

27.
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

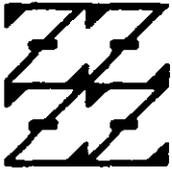
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**CARACTERIZACION PARCIAL DE MIOSINA
DE CISTICERCO DE *Taenia solium*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
**LICENCIADO EN QUIMICA
FARMACEUTICA BIOLOGA**
P R E S E N T A :
ELIZABETH MINERVA MORAN TLATELPA

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO TRABAJAMOS CON
DE NUESTRA COLECCION**

MEXICO, D. F.

1999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

271055



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECURSOS:

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de la Dra. Ana Flisser Steinbruch en el Departamento de Microbiología y Parasitología ubicado en la Facultad de Medicina de la UNAM. Bajo la dirección del M. en I.B.B. Javier R. Ambrosio Hernández y el apoyo técnico de la Q.F.B. Mayra Cruz así como el financiamiento por parte de la Comunidad Europea de Naciones (No. 13014170151214), y los DGAPA (No. IN209994 e IN200297).

A mis padres : Gina y Toño

Gracias por sus inagotables consejos
y el mar lleno de esperanzas que me brindan.

A mis hermanos: Jose, Fer , Tobal y Rafa

Por la confianza que depositan en mí
y su disposición para ayudarme en mis
pequeños y grandes problemas.

A mis cuñadas: Luz, Mary y Lucy

Gracias al apoyo incondicional.

A mis niños: Karen, Kevin, Cinty, Dany ,Lyz y Cris.

Por compartir sus mentes llenas de fantasías
y alegrías y sobre todo por que creen en mí.

A mis amigos

Que de una u otra forma ayudaron en la formación
de mi personalidad a ellos: Vero, Rocío, Ceci,
Claudia, Angel, Velia, Leo, Gerardo.....a todos
para siempre.

A mis primos y tíos

Gracias por su ayuda, muy en especial a Bene
que es más que una tía así como a toda la
familia Manzano Tlatelpa, Morán Rodríguez y
Vaquero Morán.

A mis compañeros de Laboratorio

Gracias por su ayuda y apoyo: May, Laura, Oli, Irma,
Oli, Guille, Agus, Armando, Toño, Víctor, David, Joel, Pablo,
Alberto, Tony, Hugo, Janet y muy especialmente a Lau.

A la familia: Juárez Ureña, Ventura Gallegos e Hirota Velázquez.
Muchísimas gracias por la confianza brindada

A Lupita que siempre recordare con cariño.

**Gracias a todos ustedes profesores porque ayudaron
en mi formación profesional y en especial
a la Dra. Flisser por enseñarme lo interesante
que es la investigación.**

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
INDICE DE FIGURAS.	
ABREVIATURAS.	1
RESUMEN	2
CAPITULO I. INTRODUCCION	4
1. Fundamentos teóricos	
1. 1. Generalidades de las enfermedades parasitarias producidas por <i>Taenia solium</i> .	7
1. 2. Generalidades sobre el parásito.	9
1.2.1. Ciclo de vida.	10
1.2.2. Morfología y clasificación.	12
1.2.2.1. Parásitos adultos o tenias.	13
1.2.2.2. Metacéstodos o cisticercos.	14
1.2.2.3. Huevos.	15
1. 3. Biología celular.	16
1.3.1. Paramiosina.	16
1.3.2. Miosina.	17
1.3.3. Importancia de las proteínas del citoesqueleto.	19
CAPITULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	20
CAPITULO III . OBJETIVOS E HIPOTESIS.	
3.1. Objetivos	22
3.2. Hipótesis	23

CONTENIDO	PAGINA
CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS.	
4. 1. Diseño de investigación.	24
4.1.1. Tipo de estudio.	24
4.1.2. Población	24
4.1.3. Criterios de inclusión.	24
4.1.4. Variables	
4. 2. Materiales, reactivos y equipo.	24
4. 3. Técnicas	26
4.3.1. Producción de anticuerpos monoclonales 4B3	26
4.3.2. Recuperación de cisticercos de <i>Taenia solium</i> .	27
4.3.3. Diagrama de flujo general para la obtencion, análisis y evaluación de miosina de cisticercos de <i>Taenia solium</i> .	27
4.3.4. Preparación de extractos crudos de parásitos	28
4.3.5. Preparación y purificación de miosinas de parásitos.	28
4.3.5.1. Precipitación en KCl 0.04 M.	29
4.3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	29
4.3.5.3. Separación electroforética en geles de poliacrilamida.	29
4.3.5.4. Recuperación desde geles de poliacrilamida-BAC.	30
4.3.5.5. Recuperación desde geles de poliacrilamida en gradiente de concentración.	30
4.3.5.6. Electroelución desde geles de poliacrilamida.	31
4.3.5.7. Evaluación	31
4.3.5.7.1. Electroforesis en geles de gradiente (5-22.5%)	32
4.3.5.7.2. Inmunoelctrotransferencia	32
4.3.6. Determinación del reconocimiento a miosina purificada	33
4.3.6.1. Captura por actina	33
4.3.6.1.1. Reconocimiento de miosina exógena por anticuerpos policlonales y monoclonales.	34

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
4.3.6.1.2. Reconocimiento de miosina exógena por suero de humano sano y de infectado.	34
4.3.6.1.3. Detección de miosina liberada de suero de humanos por tratamiento con ácido tricloroacético.	35
4.3.6.2. Detección de anticuerpos antimiosina contenidos en sueros de pacientes infectados.	36
CAPITULO V. RESULTADOS.	
5. 1. Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales 4B3 hacia extractos crudos de parásitos.	37
5. 2. Preparación y purificación de miosinas de cisticercos.	38
5.2.1. Evaluación de los filamentos purificados por precipitación en KCl 0.04 M.	38
5.2.2. Separación electroforética en geles de poliacrilamida.	39
5.2.3. Recuperación desde geles de poliacrilamida	40
5.2.4. Evaluación de miosinas purificadas.	41
5. 3. Determinación del reconocimiento de las miosinas por anticuerpos antimiosina.	42
5. 4. Captura de miosina por actina	44
5.4.1. Reconocimiento por anticuerpos monoclonales 4B3.	44
5.4.2. Reconocimiento de miosina por suero de humano sano e infectado.	46
5.4.3. Detección de miosina liberada de suero de humanos por el tratamiento con ácido tricloroacético.	47
5. 5. Detección de anticuerpos antimiosina en personas infectadas naturalmente.	48
CAPITULO VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	49
CAPITULO VII. CONCLUSIONES.	55
CAPITULO VIII. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	57

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
CAPITULO IX. APENDICES.	
9.1. Cuantificación de proteínas. Micrométodo colorimétrico.	58
9.1.1. Preparación de la curva de calibración con proteínas conocidas.	58
9.1.2. Determinación de la concentración de proteínas a muestras problema.	59
9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	59
9.2.1. Separación electroforética en GELPOLI.	60
9.3. Inmunoelectrotransferencia.	62
9.3.1. Revelado de la reacción inmunoenzimática	62
9.4. Tinción con azul de coomassie brillante.	63
9.5. Tinción con acetato de sodio 4M.	64
9.6. Tinción de proteínas con nitrato de plata.	64
9.7. Extracción de miosina	65
9.8. Inmunopunto	66
CAPITULO X. REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRAFICAS	68

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
1. Ciclo biológico de <i>T.solium</i> .	11
2. Parásitos adultos o tenias.	14
3. Metacéstodos o cisticercos.	15
4. Huevos de <i>T. solium</i> .	15
5. Estructura molecular de miosina.	18
6. Diagrama de flujo general para la obtención, análisis y evaluación de miosina de cisticercos de <i>Taenia solium</i> .	27
7. Reconocimiento inmunológico de los AcM 4B3 hacia extractos crudos de parásitos.	37
8. Reconocimiento del AcM 4B3 hacia miosina purificada.	38
9. Evaluación de la purificación de miosinas de cisticercos.	39
10. Análisis electroforético de miosina purificada en geles de poliacrilamida al 5%.	40
11. Evaluación de la purificación de miosina en geles de gradiente.	42
12. Reconocimiento de miosina por anticuerpos antimiosina.	43

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
13. Reconocimiento de miosina por anticuerpos monoclonales 4B3.	45
14. Reconocimiento de miosina por suero de humano sano e infectado.	46
15. Detección de miosina liberada de suero de humanos por el tratamiento con ácido tricloroacético.	47
16. Detección de anticuerpos antimiosina en personas infectadas naturalmente.	48

Ac's Pol's	Anticuerpos policlonales.
AcM's	Anticuerpos monoclonales.
AcM 4B3	Anticuerpos monoclonales 4B3.
AcONa	Acetato de sodio.
AG8	Sobrenadante de medio de cultivo de células de mieloma murino de la cepa X63/Ag8653.
Anti- CP	Anticuerpos policlonales anticadena pesada.
Anti - MN	Anticuerpos policlonales antimiosina nativa.
ASB	Albumina sérica bovina. Fracción V (SIGMA).
ATAcO	Ácido tricloroacético al 2%.
BAC	Bis - acrililcistamina.
DAB	3,3 - Diaminobenzidina.
DSS	Dodecilsulfato de sodio.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa.
GELPOLI	Gel de poliacrilamida.
H₂O_{dd}	Agua bidestilada.
IET	Inmunoelectrotransferencia.
MN	Miosina nativa.
NC	Nitrocelulosa.
OFD	o - fenilendiamina.
PM	Pesos moleculares preteñidos.
PMCB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato.
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro.
PVDF	Membrana de polivinil difluoruro.
SFB	Suero fetal bovino.
SSAF	Solución salina amortiguada a fosfatos pH=7.2.
TA	Temperatura ambiente.
TEMED	N,N,N,N - tetrametiletilendiamino.
V	Volts.

Las parasitosis por *Taenia solium* son consideradas como enfermedades infecciosas importantes porque afectan la salud de muchos individuos en México, por lo que se ha legislado al respecto.

Dentro de los estudios relativos al conocimiento de la biología de los parásitos, recientemente con la idea de mejorar el método de diagnóstico de parásitos adultos en humanos infectados y en animales infectados experimentalmente, fueron desarrollados anticuerpos monoclonales. Uno de estos anticuerpos monoclonales (AcM 4B3) permitió la identificación y caracterización biológica parcial de una miosina convencional o tipo II de parásitos de *T. solium*. En el presente proyecto de tesis los resultados obtenidos mostraron que la miosina semipurificada de cisticerco puede ser obtenida por precipitación en KCl 0.04 M, que el AcM 4B3 mantiene su reconocimiento hacia las miosinas de los parásitos, que es posible que se detecten isoformas y que algunas de estas isoformas de miosina puedan ser aisladas empleando procesos como electroelución en combinación con diálisis exhaustiva.

La evaluación del reconocimiento de diferentes anticuerpos antimiosina (tanto policlonales como monoclonales) hacia las fracciones protéicas recuperadas de la purificación de la miosina (precipitación en KCl y por electroelución) mostró que al menos dos bandas de alto peso molecular las cuales son miosinas y/o monómeros e isoformas presentan epítomos que son reconocidos por dichos anticuerpos. El AcM 4B3 reconoció, aparentemente, un sitio específico de miosinas de *T. solium*, mientras que los Ac's pol's reconocen sitios compartidos entre miosinas para los cuales fueron preparados.

El reconocimiento de estas fracciones electroeluidas, por los anticuerpos policlonales, aparentemente permite ver como tales anticuerpos reconocen a isoformas de miosinas, lo cual se repite cuando las miosinas son tratadas con urea. Dichos resultados podrían ser un indicativo de que los sueros de humanos infectados con cisticercosis tienen anticuerpos antimiosina, los cuales podrían reconocer a la miosina en diferentes etapas de purificación e incluso electroeluidas.

