experimental Parasitology. 16: pp 207.
- Nieland, M.L. (1966). Electron Microscope Observations on the egg of Taenia taeniaeformis. The Journal of Parasitology. 54 (5), 957-969 .
- Oakley, B.R.; Kirsch, D.R. and Morris, R.N. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 105: 361-363.
- Ogren, R.E. (1959) The hexacath embryo of a Diplozoid tapeworm. III. The formation of shell and inner capsule around the oncosphere. Journal of Parasitology. 45, 580-585.
- Pence, D.B. (1967) Electron microscope and histochemical studies on the eggs of Hymenolepis diminuta. Journal of Parasitology. 56. 84-97.
- Rogers, G.E. (1959). Electron Microscope Studies of Hair and Wool. Ann. NY. Acad. Sci. 83 (3): 378-399.
- Shekhovstov, V.S. (1975) Resistance of Taenia saginata oncospheres to environmental conditions. In: Problemy Parasitologii. Materialy. VIII. Nauchnoi Konferentsii Parasitologov. UKSSR., Chast'2, Kiev, USSR. Naukova. Dumka. 288-289.

- Silverman, P.H. (1954). Studies on the biology of some tapeworms of the genus Taenia I. Factors affecting hatching and activation of taeniid ova, and some criteria of their viability. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 48, 207-215.
- Silverman, P.H. (1954) Studies on the biology of some tapeworms of the genus Taenia II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 48, 355-365.
- Sokal, R.R. and Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38, 1409-1438.
- Spackman, D.H.; Stein, W.H.; Moore, S. (1952). Automatic Recording Apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Chemistry*. 30, 1190-1206.
- Stenberg, J. y Jeppesen, P. (1983) Dot-Blotting-a novel screening assay for antibodies in hybridoma cultures. *J. Immunological Methods*. 64, 39-43.
- Sternberger, L.A. (1978) *Immunocytochemistry*. Prentice-Hall, Inc. England John Wiley and Sons, Inc. ISBN 0-471-03386-3.

VII. QUERATINAS

Las queratinas son una familia de proteínas fibrosas exclusivas de vertebrados superiores: reptiles, aves y mamíferos (Fuchs, et al, 1981). Su principal función es protectora como en la piel, plumas, cuernos, uñas, garras, etc.. (Fraser, 1969). La función protectora de las queratinas se debe principalmente a su gran resistencia física y química, propiedad que se le atribuye en primer lugar a la estructura secundaria de las fibras que las componen y en segundo lugar a la estructura cuaternaria, ya que las moléculas de estas proteínas poseen un alto grado de entrecruzamiento por puentes disulfuro que forman un retículo tridimensional compacto (Fraser, 1969).

Entre las propiedades fisicoquímicas de las queratinas están las de contracción, extensión, plasticidad, relajación, torsión, etc., a las que se les ha dado el nombre de propiedades mecanoquímicas (Crewther, et al, 1965). Estas varían dependiendo de la concentración de azufre en las fibras de queratina, de factores ambientales como la humedad y la temperatura así como por la acción de algunos agentes químicos (Crewther, et al, 1965).

Existen dos grandes grupos de queratinas, las extracelulares y las intracelulares. a) Queratinas duras o extracelulares: las queratinas de la lana han sido las queratinas más estudiadas por la importancia que tienen en la industria (Fraser, 1969). Estas proteínas difieren en la morfología de sus fibras. Las queratinas de lana fina están compuestas de fibras formadas

por dos tipos celulares, las células aplanadas que forman la cutícula y las alargadas que forman la corteza, las células corticales son fusiformes y están formadas por microfibrillas que a su vez se forman de protofibrillas (Fig. 1) (Fraser, 1969). En fibras de lana más gruesas o en fibras de cabello, existe un tercer componente celular que constituye la médula. La cutícula está formada por tres capas: la epicutícula, la exocutícula y la endocutícula, estas tres capas se extienden longitudinalmente a lo largo de la fibra y están separadas de la corteza por un complejo membranal celular (Fig. 2) (Rogen, 1959). En fibras finas, la corteza está dividida en dos secciones, la ortocorteza y la paracorteza; la corteza está delimitada por un complejo membranal celular en el que se encuentra el cemento intercelular, este cemento intercelular, parece tener un origen extracelular (Mercer, 1961).