Esto podría ser logrado mediante la detección de anticuerpos antimiosina de parásitos o bien mediante la demostración de la presencia de miosina en fluidos biológicos de los individuos infectados.

INTRODUCCION

Las parasitosis por *Taenia solium* son consideradas como enfermedades infecciosas importantes porque afectan la salud de muchos individuos en México, por lo que se ha legislado al respecto (NOM-021-SSA-2-1994). Esta legislación indica que en casos en que en un individuo se detecte y diagnostique cisticercosis, no sólo se debe aplicar un tratamiento al respecto, sino que es necesario identificar al portador del parásito adulto (enfermedad conocida como teniosis) y tratar a esta persona infectada para evitar que se siga manteniendo el ciclo de vida del parásito. Esto es importante, ya que se ha demostrado que la presencia de un portador de tenia induce a la cisticercosis de individuos sanos^{24,68}, lo que indica que estas parasitosis están asociadas unas a otras⁷¹ como lo sucedido con judíos ortodoxos^{54,72}. Las tenias son la fase parasitaria más vulnerable para atacar y el mejor blanco para controlar la parasitosis de forma impactante, ya que se sabe que una sola persona infectada con una sola tenia podría provocar que muchas personas desarrollen la cisticercosis y esto cobra mayor importancia cuando las personas portadoras se encargan del manejo de alimentos.

Por lo anteriormente expuesto, no es solo importante el planear formas de control o tratamiento de las enfermedades, sino también el profundizar en el conocimiento de la biología de los parásitos y de su importancia en la relación huésped-parásito. Posiblemente, con la mayor cantidad de conocimientos de los parásitos, se logren mejorar las opciones para su control, tratamiento y prevención.

Dentro de los estudios relativos al conocimiento de la biología de los parásitos, recientemente con la idea de mejorar el método de diagnóstico de parásitos adultos en humanos infectados y en animales infectados experimentalmente, fueron desarrollados anticuerpos monoclonales. Uno de estos anticuerpos monoclonales (AcM 4B3) permitió la

identificación y caracterización biológica parcial de una miosina convencional o tipo II de parásitos de *T. solium*. Los resultados obtenidos indicaron que esta miosina, a pesar de ser una proteína estructural, podría tener algún papel en el mantenimiento de la relación huésped-parásito, pero lo más importante es que podía esta proteína ser identificada en materia fecal de animales infectados experimentalmente con lo cual se abre el potencial de uso como agente de diagnóstico^{3,13}.

La continuación de la caracterización del AcM 4B3, ya con miosinas purificadas por procesos convencionales específicos, ha permitido y motivado el tratar de ampliar los estudios relacionados con la caracterización de posibles epítomos específicos de estas miosinas, con la idea de conocer sus secuencias de aminoácidos²⁹ y la factibilidad de estudiar si estas miosinas también presentan isoformas como ha sido descrito para otras bien conocidas.

El presente trabajo de investigación fue planeado con la finalidad de identificar si los cisticercos de *T. solium* tienen miosinas semejantes a las de los parásitos adultos, las cuales pudieran ser reconocidas por los AcM 4B3, que ellas pudieran tener isoformas y las posibilidades de que alguna de tales isoformas pudiera ser obtenida para posteriores evaluaciones. Los resultados obtenidos mostraron que la miosina semipurificada de cisticercos puede ser obtenida por precipitación en KCl 0.04 M, que el AcM 4B3 mantiene su reconocimiento hacia las miosinas de los parásitos, que es posible que se detecten isoformas y que algunas de estas isoformas pudieran ser obtenidas para su evaluación. Para estos fines se emplearon diferentes estrategias bioquímicas e inmunoquímicas con las que se lograron detectar complejos inmunes en muestras séricas de personas infectadas de cisticercosis, así como anticuerpos antimiosina. Los resultados sugieren, que el metacéstodo del parásito *T. solium* secreta miosina durante la infección, y ella podría inducir a una respuesta específica de anticuerpos. Aparentemente, según otros experimentos, los anticuerpos presentes en personas infectadas naturalmente reconocen epítomos que por la similitud en peso molecular podría ser la cadena pesada. Los epítomos podrían corresponder a determinantes antigénicos lineales, ya

que los sitios de reconocimiento son conservados luego de que mantienen a pesar de aplicar una purificación por electroelución y que además, mediante este proceso, puede lograrse la separación de la miosina y sus isoformas. La evaluación del reconocimiento de diferentes anticuerpos antimiosina (tanto policlonales como monoclonales) hacia las fracciones protéicas recuperadas de la purificación de la miosina (precipitación en KCl y por electroelución) mostró que al menos dos bandas de alto peso molecular, las cuales son miosinas y/o monoméros e isoformas presenta epítomos que son reconocidos por dichos anticuerpos. Los AcM 4B3 reconocieron aparentemente, un sitio específico en miosinas de *T. solium*, mientras que los Ac's pol's reconocen sitios compartidos entre ellas y para las cuales fueron preparados.

1. FUNDAMENTOS TEORICOS

1.1. Generalidades de las enfermedades parasitarias producidas por *Taenia solium*.

Taenia solium es un céstodo hermafrodita que presenta dos fases parasitarias que infectan a hombre y al cerdo: la forma adulta o tenia habita de manera natural en el intestino del ser humano y llega a alcanzar longitudes que van desde 1.5 a 8 m. Esta forma de infección o teniosis, es una parasitosis generalmente asintomática de difícil diagnóstico clínico para que la que se le han asociado síntomas ligeros tales como debilidad, estreñimiento, anorexia, disminución de peso y cefaleas y su presencia no representa daños serios para la salud de los individuos infectados. La cisticercosis en cambio, producida por el mismo parásito pero en su forma de metacéstodo o larva, es la forma mas severa de la infección parasitaria, ya que los individuos infectados pueden llegar a tener cisticercos de localización cerebral (neurocisticercosis). Aunque, como se comentó, los efectos mas graves de la parasitosis por *T. solium* radican en los cisticercos, es claro por lo conocido del ciclo de vida (ver mas adelante) y por los resultados de estudios de riesgos de transmisión^{24, 68} que es de suma importancia la búsqueda, localización y tratamiento de aquellos individuos portadores de tenia. Esta identificación y tratamiento tienen como base el hecho de que esta forma parasitaria es clave para la transmisión y la presencia de cisticercosis y esto ha motivado, que en México se haya legislado al respecto al considerársele como una enfermedad infecciosa importante de controlar (NOM-021-SSA-2-1994).

De acuerdo a lo planteado anteriormente y con lo relacionado a lo obtenido por diferentes estudios epidemiológicos^{70, 69, 73, 72} se ha demostrado de forma contundente, que existe una alta asociación entre individuos con cisticercosis y portadores de tenia y lo cual está favorecido por las costumbres, la religión, los hábitos higiénico-dietéticos y la cultura de la población^{11, 37} lo cual además, favorece su transmisión a zonas no consideradas como

endémicas y lo que recientemente ha venido a constituirse dentro de lo considerado como enfermedades emergentes, como lo sucedido en judíos ortodoxos del barrio de Manhattan en Nueva York ⁷², para quienes la neurocisticercosis que desarrollaron tuvo su origen en la gente dedicada a actividades domésticas provenientes de latinoamericano y portadores de tenias.

Por lo anteriormente expresado en relación con los estudios epidemiológicos, los conocimientos de la biología del parásito y sus implicaciones médicas; se ha continuado con la búsqueda de métodos de diagnóstico simples, sensibles y específicos de sustituyan a los que actualmente son utilizados para el diagnóstico ^{24, 1} y para los cuales se espera favorecer la mejor identificación, tratamiento y control de estas enfermedades parasitarias. Sin embargo, para lograr la mayor efectividad en el control de estas parasitosis y el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico, se requiere tener un mayor conocimiento de la relación huésped-parásito, además de la biología de *T. solium* en sus diferentes estadios parasitarios. De alguna manera se sabe que como parte de los factores que favorecen la presencia de teniosis por *T. solium* se encuentran involucrados la ineficiencia de los métodos de laboratorio para la identificación y diferenciación entre las diferentes taeniosis (*T. solium* vs *T. saginata*), el inadecuado tratamiento médico por desconocimiento exacto de la parasitosis, de la inadecuada administración terapéutica específica asociada a la carencia de los medicamentos a nivel comercial, el desconocimiento de los mecanismos que intervienen en la relación huésped-parásito y la ineficaz detección de individuos portadores de taenia únicamente por su comportamiento clínico ^{7, 73}.

1. 2. Generalidades sobre el parásito.

1.2.1. Ciclo de vida, (Fig.1).

El hombre es el hospedero definitivo de tenias (Fig.1.A) porque dentro de él, éstas desarrollan todo el proceso correspondiente a su fase adulta y en donde se lleva a cabo su reproducción sexual. El hospedero intermediario natural es el cerdo (Fig.1.C), ya que dentro de él, el parásito encuentra las condiciones necesarias para desarrollarse hasta metacéstodo. El hombre también es susceptible a esta infección por cisticercos, pero la infección es de tipo circunstancial por lo que se le considera como un hospedero accidental (Fig.1.C'). De manera reciente, bajo condiciones experimentales, se han logrado producir tenias en hámsters infectados con cisticercos e inmunosuprimidos. También, recientemente, se ha logrado cerrar el ciclo de vida experimental con chinchillas inmunosuprimidas e infectadas con cisticercos (Maravilla et al, 1998). En el caso de las tenias recuperadas de hámsters, estas no se encuentran totalmente desarrolladas y por lo tanto no son fértiles. En el caso de las chinchillas, los estudios de infección de un cerdo con tenias recuperadas de este modelo experimental, mostraron ser fértiles y con capacidades de infectar, por lo cual ello favorece el cierre del ciclo de vida en condiciones experimentales.

Dentro del intestino de los seres humanos, las tenias pueden llegar a sobrevivir hasta 25 años. Estos parásitos están constituidos por un escólex o cabeza, que en la parte inferior se adelgaza para formar un cuello, a partir del cual se producen los proglótidos. El conjunto de ellos unidos entre sí, forman el estróbilo; los más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados, mientras que los más distantes están totalmente diferenciados y contienen un gran número de huevos, por lo que se dice que son grávidos. Los proglótidos grávidos, desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (promedio de 4-5/días), son evacuados hacia el exterior en las heces del huésped. La primera expulsión de proglótidos de la *T. solium* generalmente ocurre entre 62 y 72 días después de la infección, cuando el parásito mide alrededor de 220 cm de largo. Durante la evacuación de los proglótidos en las heces y la putrefacción de los mismos en el medio ambiente permite la liberación de los huevos

(fig.1.B) y posiblemente (porque no ha sido demostrado aún) puedan llegar al huésped intermediario por distintos medios como los alimentos contaminados las verduras y las frutas mal lavadas la transmisión aérea^{12, 26, 58}. La transmisión orofecal podría ser la forma mas clara de transmisión, según por lo comentado en relación a la transmisión dentro de zonas endémicas por los estudios epidemiológicos, o bien ejemplificado como en el caso de los judíos ortodoxos.

Cuando los huevos han alcanzado el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares⁴⁴, favorecen la activación de las oncosferas (embrión hexacanto), contenidas en los mismos; lo cual facilita su penetración en la mucosa intestinal del huésped y alcance de los capilares linfáticos y sanguíneos mediante los cuales se distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos: como el subcutáneo, el músculo cardiaco, el cerebro, los ojos, etc.². Aunque se desconocen muchos eventos que ocurren después de la penetración de las oncosferas, se sabe que el embrión requiere de cuando menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco y de esta forma puede sobrevivir por varios años dentro de los tejidos infectados del huésped porcino o humano⁷⁶.

La carne cruda o insuficientemente cocida proveniente de un cerdo cisticercoso y las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, activan al cisticerco para que se fije en la pared intestinal, donde crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia productora de proglótidos grávidos en un período aproximado de cuatro meses⁹.

Aunque el cerdo es el principal huésped intermediario de la *T. solium*, algunas otras especies aparte del hombre (perro, mono, entre otros mamíferos), también pueden alojar a los cisticercos ^{3, 26}.

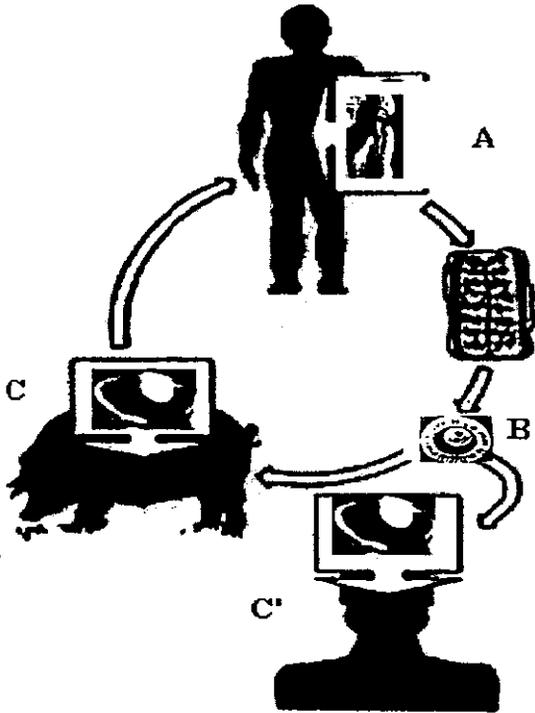


Figura. 1. Ciclo biológico de *T. solium*. Las letras indican los estadios de desarrollo de los parásitos, así como sus diferentes hospederos. A; Parásitos adultos (hospedero definitivo). B. Huevo. C: Metacésto (hospedero intermediario). C' Metacésto (hospedero accidental). Tomado de Aluja *et al*, 1987.

1.2.2. Morfología y clasificación.

Los parásitos de *T. solium* pertenecen al **Phylum** Platyhelminthes por ser organismos pluricelulares generalmente con forma de hoja o de cinta y con simetría bilateral. Estos parásitos presentan ciclos evolutivos complejos, con estadios larvarios morfológica y funcionalmente muy diferentes de los estadios adultos. **Clase** Cestoidea por ser parásitos que en su estadio adulto son hermafroditas, presentan un escólex provisto de ventosas y de ganchos, además del cuello y estróbilo. **Subclase** Eucestoda por que el parásito adulto presenta órganos genitales masculinos y femeninos y la oncósfera presenta una corona de 6 ganchos. **Orden** Cyclophyllidea porque el escólex está formado con cuatro ventosas y un rostelo armado con ganchos, además de que en el parásito adulto los poros sexuales son visibles y se abren lateralmente. **Familia** Taeniidae porque los parásitos adultos presentan un útero de tallo longitudinal en la porción media y en los cuales cada proglótido diferenciado presenta ramas laterales y poros genitales que están distribuidos normalmente de forma alterna. **Género** Taenia por que son parásitos que en su fase adulta son aplanados dorsoventralmente y semejan cintas. **Especie** *solium* ^{4, 5} porque aparte de que es un parásito exclusivamente de humanos, los individuos infectados generalmente sólo contienen un ejemplar. La forma adulta o tenia es llamada comúnmente “solitaria” y la forma de larva o metacéstodo es conocida como cisticerco y comúnmente cuando se le encuentra en la carne de cerdo, es denominada “tomatillo”, “granillo” ó “zahuate” ³. Ambas fases parasitarias presentan una morfología diferente que las hace claramente distinguibles, mientras que los parásitos adultos presentan una porción cefálica o escólex y un largo segmento denominado estróbilo, los cisticercos son parásitos semejantes a pequeñas vesículas que contienen fluido vesicular y que dentro de ellos se encuentra el escólex invaginado. Las condiciones ambientales propiciadas por el huésped contaminado por los cisticercos, determinan cuando un cisticerco se transforma hasta un parásito adulto, luego de que este último fija su escólex al intestino del huésped. Por las causas anteriormente mencionadas, mientras que los cisticercos pueden encontrarse en los tejidos del huésped y en especial en el sistema

nervioso central, las tenias únicamente son de localización intestinal. Las estructuras que ambos parásitos han desarrollado, para mantener tales estadios, les favorecen su sobrevivencia dentro de su huésped.

1.2.2.1. Parásitos adultos o tenias (Fig 2). Como ya fue indicado, la fase adulta de *T. solium*, habita de manera natural en el intestino del ser humano y llega a alcanzar entre 1.5 a 8 metros de longitud. En el extremo anterior del parásito se encuentra el escólex o cabeza (aproximadamente 1 mm de diámetro) en el cual está incluido el rostelo armado con una doble corona de ganchos grandes y pequeños (22-36 ganchos) y 4 ventosas. Estas últimas estructuras son las que le permiten al parásito el mantenerse fijado a la pared del yeyuno. Posterior al escólex se encuentra el cuello, a partir del cual se inicia la segmentación del parásito y de ella es originada la cadena estrobilar o estróbilo. A su vez el estróbilo se encuentra segmentado por unidades denominadas proglótidos, los cuales dependiendo de su lejanía del escólex, cambian de tamaño y generan tres diferentes tipos: los proglótidos inmaduros, los maduros y los grávidos. Esta división de los proglótidos está basada en la evolución de sus órganos reproductores, por lo que hay proglótidos inmaduros en los cuales sus órganos reproductores son afuncionales o inexistentes y los maduros en los que sus órganos reproductores son funcionales, ya que se considera que su reproducción es una unidad reproductora independiente porque posee órganos genitales masculinos y femeninos. Un proglótido grávido es semejante a un saco lleno de huevos (número aproximado de 30 000 a 50 000)^{22, 79, 7, 80}.

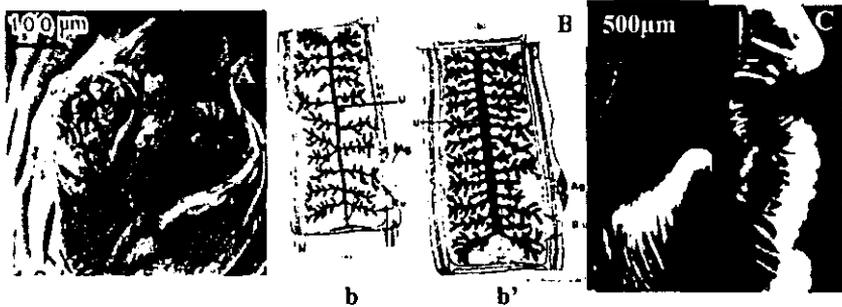


Figura .2. Parásitos adultos o tenias. Se muestran dos perspectivas obtenidas de microscopía de barrido del escólex de *Taenia solium*: A y C (Cañedo L; Lacleite JP *et al*, 1982). A) Aproximación al escólex donde puede verse 3 de sus 4 ventosas y al centro, la doble corona de ganchos. B) Proglótidos grávidos de *T. solium* (b) y *T. saginata* (b') (Aluja A, Flisser A, *et al*, 1987). C) Escólex evaginado.

1.2.2.2. Metacéstodo o cisticercos (Fig 3). Como ya fue indicado, esta fase parasitaria puede presentar una localización en cualquier tejido del organismo animal, como en el caso de los cerdos ^{64, 91}, aunque tiene mayor importancia en salud pública cuando afecta a seres humanos ya que su principal localización es a nivel del sistema nervioso central ^{63, 92}. Los cisticercos pueden presentar diferencias dependiendo del sitio en donde sean encontrados, por ejemplo; a nivel cerebral pueden encontrarse formas denominadas de racemoso o celuloso, a nivel de músculo su tamaño puede variar de 0.5 a 2 cm, mientras que en el ojo se le puede encontrar incluso evaginando ²⁴.



Figura. 3. Metacéstodo o cisticercos. Cisticercos. A) Masa muscular de cerdo con cisticercosis. B) Cisticercos recuperados de la carne infectada (M en C. Guillermina Ávila).

1.2.2.3. Huevo (Fig 4). Los huevos de la *T. solium* (aproximadamente de 30 μm de diámetro) se encuentran rodeados por una capa celular llamada vitelo de la que obtienen nutrientes. Este vitelo rodea al embrióforo, formado por bloques de queratina también llamados bloques embriofóricos los cuales se encuentran unidos entre sí por la proteína cementante y mas adentro se encuentra la membrana oncosferal que cubre a la oncósfera o embrión hexacanto. Estas características morfológicas favorecen en los huevos una resistencia tal, que dentro o fuera de los proglótidos, se mantienen viables por semanas o meses en suelos húmedos y sombreados ^{44, 26}.

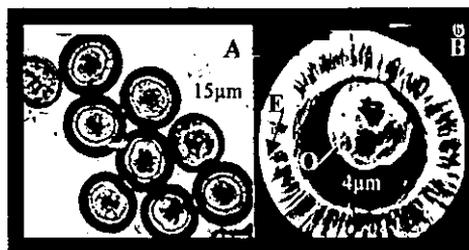


Figura. 4. Huevos de *T. solium*: A) Vistos mediante microscopio de luz. B) Microscopía electrónica de barrido de una oncosfera (O) de *T. solium* rodeada de embrióforo (E) (Laclette *et al*, 1982).

1. 3. Biología de celular .

Poco ha sido estudiado en relación a proteínas características del citoesqueleto de estos parásitos; sin embargo, los estudios que se han hecho con alguna de ellas dan alguna idea de su constitución e importancia. Estas proteínas son la paramiosina o antígeno B y la miosina convencional o tipo II.

1.3.1. Paramiosina.

Esta proteína es semejante a la miosina en lo relativo a su distribución conformacional y está formada por dos subunidades; cada una de ellas, a su vez, está formada por dos porciones: la amino y la carboxilo terminales. Sin embargo, a pesar de su semejanza con las miosinas, la paramiosina no tiene actividad de ATPasa y no interactúa con la actina. Es una proteína filamentosa en alfa-hélice, de PM aproximado a 220 kDa en su forma dimérica, insoluble en agua y normalmente se le encuentra como una proteína estructural del músculo de invertebrados^{10, 19}, en donde se encuentra formando parte del corazón de filamentos gruesos en donde interacciona directamente con las moléculas de miosina²⁰. Su participación, en los organismos marinos estudiados, muestra que actúan dentro de un sistema de control muscular en donde no se requiere de mucha cantidad de energía y tanto en moluscos como en anélidos se le encuentra en mayores cantidades. Gracias a estas características de la paramiosina de estos organismos, se logra mantener la tensión muscular por períodos prolongados de tiempo en el medio en el que se encuentren^{19, 49}. Como ya fue indicado, aparte de su participación en mecanismos de contracción, la paramiosina es una proteína antigénica reconocida por la mayoría de los sueros de pacientes con neurocisticercosis y de cerdos infectados²⁵, por lo que se le conoce como AgB en metacéstodos de *T.solium*³⁰. Aparentemente, dado que esta proteína es secretada ello podría tener importancia dentro de la relación huésped-parásito, ya que es capaz de controlar fenómenos inmunológicos en su

contra tales como el abatimiento de la reacción del complemento ^{45, 41}.