Al examinar las fibras de las queratinas por difracción de rayos-X se observan sitios de reflexión espaciados a intervalos regulares a lo largo de la fibra (Susuki, et al, 1973). Las fibras de queratina extendidas y sin extender (propiedad de elasticidad) presentan un patrón de difracción diferente en los intervalos de los sitios de reflexión. En la fibra se le llama patrón alfa y tiene un intervalo entre cada sitio de reflexión llamado espacio meridional o traslación axial (espacio en dirección al eje de la fibra) de 5.1 Å. El patrón de la fibra extendida se llama patrón beta y tiene un intervalo de 3.25 Å entre cada sitio de reflexión (Fraser, 1969).

El patrón alfa o estructura de alfa-queratina implica que los 1-aminoácidos se enrollan formando una hélice que rota hacia la derecha,

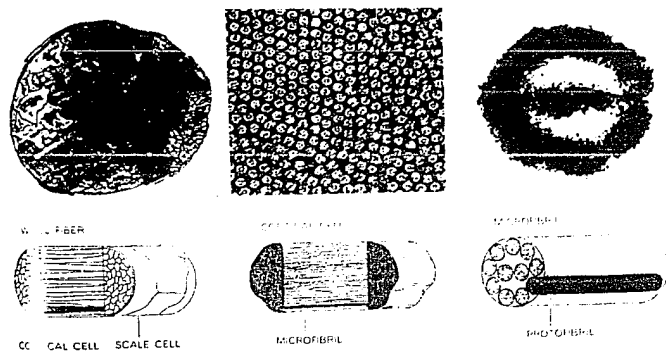


Fig. 1. Fibra de lana de Merino, mostrando protofibrillas y microfibrillas.
Tomada de Fraser, 1969.

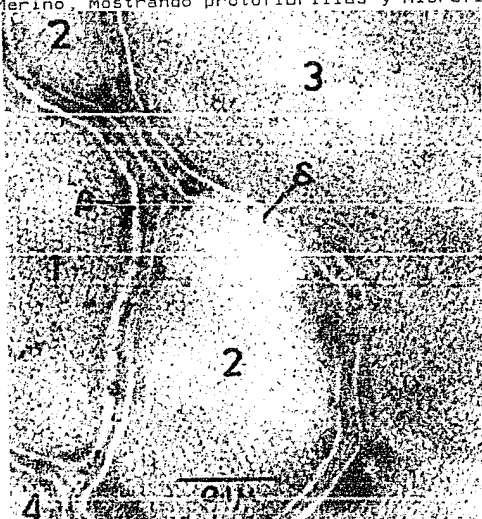


Fig. 2. Complejo membranal celular.
Tomada de Rogers, 1959.

correspondiéndole la posición 1 al carbono beta. El sentido de la secuencia -CONH- a lo largo de la hélice puede ser al azar como entre las moléculas vecinas de un cristal. En cuanto al patrón beta o estructura de beta-queratina, la secuencia de -CONH- en cadenas alternadas es paralela (Crewther, et al, 1965). Cuando se hacen espectros de infrarrojo se observa que las bandas correspondientes a los enlaces -CO- y -NH- están orientadas preferencialmente en forma paralela al eje de la molécula (Susuki, et al, 1973). Los pájaros y los reptiles pueden producir ambos tipos de queratinas, mientras que los mamíferos sintetizan solo el tipo alfa (Fraser, 1969).

Cuando las queratinas de la lana son solubilizadas, se les puede separar en dos fracciones principales, una de las cuales es rica en azufre y la otra tiene menor contenido de este elemento (Crewther, et al, 1965). La fracción de bajo contenido de azufre consiste de dos moléculas fibrosas, en tanto que la fracción enriquecida en azufre consiste de moléculas globulares (Fraser, 1969).