1.3.2. Miosina

Esta es una proteína, que a pesar de ser conservada entre las especies, presenta regiones intramoleculares específicas. Es de las proteínas del citoesqueleto mas ampliamente estudiadas y conocidas y, que se sabe, funcionan como el principal motor molecular en fenómenos relacionados con contracción muscular o movimiento celular ^{16, 60, 83}. Las variaciones dentro de estas proteínas son específicas dependiendo del sitio, el tiempo, y la función biológica a la cual se dediquen ^{21, 39}. La constitución de las miosinas (musculares y no musculares) muestra que ellas están formadas por dímeros de cadenas pesadas o monómeros, y que a su vez, cada monómero está constituido de una porción globular y una filamentosa (Fig. 5). Es a nivel de la porción filamentosa mediante la cual se unen los monómeros (PM = 205 kDa) y forman el dímero y a su vez el dímero formado genera a la miosina nativa (> 400 kDa). Cada monómero presenta una región globular compuesta de aproximadamente 850 AA's. Algunos de estos aminoácidos están asociados con la cadena ligera correspondiente y otros forman parte de los sitios de interacción con actina y de actividad de ATPasa ⁶².

Estudios recientes, relacionados con la caracterización parcial de miosina de *T. solium* durante la caracterización inmunoquímica de los AcM 4B3 ^{3, 13}, han mostrado que esta proteína podría tener una distribución muscular diferente dependiendo del estadio parasitario, presenta diferentes determinantes antigénicos comparada con miosinas de otros ténidos y posiblemente interaccione con diferente actividad de ATPasa dependiendo de las actinas a las que sean enfrentadas (Cruz M. Comunicación personal). Posiblemente la interacción actina-miosina en parásitos de *T. solium*, tendrían que estar asociados con los aspectos fisiológicos de los parásitos durante las infecciones.

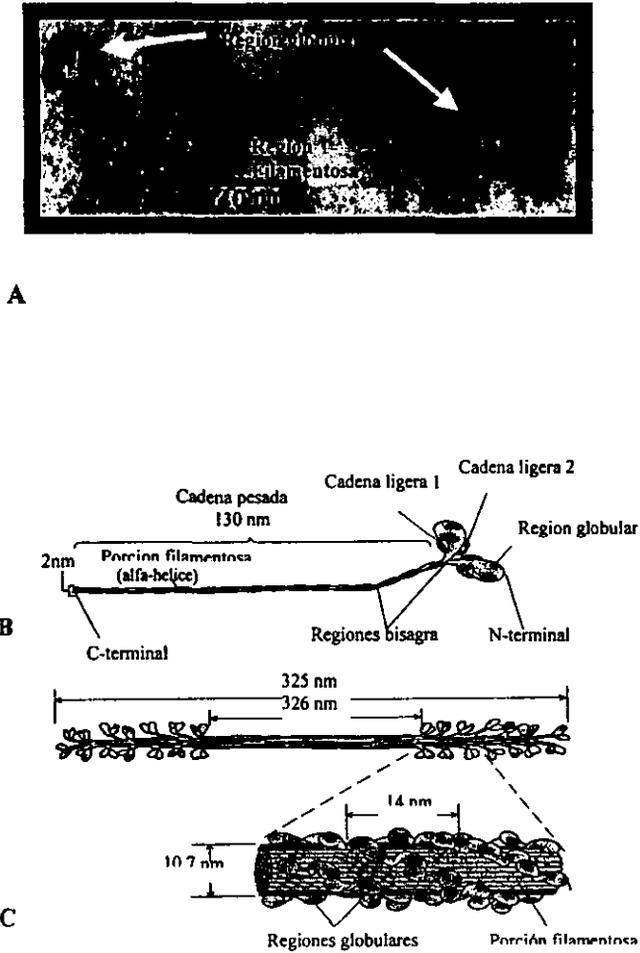


Figura 5. Estructura molecular de miosina. A) Miosina de *T. Solium* vista por microscopia electrónica de transmisión (Ambrosio *et al*, 1997). B) Diagrama esquemático de miosina. C) Formación de filamento bipolar (Darnell, 1990).

1. 3. 3. Importancia de las proteínas del citoesqueleto.

En el caso de la paramiosina de cisticercos a parte de su purificación, se ha logrado la determinación de su secuencia de aminoácidos, a demás de la producción de proteínas recombinantes ^{44, 45, 48}.

Muy recientemente, en el caso de miosina muscular, se han iniciado estudios de carácter inmunoquímico y bioquímico tendientes a lograr una caracterización molecular de ella ³. Según los resultados obtenidos, el papel de estas proteínas del citoesqueleto, no sólo podría estar circunscrito a su participación en fenómenos de movimientos musculares, sino que aparentemente ellas también podrían participar en el contexto de la relación huésped-parásito. P. Ej. A la paramiosina se le han atribuido actividades relacionadas con el control de la respuesta inmune ⁴⁸, mientras que la presencia de la miosina de estos parásitos presente en la materia fecal de los animales infectados representa una incógnita aún sin aclarar ³.

Posiblemente, la forma de distribución o el tipo de componentes del citoesqueleto tengan que estar asociados con fenómenos importantes para la sobrevivencia y parasitismo de los cisticercos. Por ejemplo, podría haber una cierta distribución o cierta composición definida de actina y miosina de acuerdo con la evaginación de los cisticercos, con la fijación y la estabilización de los parásitos adultos frente a los movimientos intestinales en la mucosa intestinal y así mismo, con el movimiento de proglótidos y con la subsecuente liberación de huevos ^{50, 77}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La miosina es una molécula que está presente en todas las células eucarióticas que conforman nuestro organismo y es constitutiva del músculo, se han descrito dos tipos : Miosina I, de bajo peso molecular (111-128 kDa) asociada principalmente a membranas y al transporte , la Miosina II, proteína dimérica de alto peso molecular (440 kDa) , la cual contiene 2 cadenas pesadas (200 kDa) y dos cadenas ligeras (17-22 kDa). Ambos tipos de miosina, tienen 2 actividades biológicas importantes : 1) Tiene actividad de ATPasa que en el caso de miosina II sirve para generar energía libre para la contracción muscular y 2) Se une a la forma polimerizada de la actina. La miosina tipo II se ensambla espontáneamente en filamentos y puede ser fragmentada de forma controlada por algunas enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina y papaína)^{16, 67, 81 y 86} y gracias a ello puede hacerse estudios de cada porción de la proteína.

A pesar de que la miosina es una proteína muy conservada, se ha demostrado que dentro de la molécula, existen regiones protéicas variables que diferencian a una miosina de otra, de igual manera también existe diferencias de miosinas entre diferentes especies y tejidos, lo que provoca cambios en las propiedades principalmente bioquímicas de este tipo de miosinas⁸¹. Por otra parte también existen, isoformas de una sola miosina que son expresadas dependiendo de la etapa de desarrollo, del estado fisiológico de los tejidos y de su localización^{39, 40}. Las diferencias mencionadas que aparecen entre las miosinas se ha encontrado tanto a nivel de la porción globular³⁹ como en el filamento enrollado (cadenas pesadas de miosina enredadas en super hélice).

En parásitos, la miosina parece tener un papel importante en la relación huésped-parásito. Se ha visto que es altamente inmunogénica ya que en el caso de filariosis⁶¹ luego de tratamientos quimioterapéuticos, se encuentran aumento en los títulos de anticuerpos séricos antimiosina y ello podría tener relación con la destrucción del parásito.

La detección de determinados tipos de miosina en fluidos biológicos de personas ha abierto una nueva estrategia en diagnóstico. Actualmente se han implementado métodos basados en la captura de miosina por anticuerpos monoclonales, para el diagnóstico de problemas cardíacos^{34, 35} y aparentemente estos métodos son específicos y sensibles.

Estudios previos al proyecto de tesis realizados para la caracterización del reconocimiento de anticuerpos monoclonales hacia dos estadios parasitarios de *T. solium*, han demostrado que uno de ellos, el AcM 4B3, tiene reconocimiento hacia una proteína muscular, que por su peso molecular, distribución y ultraestructura sugiere ser una miosina de tipo II, además la distribución de las fibras reconocidas por el AcM 4B3 es diferente de un estadio parasitario a otro y, por métodos inmunoenzimáticos, se ha logrado detectar la liberación de miosina en las heces de hámsteres infectados³. Estos resultados indican la posibilidad de detectar esta proteína muscular y emplearla como un marcador de infección de parásitos taénidos y en el caso de taeniosis por *T. Solium*, podría apoyar en el establecimiento de un método diagnóstico que esté basado en la detección de esta proteína muscular, en fluidos de humanos infectados naturalmente, además, ello permitiría estudiar y definir tanto el tipo como las características de la miosina liberada por los parásitos para determinar en que región proteica radica la diferencia con las miosinas de otros parásitos relacionados.

3. 1. OBJETIVOS

- Identificar mediante métodos bioquímicos e inmunoquímicos, a la miosina de cisticercos de *Taenia solium*.
- Purificar y evaluar la purificación de la miosina de cisticercos mediante métodos convencionales.
- Determinar y demostrar si el anticuerpo monoclonal antimiosina de parásitos adultos de *Taenia solium* reconoce también a la miosina purificada de cisticercos.
- Determinar y demostrar si los anticuerpos policlonales antimiosina del metacéstodo de *Taenia solium* reconoce también a la miosina purificada de cisticercos.
- Determinar el patrón de reconocimiento hacia la miosina purificada de cisticercos por inmunoprecipitación, dado por los anticuerpos antimiosina empleados.
- Determinar el reconocimiento de la miosina purificada de cisticercos en función de la captura de la misma por actina.
- Detectar la miosina contenida en suero de humano infectado naturalmente a partir del reconocimiento dado por los anticuerpos antimiosina hacia la interacción actina-miosina formada.
- Detectar anticuerpos antimiosina contenidos en sueros de personas infectadas naturalmente.

3. 2. HIPOTESIS

Tal vez la caracterización parcial de la miosina del metacestodo de *T.solium* se logre aplicando las técnicas bioquímicas e inmunoquímicas, utilizadas para su caracterización en el parásito adulto, ya que podrían ser miosinas semejantes.

MATERIALES Y METODOS.

4.1. Diseño de investigación.

4.1.1. Tipo de estudio

Experimental (prospectivo, longitudinal, experimental, comparativo).

4.1.2. Población.

- * Cisticercos.
- * Miosina de cisticercos.
- * Anticuerpos policlonales (sueros hiperinmunes) y monoclonales (sobrenadante de cultivo celular).
- * Sueros de pacientes infectados con neurocisticercosis.

4.1.3. Criterios de inclusión.

- * Cisticercos procedentes de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente.
- * Sueros de personas no infectadas e infectadas de cisticercosis y/o neurocisticercosis.
- * Anticuerpos policlonales y monoclonales antimiosina.

4.1.4. Variables.

Dependiente: Extracción y purificación de miosina de cisticercos de *T. solium*.

Independiente: Presencia de miosina y sus posibles isoformas.

4. 2. Materiales, reactivos y equipo.

Materiales	Reactivos
Bisturí con navaja.	Cloruro de sodio
Pinza de disección.	EDTA

Materiales	Reactivos
Tubos de ensayo	PMCB
Botellas para cultivo.	PMSF
Placas para ELISA.	Cloruro de potasio
Vasos de precipitado.	Nitrato de plata
Pipetas graduadas.	DTT
Pipetas estériles.	Coomassie
Balanzas granataria, semianalítica y analítica.	Ácido cítrico
Centrifugas y microcentrifugas.	Citrato de sodio
Jeringas de 3, 5, 10, 20 y 50 ml.	DAB
Filtros 0.22 uM	OPD
Micropipetas 0.1- 1000 µL. (Labsystems)	Ácido tricloroacético
Placas de 6, 24 y 48 pozos.	Medio de cultivo RPMI
Papel de nitrocelulosa.	Ácido acético
Membranas de PVDF.	Anticuerpos comerciales conjugados a peroxidasa

Equipo :

- | | |
|--|---------------------------------|
| * Polytron. | * Lector de ELISA (Bio-Rad). |
| * Cámara de electroforesis (HOEFER). | * Fuente de poder (GIBCO). |
| * Cámara para electrotransferencia (HOEFER). | * Microcentrifuga (EPPENDORF). |
| * Cámara para geles agarosa (HOEFER). | * Microscopio invertido. |
| * Incubadora con control de CO ₂ (5%),
humedad relativa (95% de aire)
y temperatura (37°C). | * Equipo de dot-blot (Bio-Rad). |
| * Equipo de fotografía (Nikon,Cannon). | * Campana de flujo laminar. |
| | * Computadora |
| | * Escaner (Epson). |

4. 3. Técnicas.