Las proteínas de bajo contenido de azufre están enrolladas en una estructura de alfa-hélice, como muchas proteínas fibrosas, mientras que las proteínas de alto contenido de azufre se comportan como cordones organizados al azar cuando se encuentran en solución acuosa y solo son capaces de formar alfa-hélice cuando están en contacto con un disolvente que favorece dicha estructura (Fraser, 1969).

La concentración de azufre varía principalmente en las proteínas de alto contenido de azufre sobre todo entre especies y aún dentro de la misma

especie, dependiendo de la dieta del organismo (Fraser, 1969). Por reacciones de alquilación, que consisten en reducir los puentes disulfuro con tioglicolato a la forma tiol, se forma la querateína, cuyos puentes reducidos pueden estabilizarse con iodoacetato para formar S-carboximetil-querateína. Si las proteínas S-carboximetiladas contienen una mezcla de componentes de alto y bajo contenido de azufre, se las puede separar con acetato de zinc, ya que las proteínas de bajo contenido de azufre se precipitan y las de alto contenido permanecen en solución (Bradbury, 1973).

La nomenclatura de las proteínas S-carboximetiladas es la siguiente: las proteínas de bajo contenido de azufre se denominan SCMKA (S-Carboximetil-Keratein-A) y las proteínas de alto contenido de azufre se denominan SCMKB (S-Carboximetil-Keratein-B). Los pesos moleculares de las proteínas SCMKA oscilan entre los 40,000 y los 70,000 daltones, en tanto que los pesos moleculares de las SCMKB varían entre los 15,000 y los 30,000 (Crewther, et al, 1965).

Tanto las proteínas SCMKA como las SCMKB son familias de proteínas que se pueden fraccionar, utilizando diferentes tratamientos (Bradbury, 1973; Crewther, et al, 1965). Los análisis de aminoácidos de estas familias de proteínas presentan variabilidad en cuanto a su concentración. La tabla I muestra diferencias en composiciones de aminoácidos entre las proteínas SCMKA y SCMKB, principalmente en cuanto a su contenido de S-carboximetil-cisteína.

Tabla I. Comparación de los contenidos de aminoácidos de queratinas de alto y bajo contenido de azufre.

	Proteínas de Bajo Contenido de Azufre (S C M K A)		Proteínas de Alto Contenido de Azufre (S C M K B)	
		Mol%		Mol%
ala		6.4		2.9
arg		7.3		6.7
asp		8.1		4.1
Scmc*		6.8		17.9
glu		14.1		6.4
gli		8.8		5.4
his		0.7		0.9
ile		3.7		3.0
leu		10.3		5.0
lis		4.1		0.7
met		0.6		0.0
fen		3.0		2.4
pro		4.2		13.6
ser		7.3		12.0
tre		4.4		10.4
tir		4.3		1.9
val		5.8		6.7

SCMKA= S-carboximetil-Keratin-A ; SCMKB= S-carboximetil-Keratin-B

*= S-carboximetilcisteína

Tomada de Bradbury, 1973.

	5	10	15	20
II	<u>pro</u> <u>arg</u> cis cis ser val <u>arg</u> tre <u>gli</u> pro ala tre tre ile cis ser ser asp lis			
III	<u>arg</u> <u>leu</u> cis cis ser val <u>pro</u> tre <u>ser</u> pro ala tre tre ile cis ser ser asp lis			
IV	<u>arg</u> <u>leu</u> cis cis ser val <u>pro</u> tre <u>ser</u> pro ala tre tre ile cis ser ser asp lis			
II	<u>asn</u> <u>ile</u> <u>ser</u> <u>leu</u> leu gli pro tre cis cis --- asp <u>asn</u> <u>ser</u> pro <u>val</u> pro <u>cis</u> <u>val</u>			
III	<u>tre</u> <u>val</u> <u>trp</u> <u>leu</u> leu gli pro tre cis cis <u>cis</u> asp <u>asn</u> <u>arg</u> pro <u>pro</u> pro <u>tir</u> <u>his</u>			
IV	<u>tre</u> <u>val</u> <u>trp</u> <u>fen</u> leu gli pro tre cis cis <u>cis</u> asp <u>asn</u> <u>arg</u> pro <u>pro</u> pro <u>cys</u> <u>his</u>			
II	asn leu tre tre <u>fen</u> <u>ile</u> gln <u>pro</u> <u>gli</u> cis glu <u>asn</u> <u>val</u> cis <u>glu</u> pro <u>arg</u> cis ---			
III	asn leu tre tre <u>tir</u> <u>tre</u> gln <u>ser</u> <u>ser</u> cis glu --- <u>pro</u> cis <u>ile</u> pro <u>ser</u> cis <u>cis</u>			
IV	asn leu tre tre <u>tir</u> <u>tre</u> gln <u>pro</u> <u>ser</u> cis glu --- <u>pro</u> cis <u>ile</u> pro <u>ser</u> cis <u>cis</u>			

Fig. 3. Comparación de secuencias de aminoácidos del C-terminal de 3 proteínas de la familia I de SCMKB, (II, III y IV) los cambios se muestran subrayados.

Tomada de Bradbury, 1973.

Por otro lado, se ha logrado secuenciar estas proteínas, encontrándose una microheterogeneidad tanto en SCMKA como en SCMKB. En la figura 3 se muestra la comparación entre las secuencias de los grupos C-terminal de algunas familias SCMKB. En las proteínas de alto contenido de azufre, la Cmc (Carboximetilcisteína) se encuentra en los residuos 1-48 y en las proteínas de bajo contenido de azufre en los residuos 49-99 (Bradbury, 1973). Se encuentran altos porcentajes de prolina, serina y treonina en las proteínas de alto contenido de azufre, que las distinguen de las de bajo contenido. Existen dobles secuencias de carboximetilcisteína, serina, leucina, prolina, treonina y triples secuencias de carboximetilcisteína y prolina en las proteínas de alto contenido de azufre (Bradbury, 1973). En una de las familias de SCMKB existen secuencias repetidas, una secuencia de 10 residuos entre el 21 y el 52 y una repetición parcial de la misma secuencia en la última parte de la molécula (Bradbury, 1973). La heterogeneidad entre las queratinas no sorprende, ya que estas proteínas realizan una gran diversidad de funciones (Alberts, et al, 1983).

Comparando los grupos N-terminal de queratinas de lana, cabello, pluma y de pelo de caballo, se observa una gran similitud entre los mismos (Crewther, et al, 1965). Además de las familias de queratinas SCMKA y SCMKB, existe otra tercera familia que se caracteriza por tener un alto contenido de tirosina-glicina (queratinas de ultra-alto contenido de azufre).

Aparte de los métodos anteriormente citados, existen también otros métodos analíticos que se utilizan para conocer la composición química de

las queratinas, como son: la determinación de la cisteína, de los puentes disulfuro, determinación de grupos N-terminal, de grupos básicos ionizados, etc.

Las queratinas, debido a los enlaces disulfuro que presentan, pueden ser sometidas a reducción de puentes disulfuro, sulfitólisis, oxidación, etc. (Crewther, 1965).

Finalmente, el punto isoeléctrico de la lana varía entre 3.4 y 5.0 dependiendo del método de determinación, considerando a la lana de naturaleza anfotérica (Crewther, 1973).

b) Queratinas intracelulares: estas proteínas, están asociadas en forma de filamentos que son conocidas como tonofilamentos o filamentos intermediarios. Estos filamentos miden de 8 a 10 nm de diámetro. Los filamentos de queratinas son una de las tres clases de filamentos intermediarios del citoesqueleto. Se localizan alrededor de los filamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto. Su principal función es la de dar rigidez y sostén a la célula, ya que se unen con los filamentos de actina y los microtúbulos. Cuando la célula muere, los filamentos persisten formando una capa protectora (Alberts, et al, 1983).