El fundamento y aspectos técnicos detallados de cada técnica son presentados en la parte correspondiente del apéndice de éste trabajo escrito, aquí sólo serán mencionados los aspectos más relacionados con el estudio de la miosina.

4. 3. 1. Producción de anticuerpos monoclonales 4B3.

Las clonas productoras de los anticuerpos monoclonales 4B3 (AcM 4B3) fueron producidas por el Dr. J. Allan de la Universidad de Salford Inglaterra y mediante un convenio de colaboración apoyado por la Comisión Europea de Naciones (No.13014170151214), los anticuerpos fueron caracterizados dentro del grupo de la Dra. Ana Flisser en la Facultad de Medicina de la UNAM. Los hibridomas manejados en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar fueron crecidos y propagados bajo condiciones definidas (37° C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% aire y 5% de CO₂). Las células fueron mantenidas *in vitro* empleando medio de cultivo RPMI 1640 complementado (SFB al 10%, 100 U/ml de penicilina G sódica, 100µg/mL de estreptomicina y L-glutamina 200mM). Cuando las condiciones de pH del medio generaban un cambio de vire de rojo a amarillo, el medio de cultivo era cambiado por uno nuevo. En caso de que los cultivos se encontraran confluentes, las células eran sembradas en cajas nuevas o sometidas a tratamientos con dimetil sulfóxido para su congelación en Nitrógeno líquido. Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas recuperados fueron considerados como fuentes de AcM 4B3 producido y estos mismos sobrenadantes fueron utilizados en todos los ensayos en que se requirieron los AcM. La evaluación de la actividad de los AcM 4B3 se hizo mediante ensayos en inmunopunto empleando miosina purificada en KCl 0.6 M y con extractos parasitarios como antígenos, como anticuerpos secundarios fueron empleados anticuerpos antiratón conjugados a peroxidasa y DAB como

sustrato (ver descripción del proceso mas adelante). Cuando los sobrenadantes conteniendo los AcM 4B3 no fueron utilizados, estos fueron congelados a -20°C hasta su uso.

4.3.2. Recuperación de cisticercos de *Taenia solium*.

Los parásitos fueron recuperados desde músculo de cerdos infectados de forma natural, una vez obtenidos los parásitos estos fueron divididos en tres partes una de ellas se utilizó para determinar su viabilidad en presencia de bilis al 25% en medio de cultivo RPMI (37°C , 30 min) otra para infectar hámsteres y lograr la recuperación de parásitos adultos ^{1,3}, la última parte fue empleada para la extracción de miosina ³, en este último caso los parásitos fueron previamente lavados tres veces con solución salina amortiguada con fosfatos $\text{pH}=7.2$ (SSAF) para eliminar restos del tejido del huésped.

4.3.3. Diagrama de flujo general para la obtención, análisis y evaluación de miosina de cisticercos de *Taenia solium*.

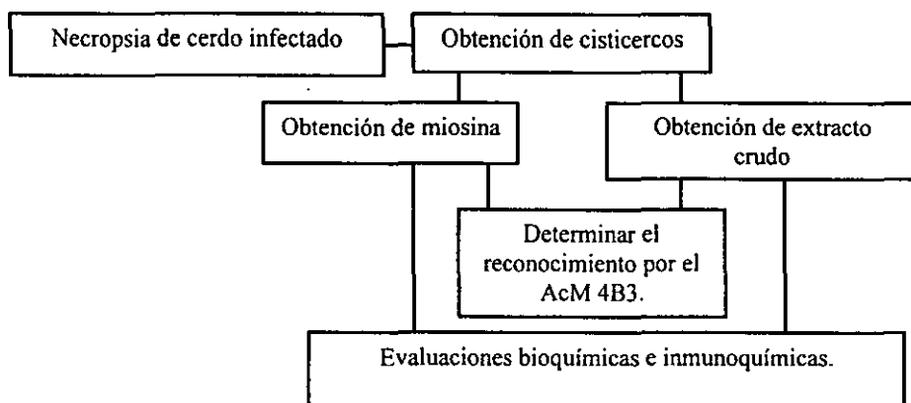


Figura 6. Diagrama de flujo general para la obtención, análisis y evaluación de miosina de cisticercos de *Taenia solium*.

4.3.4. Preparación de extractos crudos de parásitos.

Luego del lavado de los cisticercos fueron homogeneizados con un polytrón (Brinkman Instruments) en presencia de NaCl 0.2 M y un coctel de inhibidores de proteasas (*p*-hidroximercuribenzoato 1.1 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 3.4 mM, ácido etilenediaminotetraacético 2.5 mM). Luego de la homogenización, la suspensión fue colocada en extracción de toda la noche con agitación constante a 4°C. Luego, el homogeneizado fue centrifugado (2000 g, 4°C, 30 min) y el sedimento fue resuspendido con KCl 0.3M en presencia de inhibidores de proteasas como ya fue indicado. Nuevamente, el homogeneizado fue centrifugado bajo las condiciones anteriormente descritas. En todos los casos, luego de esta última centrifugación, los sobrenadantes fueron considerados como antígenos de los parásitos²⁸ y se les determinó su concentración de proteína mediante el micrométodo de Bradford y las alícuotas resultantes fueron almacenadas a -20°C hasta su empleo.

4.3.5. Preparación y purificación de miosinas de parásitos.

Para este proceso se siguió la técnica descrita por Dowben (1969) y Giese (1973), en la que después de que los cisticercos fueron lavados con SSAF, fueron homogeneizados en presencia de una solución de NaCl 0.2 M e inhibidores de proteasas como lo descrito anteriormente para la preparación de extractos crudos. La suspensión resultante, luego de 2 ciclos de homogenización, fue centrifugada (12 000 g, TA, 30 min) y el sobrenadante obtenido fue eliminado, mientras que el sedimento correspondiente a miosina y actina, fue resuspendido mediante agitación en una solución de KCl 0.6 M/SSAF ajustada a un pH de 6.5 en presencia de inhibidores de proteasas. La suspensión resultante fue centrifugada una vez más, bajo las condiciones ya indicadas, y el sobrenadante recuperado fue considerado como el correspondiente a miosina semipurificada.

4.3.5.1. Precipitación en KCl 0.04 M. Con la finalidad de mejorar la purificación de miosina y eliminar proteínas como actina, a la solución de miosina-KCl 0.6 M le fue adicionada agua destilada y desionizada, gota a gota a 4° C, hasta alcanzar una concentración de KCl 0.04 M para lograr la precipitación de los filamentos de miosina. Estos filamentos fueron utilizados para los ensayos que posteriormente serán descritos. En caso de su almacenamiento la proteína fue congelada a -20°C hasta su uso.

4.3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis en geles de poliacrilamida porcentuales fue lograda mediante una corriente administrada por una fuente de poder GIBCO BRL (M250) bajo condiciones de voltaje de 100 v a 4°C. En el caso de mezcla de proteínas se permitieron tiempos de separación de dos horas. En el caso de geles de gradiente se permitieron tiempos de separación de hasta 5 horas (dejando salir 2 pesos moleculares) bajo un voltaje inicial de 150 v y posteriormente a 250 v a 25°C administrado por una fuente de poder HOEFER (PS 250 / 2.5 AMP). Como marcador del corrimiento electroforético se empleó el azul de bromofenol. Los geles obtenidos luego de la separación electroforética fueron procesados para teñir a las proteínas e identificarlas o para transferirlas a PVDF así mismo para recuperar las fracciones seleccionadas.

4.3.5.3. Separación electroforética en geles de poliacrilamida. Los filamentos de miosina, fueron nuevamente solubilizados en KCl 0.6 M y tratados en presencia de Urea 12M, con la finalidad de lograr la separación de las cadenas pesadas y favorecer su separación por electroforesis. Este proceso de separación se aplicó utilizando geles preparativos de poliacrilamida al 5 % (ver apéndice) con la idea de obtener una mejor separación de las proteínas de alto peso molecular. La separación electroforética se indujo bajo condiciones reductoras en presencia de beta-mercapto etanol (0.6μL/30μg proteína) y en condiciones definidas (100 V, TA, 2 h). Luego de concluida la separación electroforética, los geles fueron hechos reaccionar con acetato de sodio 4M ³² con la idea de identificar las fracciones correspondientes a la miosina nativa (> 200 kDa) y a las

cadenas pesadas (200 kDa) y separarlas de los geles. Los segmentos de los geles obtenidos fueron posteriormente procesados para la recuperación de las proteínas contenidas en ellos mediante estrategias de electroelución (ver descripción mas adelante).

4.3.5.4. Recuperación de miosina desde geles de poliacrilamida-BAC.

Otra de las formas de purificación de miosina que se intentaron, correspondió a la separación electroforética de la miosina o sus cadenas pesadas (preparadas como se indicó anteriormente) mediante su corrimiento en geles de poliacrilamida que contenían N,N'-Bis(acryloyl)cystamine (BAC) (Biorad) y acrilamida al 5% ⁵¹ bajo condiciones no reductoras. Concluida la separación electroforética, los geles también fueron tratados con acetato de sodio. Los segmentos de geles fueron tratados, para liberar la proteína que contenían, con una solución de 2-mercaptoetanol (0.2 mL/g de gel) durante 30 min de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las proteínas recuperadas de esta forma, fueron separadas de los restos del gel mediante centrifugación (2000 g, 4° C, 30 min) y se les hizo una determinación de su contenido de proteínas mediante el micrométodo de Bradford comercial. La evaluación del grado de purificación de las miosinas obtenidas fue realizado mediante GELPOLI bajo condiciones reductoras y tinciones con azul de Coomassie y/o nitrato de plata (técnicas descritas en el apéndice correspondiente).

4.3.5.5. Recuperación de miosina desde geles de poliacrilamida en gradiente de concentración.

Una opción más para la purificación de miosina, fue la separación de la miosina mediante electroforesis en geles con un gradiente de concentración definido (5 al 22.5%). Los geles preparativos fueron preparados de acuerdo a lo descrito en el apéndice correspondiente. Todos los corrimientos electroforéticos fueron hechos bajo condiciones reductoras en presencia de condiciones definidas (200 v, 5h). Una vez que la electroforesis fue concluida, los geles fueron teñidos con acetato de sodio para separar los segmentos de gel que contenían miosina, la cual fue recuperada posteriormente

mediante electroelución. Las miosinas, aparentemente puras por el método anteriormente descrito, fueron posteriormente dializadas y cuantificadas en su contenido de proteína..

4.3.5.6. Electroelución de miosina desde geles de poliacrilamida. Para la obtención de la proteína contenida en los geles, se siguió el proceso descrito por Harlow & Lane (1988); El gel conteniendo a la proteína fue colocado en una bolsa de diálisis (Diámetro de corte = PM 6,000-8,000) en presencia de Tris/acetato pH= 7.4 (0.2mM), Duodecil sulfato de sodio al 1.0% y DL-Dithiothreitol 100mM/ 0.1g de poliacrilamida húmeda. Los tubos de diálisis formados fueron colocados en una cámara (HOEFER.MAX Submarine. HE 99) de electroforesis vertical para geles de agarosa y sumergidos en presencia de una solución amortiguadora de Tris/Acetato 50mM. La electroelución de las proteínas desde los geles fue efectuada bajo condiciones definidas (100 v, TA, 3 h). Pasado el tiempo de electroelución, los geles fueron recuperados de la bolsa de diálisis y teñidos con azul de Coomassie para evaluar la presencia de las proteínas contenidas en ellos. Posteriormente, la solución recuperada de la bolsa de diálisis, correspondiente a la proteína electroeluida, fue colocada para diálisis exhaustiva contra SSAF. Luego, a las proteínas dializadas, se les hizo una determinación de su concentración de proteína. La evaluación de la pureza de las proteínas fue seguido mediante GELPOLI, IET, inmunopunto y ELISA.

4.3.5.7. Evaluación. Las proteínas fueron analizadas, luego de su corrimiento en geles de poliacrilamida al 5%, por su tinción con azul de Coomasie. Después de haber sido transferidas a membranas de PVDF, fueron analizadas por su inmunoprecipitación ⁵¹. Además, con la finalidad de monitorear el proceso de purificación de miosina fueron efectuados análisis de inmunopunto ¹⁴ utilizando un anticuerpo primario (antimiosina comercial, monoclonal 4B3, policlonales de anticadena pesada y antimiosina nativa) y uno secundario conjugado a peroxidasa de rábano. Previo a los ensayos, a las miosinas se les determinó su concentración de proteína. Con este material

puro y cuantificado se procedió a realizar las pruebas necesarias para determinar el tipo de proteína en estudio y su actividad biológica ya que a pesar de ser una proteína de alto peso molecular así mismo muy conservada no esta excenta de sufrir desnaturalización o pérdida de los epitopos de reconocimiento para los anticuerpos antimiosina utilizados.

4.3.5.7.1. Electroforesis en geles de gradiente (5-22.5%). En geles de gradiente analíticos se adicionaron 5µg de cada una de las proteínas previamente purificadas y cuantificadas y de esta manera evaluar por la separación electroforética y el número de bandas, la purificación de cada una de las proteínas (miosina nativa y cadena pesada). Como marcador del corrimiento electroforético se empleó el azul de bromofenol y como patrón de referencia miosina semipurificada y pesos moleculares preteñidos. El revelado se realizó a través de una tinción con nitrato de plata (Técnicas).

4.3.5.7.2. Inmunoelectrotransferencia. Ya que en el gel de gradiente la separación electroforética de las fracciones I, II y III de la miosina (bandas de proteínas purificadas y analizadas por separado) presentaron el mismo bandeo, se determinó cual de esas bandas era miosina, por lo que se realizó una inmunoelectrotransferencia ³². Se colocaron las muestras con coctel (PM, miosina semipurificada con y sin urea 12M, miosina nativa purificada por electroelución) después de la separación electroforética en gel de gradiente se procedió a la electrotransferencia de las proteínas a PVDF, una vez terminada la inmunoelectrotransferencia inició el bloqueo con leche descremada (Sveltes) al 5% para la posterior adición de los anticuerpos primarios (Ac Pol: anti-MN, AcM 4B3 y suero de humano infectado) y como anticuerpos secundarios (anticonejo, antiratón y antihumano todos conjugados a peroxidasa) permitiendo la incubación a 37°C durante 2 h con cada uno. El revelado se llevó a cabo con DAB y H₂O₂.

4.3.6. Determinación del reconocimiento a miosina purificada.

Para esta evaluación fueron aplicados ensayos inmunoenzimáticos en placas con micropozos de poliestireno (MaxiSorp, NUNC). Para todos los casos fue empleado un sistema de captura mediante actina purificada de parásitos (250ng/pozo) disuelta en Tris-HCl y adsorbida bajo condiciones definidas (a 37°C durante 2h o a 4°C toda la noche). El bloqueo de sitios de reacción inespecífica se hizo mediante la adición de 100µL de leche descremada al 5% en SSAF-Tween. Luego, a la miosina capturada se le hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal (AcM) 4B3, así como con los anticuerpos policlonales antimiosina nativa y anticadena pesada (anticuerpos primarios). Los anticuerpos monoclonales usados fueron los contenidos en sobrenadantes de cultivo del hibridoma 4B3 y los anticuerpos policlonales, fueron los contenidos en sueros hiperinmunes de conejos inmunizados con miosina nativa o cadena pesada respectivamente. Tanto la actina, como los anticuerpos utilizados en el presente estudio, fueron producidos en el laboratorio como parte del proyecto global de la caracterización molecular de la miosina de *T. solium*. Como anticuerpos secundarios, fueron utilizados anticuerpos comerciales anti-IgG conjugados a peroxidasa. El revelado de las reacciones enzimáticas se realizó en presencia de orto-fenilendiamina y H₂O₂.

4.3.6.1. Captura de miosina por actina. Con base a evaluaciones previas en el proyecto global, relacionadas con la cantidad de miosina exógena atrapada por actina, se decidió emplear una concentración de miosina exógena de 80 ng. Las miosinas exógenas utilizadas fueron: miosinas no purificadas (NaCl y KCl 0.6M) y purificadas (miosinas nativas obtenidas por precipitación en KCl 0.04M y recuperadas por electroelución; así como cadenas pesadas también recuperadas de electroelución). Estas miosinas fueron hechas interaccionar con 250 ng de actina bajo condiciones definidas (37°C, 1h). Una vez

que se favoreció la interacción actina-miosina esta fue hecha reaccionar con anticuerpos policlonales comerciales o no, sueros de cerdos y personas infectadas como anticuerpos primarios, como anticuerpos secundarios se usaron los anti IgG correspondientes, conjugados a peroxidasa. Los sustratos empleados fueron los mismos previamente descritos.

4.3.6.1.1. Reconocimiento de miosina exógena por anticuerpos policlonales y monoclonales. En estos análisis fueron empleados sueros de conejos inmunizados con miosina nativa continuando con la reacción de captura de miosina por actina fueron adicionados 100µl de los anticuerpos AcM 4B3, anti-MN(1:1000), anti-CP(1:1000) y anti-Actina (1:1000) permitiendo la reacción de los mismos con la miosina a 37 °C durante 1h para finalmente adicionar 100µL de los anticuerpos conjugados a peroxidasa (antiratón, anticonejo y antihámster); (1:1000) (37°C, 2 h). El revelado de las reacciones se realizó con OFD (ver apéndice). Pasado el tiempo de reacción esta fue detenida por adición de 100µL de ácido sulfúrico 2N. La reacción colorida obtenida fue medida por su absorbancia ($\lambda=492\text{nm}$).

4.3.6.1.2. Reconocimiento de miosina exógena por suero de humano sano y de infectado. El ensayo fue realizado con las muestras séricas recuperadas de infecciones naturales, estas muestras fueron enfrentadas contra miosinas purificadas y no purificadas como ya se mencionó anteriormente para la captura de miosina por actina. Para los ensayos fueron probados 100µL de los sueros (1:100) permitiendo la interacción de los anticuerpos contra la miosina (37°C, 1h) luego fueron adicionados 100µL de los (anti IgG de humano) anticuerpos conjugados a peroxidasa (1:1000) y se permitió su interacción (37°C, 2h). El revelado de la reacción enzimática se realizó con OFD (ver apéndice).

Los estudios fueron llevados a cabo con sueros recuperados de pacientes infectados con neurocisticercosis que acuden de forma regular al diagnóstico inmunológico de

neurocisticercosis que se aplica en el laboratorio. Estas personas son canalizadas desde instituciones de salud con las que se tiene un convenio para este tipo de análisis. Una vez en el laboratorio, a las personas se les hace una punción venosa para la obtención de sangre, a la cual se le permite coagular y recuperar el suero. El suero obtenido es considerado como fuente de anticuerpos anticisticercos. Los estudios inmunológicos que se aplican en el laboratorio están basados en el reconocimiento de los anticuerpos anticisticercos hacia glicoproteínas purificadas por cromatografía de afinidad. El reconocimiento de una o siete glicoproteínas es considerado como signo de que la persona está infectada con los parásitos, además, en las instituciones de salud donde han sido tratadas se han hecho otras pruebas confirmatorias de la enfermedad y en su conjunto, los análisis de laboratorio y de gabinete permiten determinar si el paciente está infectado y a que nivel. Los sueros de los pacientes utilizados en los estudios presentes correspondieron a personas diagnosticadas como positivas a la enfermedad parasitaria.

4.3.6.1.3. Detección de miosina liberada de suero de humanos por tratamiento con ácido tricloroacético. Considerando que la miosina de cisticercos sería encontrada en los sueros en forma de complejo inmune con anticuerpos antimiosina, los sueros fueron o no tratados con ATAcO al 2%. En caso de sueros no tratados, éstos fueron disueltos en SSAF-tween en un volumen igual al utilizado para los sueros tratados.

Luego de los tratamientos, los sueros fueron puestos a reaccionar con actina adsorbida a los micropozos, tal y como ya ha sido descrito anteriormente en el caso de los sueros policlonales y monoclonales.

Como controles de los ensayos fueron empleados sueros de personas sanas mezclados con miosina adicionada exógenamente, así como sueros de estas mismas personas únicamente tratadas con ATAcO como ya fue descrito anteriormente.

4.3.6.2. Detección de anticuerpos antimiosina contenidos en sueros de personas infectadas naturalmente. La evaluación de la presencia de anticuerpos antimiosina incluyó el empleo de miosina purificada por KCl y electroelución como ya fue descrito. Luego de que las fracciones protéicas fueron transferidas a membranas de PVDF bajo condiciones definidas (10°C, 100v, 90 min.) las membranas fueron cortadas y bloqueadas con leche al 5%/SSAF-Tween para posteriormente hacerlas reaccionar con posibles anticuerpos antimiosina contenidos en los sueros (1:100) de humano como controles positivos de la reacción fueron empleados los diferentes anticuerpos antimiosina preparados en el laboratorio, tales como: los policlonales antimiosina (1:1000) y el monoclonal 4B3 (sobrenadante de cultivo celular), los cuales fueron hechos interaccionar con la miosina (25°C, 2h) y luego la detección se hizo por adición de los anticuerpos secundarios (antihumano: 1:500, antiratón, antihámster, anticerdo y anticonejo 1:1000) conjugados a peroxidasa. El revelado se llevó a cabo con DAB y H₂O₂.

RESULTADOS

5. 1. Reconocimiento de los AcM 4B3 hacia extractos crudos de parasitos.

Con los sobrenadantes de cultivo de hibridomas, que contenían a los anticuerpos monoclonales, se evaluó el reconocimiento de ellos hacia los antígenos adsorbidos a membranas de nitrocelulosa. En el caso de la caracterización de la miosina, se emplearon aquellos sobrenadantes que reaccionaron mejor durante el reconocimiento hacia los antígenos mencionados y para ello fue evaluado previamente que los AcM 4B3 mantuvieran su reconocimiento hacia extractos crudos parasitarios (Fig. 7).



Figura 7. Reconocimiento inmunológico de los AcM 4B3 hacia extractos crudos de parásitos. Para estos ensayos fueron empleados como antígenos los extractos totales de metacéstodos y como fuente de AcM los sobrenadantes de cultivo del hibridoma 4B3. Los antígenos (0.66 mg/mL) fueron adsorbidos en membranas de nitrocelulosa, posteriormente la membrana fue bloqueada mediante SSAF-Tween 20. Luego del bloqueo, los antígenos fueron hechos reaccionar con los anticuerpos primarios (sobrenadantes de cultivo) y los secundarios (anticuerpos antiratón conjugados a peroxidasa, 1:1000). El revelado de la reacción enzimática se hizo empleando como sustrato a la DAB en presencia de H₂O₂ al 30%. En estos experimentos se evaluó el reconocimiento de AcM 4B3 anteriormente producidos para caracterización de los mismos y este reconocimiento fue comparado con lo obtenidos para AcM 4B3 recientemente preparados. Sobrenadantes de cultivo preparados recientemente (1), preparados durante su caracterización inmunoquímica (2) y sobrenadante de cultivo de células del mieloma X63/Ag8653 (AG8).