Las queratinas son sintetizadas en la capa interna de células epidérmicas, constituyendo su principal producto de diferenciación. En

cuanto a la expresión de estas proteínas, estudios de hibridización de DNA sugieren que distintos grupos de genes de queratinas son expresados durante la diferenciación celular en distintos estados de desarrollo y en diferentes tejidos epiteliales (Lazarides, 1980). Experimentos de extracción y reconstitución de proteínas sugieren que las queratinas de las células vivas se encuentran en la forma reducida, lo cual favorece su polimerización y entrecruzamiento por puentes disulfuro intermoleculares (Lazarides, 1980).

Acerca de la estructura de los filamentos intermediarios se sabe que consisten de polipeptidos fibrosos. Se cree que están asociados en forma de cuerda, como en la molécula de colágena. Anteriormente se pensaba que el arreglo de los filamentos intermediarios podría ser en grupos de tres, es decir, formando trimeros. Sin embargo, estudios recientes (Gaisler y Weber, 1982; Woods e Inglis, 1984; Parry, et al, 1985) indican que los filamentos intermediarios están formados por un complejo de cuatro cadenas (un par de dos cadenas enrolladas). En la figura 4 se observa la estructura de las subunidades de los filamentos intermediarios.

Por último, se sabe que las queratinas tipo I y tipo II (ver Fig. 4) de células diferenciadas de ratón tienen subdominios V1 y V2 (variables), de las cuales, aproximadamente el 60% son glicinas. Según Steinert y cols. (1985), la mayor hidrofobicidad de la secuencia, debida a estas glicinas, podría explicar la insolubilidad de las subunidades. Este autor postula que las propiedades de estos subdominios variables se han adaptado evolutivamente para mantener la naturaleza flexible e insoluble de la

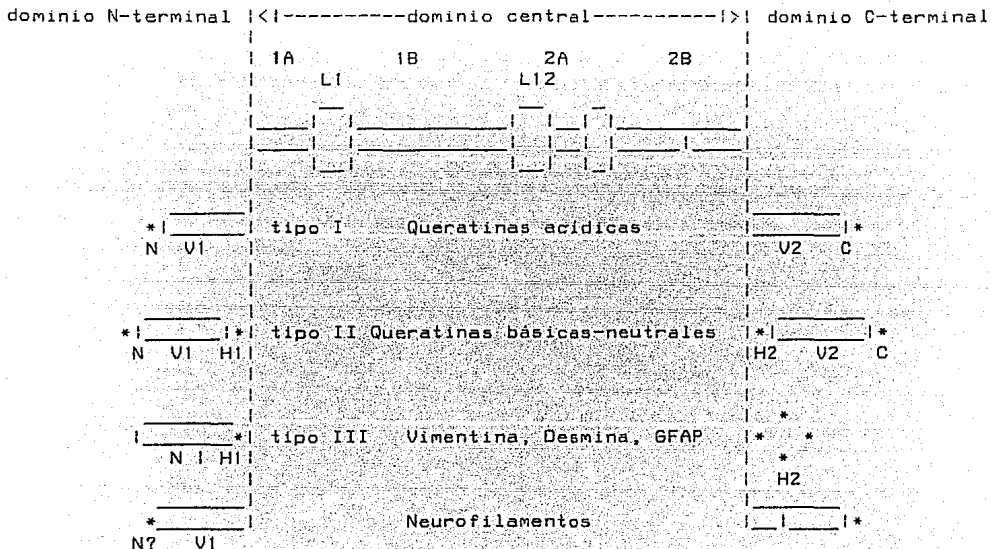


Fig. 4. Estructura de las subunidades de los filamentos intermedarios.