5. 2. Preparación y purificación de miosinas de cisticercos.

Debido a que en otros estudios se demostró que el antígeno reconocido por los AcM 4B3 era miosina, sólo que esta miosina provenía de parásitos adultos de *T. Solium*³, se consideró pertinente hacer purificaciones de miosinas de metacéstodos empleando la estrategia que ya había sido utilizada. Los resultados que se obtuvieron mostraron que la miosina aislada de cisticercos, independientemente del proceso de la purificación, reaccionaba siempre con los AcM 4B3 (Fig 2); Sin embargo, aparentemente la purificación de miosina precipitada por KCl 0.04 M genera mejor reactividad de los AcM 4B3 (Fig. 8).

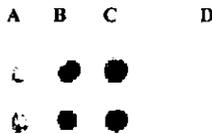


Figura 8. Reconocimiento del AcM 4B3 hacia miosina purificada. Se evaluó el reconocimiento de los sobrenadantes de cultivo del hibridoma 4B3 hacia diferentes procesos de purificación de la miosina de cisticercos de *T. solium*. Alicuotas recuperadas (5 μ L) de cada paso del proceso de purificación fueron adsorbidas a membranas de nitrocelulosa y hechas reaccionar como fue descrito en materiales y métodos. La concentración de proteína, medida en cada alicuota analizada correspondió a 5 μ g/ μ L. NaCl 0.2M (A), KCl 0.6M (B), KCl 0.04M (C) y extracto total de parásito (evaluado en la fig 1) (D).

5.2.1. Evaluación de los filamentos purificados de miosina purificados por precipitación en KCl 0.04 M. La evaluación de purificación de la miosina se hizo de acuerdo a dos criterios, por una parte se evaluó su grado de pureza mediante geles de poliacrilamida (Fig. 9a) y por el otro, mediante su reconocimiento por parte de los AcM 4B3 (Fig. 9b).

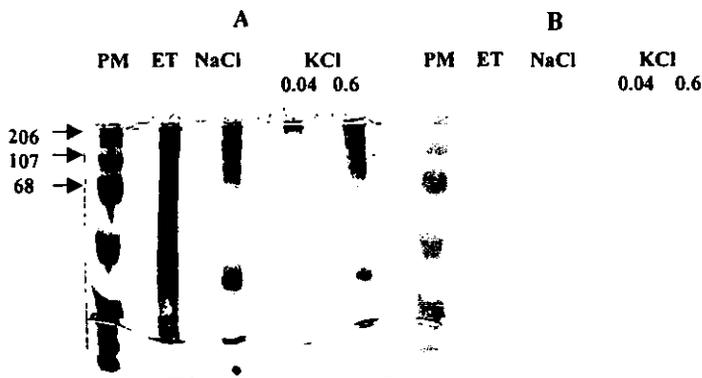


Figura 9. Evaluación de la purificación de miosinas de cisticercos. **A.** Separación electroforética en geles de poliacrilamida. Las proteínas (35 µg/pozo) fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% (100v, 1h, 4°C) bajo condiciones reductoras con 2-B-mercaptoetanol. Posterior al corrimiento, el revelado de las fracciones se hizo mediante su tinción con azul de Coomassie Brillante y desteñido con ácido acético al 10%. **B.** Inmunoelectrotransferencia. Estos análisis fueron hechos en geles paralelos a los teñidos con azul de Coomassie. Luego de la electroforesis, los geles fueron puestos en contacto con membrana de PVDF y sometidas a electrotransferencia (23 V, 12 h, T. A.). Posterior a la transferencia, las membranas fueron tratadas para favorecer el revelado de los antígenos reconocidos por el AcM 4B3. Inicialmente, la membrana fue bloqueada con SSAF-leche e incubada en presencia de sobrenadantes de cultivo de hibridomas (AcM 4B3), así como de anticuerpos policlonales comerciales secundarios (antiIgG de ratón, 1:1000). Para el revelado fue empleada la DAB y el H₂O₂. PM: Pesos moleculares comerciales preteñidos de amplio intervalo, se indican a la cadena pesada de miosina (206 kDa), la fosforilasa B (107 kDa) y albúmina de suero de bovino (68 kDa). ET: Extracto total de cisticercos. NaCl: Primer paso en la purificación de miosina a partir de tejidos parasitarios recuperados en NaCl 0.2M. KCl 0.6: segundo paso de la extracción de miosina en KCl 0.6M y KCl 0.04: tercer y último paso seguido durante la extracción de miosina por precipitación de los filamentos en KCl 0.04M.

5.2.2. Separación electroforética en geles de poliacrilamida. Debido a que el posible aislamiento de las posibles formas de miosina, a partir de los geles de acrilamida mostrados anteriormente, podría dificultarse por la escasa separación de ellas; se consideró pertinente recurrir a la separación de esas posibles formas de miosina mediante el empleo de geles de poliacrilamida menos concentrados (5%), ya que se sabe que estas condiciones de los geles permite una separación mas efectiva de las proteínas de alto peso molecular como es el caso

de las miosinas (Fig. 10). Los resultados obtenidos muestran que hay cierta mejoría en la separación de las formas aunque de forma no completa, aunque posiblemente la alta concentración de sales haya generado alguna alteración en los corrimientos.

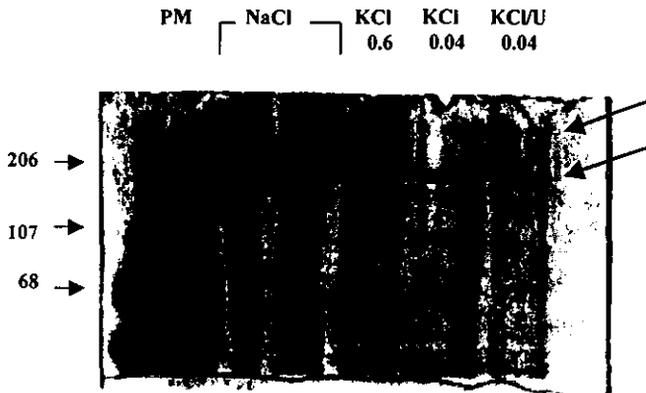


Figura 10. Análisis electroforético de miosina purificada en geles de poliacrilamida al 5%. Las proteínas (35µg/pozo) fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (100v, 1h, 4°C) bajo condiciones reductoras con 2-β-mercaptoetanol y posteriormente los geles fueron teñidos con azul de Coomasie. PM: pesos moleculares comerciales preteñidos de alto peso molecular. NaCl: Primer paso en la purificación de miosina a partir de tejidos parasitarios recuperados en NaCl 0.2M. KCl 0.6: segundo paso de la extracción de miosina en KCl 0.6M y KCl 0.04: tercer y último paso seguido durante la extracción de miosina por precipitación de los filamentos en KCl 0.04M. KCl/U 0.04: Miosina semipurificada por KCl 0.04M analizada en presencia de urea 12M. Luego de la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomasie. Se observa que las muestras contenidas en KCl presentan principalmente a la miosina nativa y a las cadenas pesadas de las mismas (Flechas largas).

5.2.3. Recuperación de miosina desde geles de poliacrilamida. Considerando que con las electroforesis en geles menos concentrados se lograba una mejor separación de las formas de miosina, se estimó oportuno el tratar de recuperar cada forma mediante diferentes estrategias: Una de ellas consistió en la recuperación de las fracciones proteicas desde los geles utilizados

mediante un sistema de electroelución y posterior diálisis de las fracciones para la eliminación de las sales. Este sistema de recuperación de fracciones aparentemente funcionó, las fracciones recuperadas fueron analizadas en su interacción con anticuerpos antimiosina diversos y se observó que las proteínas mantenían su sitio antigenico a pesar del tratamiento. A pesar de estos resultados, el método se consideró que aún no cubría las necesidades para lo planteado en el proyecto, como el hecho de que el rendimiento de las proteínas era bajo y en la recuperación de las proteínas el proceso es laborioso. Estas razones motivaron a evaluar, bajo las condiciones de corrimientos electroforéticos mencionados, la posibilidad de recuperar a las proteínas directamente desde los geles sin necesidad de emplear un sistema de extracción como la electroelución. Este método consistió en la preparación de geles de poliacrilamida en presencia de un análogo de la bisacrilamida (Bis-acrililcistamina: BAC), que también favorece la gelificación de los geles pero por su alto contenido en enlaces disulfuro estos geles pueden ser disueltos, luego de su tratamiento con mercaptoetanol, y con ello se favorece la liberación de las proteínas contenidas en ellos. Los resultados obtenidos con el empleo del gel mencionado, mostraron que bajo las condiciones de separación electroforética empleada, los geles no eran lo suficiente estables durante el proceso y en caso de lograr llegar al final de la corrida, los intentos de revelado con AcONa 4 M no permitían identificar las fracciones correspondientes a miosina nativa y sus cadenas pesadas. Estos problemas, asociados a la solubilización de los geles BAC, hizo que se regresara a la estrategia de recuperar las fracciones proteicas mediante geles de acrilamida comunes y tratamientos con electroelución.

5.2.4. Evaluación. Sin embargo, para favorecer la resolución de los corrimientos electroforéticos, en lugar de emplear geles continuos se procedió a utilizar geles de gradientes de concentración con los que se logró mejorar la resolución de la separación de diferentes fracciones proteicas semejantes en peso a miosina nativa y cadena pesada de miosina (Fig. 11).

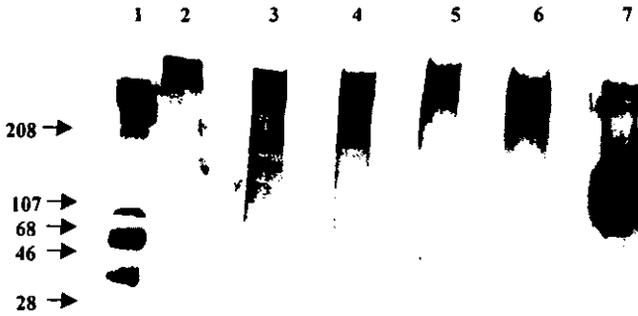


Figura 11. Evaluación de la purificación de miosina en geles de gradiente. Las evaluaciones fueron hechas luego de corrimientos electroforéticos en geles con gradientes de concentración de poliacrilamida (5-22%), bajo condiciones reductoras (5 h, 200 v, TA). Fueron evaluadas miosinas electroeluidas y una no electroeluida (5µg/pozo). Transcurrido el tiempo de corrimiento, los geles obtenidos fueron teñidos con Plata. 1. Pesos moleculares comerciales preteñidos, 2. Miosina semipurificada en KCl 0.04 M, 3. Miosina nativa electroeluida, 4. Cadena pesada electroeluida, 5. Fracción proteica I, 6. Fracción proteica II, 7. Fracción proteica III. Las fracciones proteicas corresponde cada banda separada, aislada y analizada por separado.

5.3. Determinación del reconocimiento de las miosina por anticuerpos antimiosina.

Las miosinas purificadas luego de haber sido transferidas, pudieron ser reconocidas por los diferentes anticuerpos antimiosina empleados (Fig. 12).