V= región variable
H= región homóloga
L= linker

Tomada de Steinert, et al, 1985.

barrera protectora epitelial. Por su parte, las queratinas duras (uña, cabello, etc.) contienen secuencias ricas en cisteína, de naturaleza flexible, que forman abundantes uniones disulfuro (Gillespie, 1983). Estas uniones dan como resultado una estructura rígida e insoluble (Steiner, et al, 1984a).

Finalmente, experimentos de traducción *in vitro*, utilizando RNAm de diferentes especies han demostrado que las queratinas epidérmicas son una familia de proteínas muy relacionadas que se han conservado a través de la evolución (Lazarides, 1980). Además, con anticuerpos anti-queratinas de mamíferos se ha demostrado que existe una gran reactividad cruzada entre especies, lo que indica que diferentes queratinas están inmunológicamente relacionadas (Lazarides, 1980).

REFERENCIAS

- Alberts, B.; Bray, D.; Watson, J.D.; Lewis, J.; Raff, M. y Roberts, K. *Molecular Biology of the Cell*. Ed. Macmillan. New York. 1983.
- Atsbury, W.T. and Street, A. (1931). X-ray studies of the structures of hair, wool and related fibers. I. General. *Phil. Trans. Royal Soc.* 230A, 75-78.
- Bradbury, J.H. (1973) The Structure and Chemistry of Keratin. *Advances in Protein Chemistry*. 27, 111-209.
- Crewther, W.G.; Fraser, R.D.B.; Lennox, F.G. and Lindley, H. (1965) The Chemistry of Keratins. *Advances in Protein Chemistry*. 20, 191-348.
- Crewther, W.G. and Harrap, B.S. (1965) Helix rich fraction from the low sulfur Proteins of Wool. *Nature (London)* 207, 295.
- Fraser, R.D.B. (1969) Keratins. *Scientific American*. 221 (2), 86-96.
- Fraser, R.D.B. and MacRae, T.P. (1983). The structure of the alfa-keratin microfibril. *Biosci. Report*. 3, 517-525.
- Fuchs, E.U. and Coppock, S.M. (1981). Two Distinct Classes of Keratin Genes and Their Evolutionary Significance. *Cell*. 27, 75-84.
- Geisler, N. and Weber, K. (1982). The aminoacid sequence of Chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins *EMBO.J.* 1. 1649-1656.
- Gillespie, J.M. (1983). The structural proteins of hair: isolation, characterization and regulation of biosynthesis. In *Biochemistry and Physiology of the Skin*, L.A. Goldsmith, New York. 475-510.
- Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283, 249-256.
- Mercer, E. H. (1961). *Keratin and Keratinization*. Pergamon, Oxford.
- Parry, D.A.; Steven, A.C. and Steinert, P.M. (1985). The coiled-coil molecules of the intermediate filaments consist of two parallel chains in exact axial register. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 127, 1012-1018.

- Rogers, G.E. (1959). Electron Microscope Studies of Hair and Wool. *Annals of New York Academy of Sciences*. 83 (3), 378-399.
- Steinert, P.M.; Jones, J.C.R. and Goldman, R.D. (1984a). Intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 99, 22s-27s.
- Steinert, P.M.; Steven, A.C. and Roop, D.R. (1985). The Molecular Biology of Intermediate Filaments. *Cell* 42, 411-419.
- Susuki, E.; Crewther, W.G.; Fraser, R.D.B.; MacRae, T.P. and McKern, N.M. (1973). X-ray Diffraction and Infrared Studies of an α -Helical Fragment from α -Keratin. *Journal of Molecular Biology*. 73, 275-278.
- Weber, K. and Geisler, N. (1984). Intermediate filaments—from wool α -keratin to neurofilaments: a structural overview. In *Cancer Cells 1, The Transformed Phenotype*, Cold Spring Harbor Laboratory, 153-159.
- Woods, E.F. and Inglis, A.S. (1984). Organization of the coiled-coils in the wool microfibril. *Int. J. Biol. Macromol.* 6, 277-283.