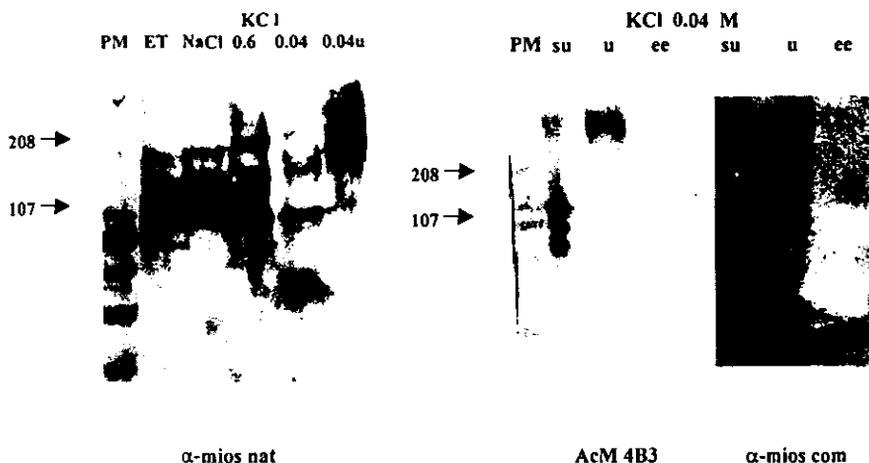


Figura 12. Reconocimiento de miosina por anticuerpos antimiosina. Luego de los corrimientos electroforéticos, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (1 h, 1.5 Amp, 4°C). Para el análisis del reconocimiento fueron empleados diferentes anticuerpos antimiosina: policlonales antimiosina nativa (α -mios nat: 1:1000), monoclonales antimiosina (AcM 4B3, sobrenadante de cultivo celular) y policlonales antimiosina comercial (α -mios com: 1:1000). El revelado de la reacción enzimática, luego de agregar anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, se hizo con DAB y H_2O_2 . En el caso del α -mios nat se muestra el análisis de diferentes etapas de purificación de la miosina. En el caso del AcM 4B3 y α -mios com se muestran miosinas purificadas por KCl 0.04 M analizadas en presencia (u) o en ausencia de urea (su), así como aquellas recuperadas desde electroeluciones (ee). Se indican dos de los 7 marcadores de peso molecular.

Los resultados obtenidos muestran que la miosina nativa y sus cadenas pesadas pueden ser separadas dependiendo de las condiciones que se empleen después de su purificación en KCl 0.04M. La separación de las fracciones proteicas, gracias a los geles con gradientes de acrilamida, permiten la separación individual de las miosinas e incluso, aunque se emplee una posterior electroelución, se logra preservar el sitio de reconocimiento de anticuerpos específicos a miosinas. Aparentemente, según los geles obtenidos es posible identificar al menos dos bandas de alto peso molecular de peso semejante a las cadenas de pesadas de miosina. La evaluación, de las

miosinas tratadas con urea, frente a anticuerpos contenidos en el suero de un individuo infectado con cisticercosis mostró que podría haber reconocimiento hacia la cadena pesada de miosina de cisticercos (dato no mostrado), por lo que se hicieron otras evaluaciones mas al respecto (ver mas adelante).

5.4. Captura de miosina por actina..

Como otra de las formas de evaluar la purificación de miosina, fue el determinar su captura mediante actina purificada tomando como base el hecho de que la miosina interactúa específicamente con la actina.

5.4.1. Reconocimiento anticuerpos monoclonales 4B3. Los resultados mostraron que independientemente de la forma de purificación de la miosina, esta podía ser capturada y detectada por su reactividad frente a los anticuerpos monoclonales. Aparentemente, según lo muestran los resultados, el proceso de electroelución permite una mejor reacción entre los anticuerpos y la miosina en su forma nativa o de cadena pesada. Estos resultados muestran que posiblemente el método de purificación permita "limpiar" mejor a las miosinas para que sean reconocidas por los anticuerpos (Fig. 13).

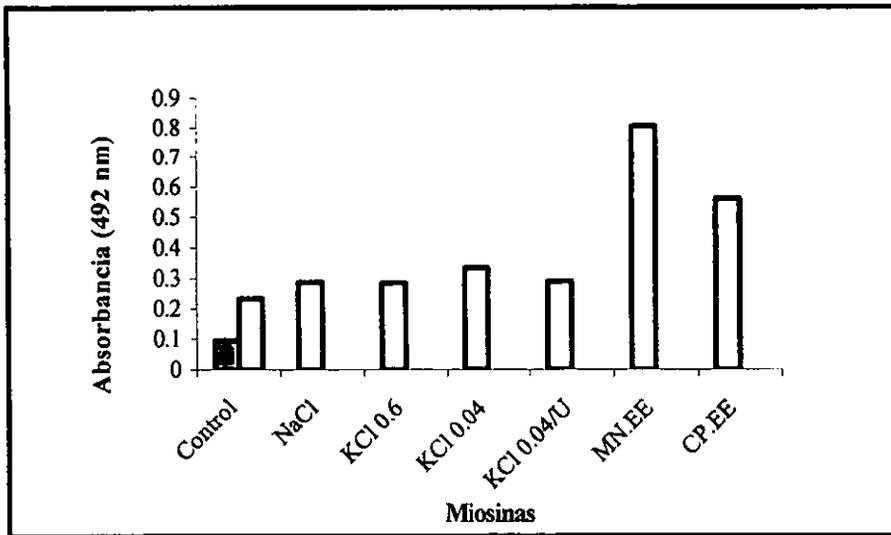


Figura 13. Reconocimiento de miosina por anticuerpos monoclonales 4B3. Diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de miosina fueron evaluadas (barras blancas) (80 ng/pozo) utilizando como agente de captura actina purificada de parásitos (250ng/pozo). Para el revelado, se usaron sobrenadantes de hibridomas que contenían los anticuerpos monoclonales 4B3 y anticuerpos secundarios antiIgG de ratón comerciales conjugados a peroxidasa. Como sustrato se utilizó OFD (4mg/10ml) con H₂O₂ al 30%. Las lecturas de la reacción enzimática se hicieron a 492 nm. NaCl, KCl 0.6, KCl 0.04 y KCl 0.04 /U corresponden a diferentes niveles de purificación de qqqmiosina. MN-EE y CP-EE corresponden a miosina o su cadena pesada purificadas y recuperadas desde los geles de poliacrilamida mediante electroelución. La diferencia entre KCl 0.04 y KCl 0.04 /U se basa en el análisis de la miosina en ausencia (KCl 0.04) o en presencia de Urea 12M (KCl 0.04 /U). Como controles de los ensayos (control) se hicieron ensayos en ausencia (barra gris) del AcM 4B3 y en ausencia de miosina (barra blanca).

De acuerdo a estos resultados se observa que, a pesar de la electroelución, el proceso de purificación completo no genera algún cambio en los epítomos de las proteínas en estudio. El análisis de las mismas proteínas purificadas y electroeluidas, en presencia de anticuerpos policlonales antimiosina nativa o anticadena pesada, no pudo ser llevado a cabo debido a la alta reacción inespecífica (Datos no mostrados).

5.4.2. Reconocimiento de miosina por suero de humano sano e infectado. Con la idea de intentar evaluar, a las mismas miosinas, con sueros de humanos infectados con cisticercosis, se hicieron ensayos de ELISA semejantes a los descritos usando a la actina como agente de captura. Los resultados preliminares obtenidos mostraron que, posiblemente los sueros de las personas infectadas contengan anticuerpos que reconozcan a las diferentes formas de miosinas purificadas (Fig. 14).

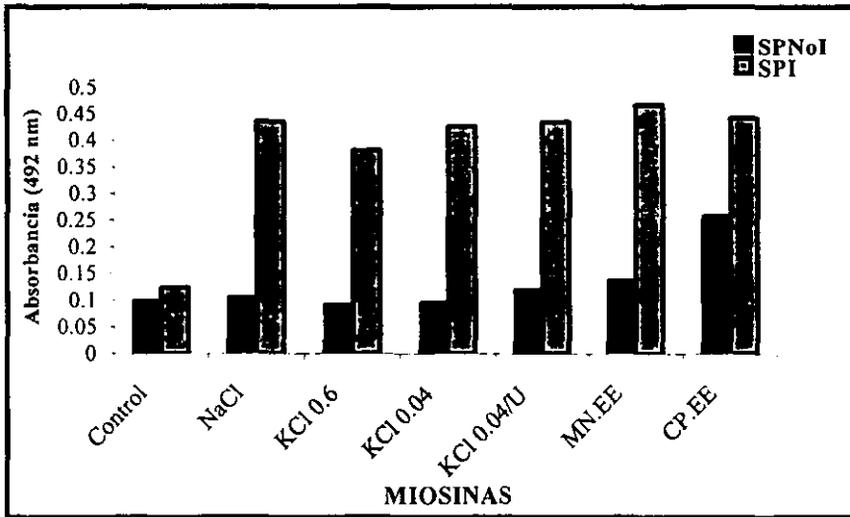


Figura 14. Reconocimiento de miosina por suero de humano sano e infectado. Los ensayos fueron realizados como se indicó en la figura anterior, sólo que la miosina reaccionó con sueros de personas no infectadas (SPNoI) e infectadas (SPI) y los sueros fueron preparados a una dilución específica (1:50). Como anticuerpos secundarios fueron utilizados los anticuerpos comerciales anti-IgG de humano conjugados a peroxidasa. (1:500).

5.4.3. Detección de miosina liberada de suero de humanos por tratamiento con ácido tricloroacético. Si existiera dicha posibilidad de que la miosina de los parásitos fuera reconocida por los sueros de las personas infectadas y en caso de que así fuera, ellas formarían parte de complejos inmunes, se pensó en que aplicando tratamientos para separar a tales complejos se podría incrementar la cantidad de miosina reconocida por los AcM 4B3. Para estos fines, el suero de las personas infectadas fue tratado con ATAcO al 2% ¹⁷ y los resultados obtenidos mostraron que aparentemente el método podría favorecer la liberación de la miosina desde los sueros tratados, aunque faltaría hacer mayor número de mediciones para definir exactamente la cantidad de miosina liberada y cuál es la que corresponde realmente a la de los parásitos (Fig. 15).

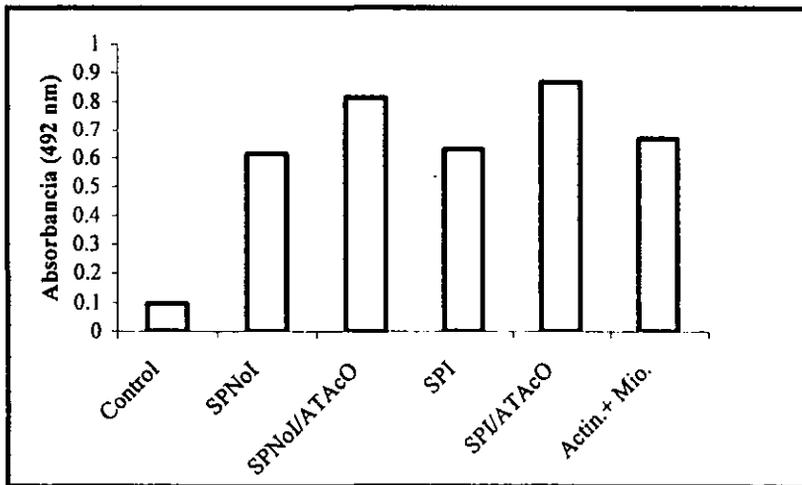


Figura 15. Detección de miosina liberada por tratamiento con ácido tricloroacético de sueros de humanos. Para la captura de miosina fue empleada actina (250ng/pozo), sueros de personas no infectadas (SPNoI) e infectadas (SPI) en ausencia o en presencia de ácido tricloroacético (ATAcO) y para el revelado fueron utilizados AcM 4B3, anticuerpos comerciales antiratón y OFD como sustrato. Las lecturas de las reacciones enzimáticas fueron hechas a 492nm.

5.5. Detección de anticuerpos antimiosina en personas infectadas naturalmente. Aparte de analizar si en el suero de los humanos había miosina y luego de los tratamientos con ATCAcO, los sueros fueron hechos reaccionar con las miosinas purificadas mediante IET. Lo observado fué que aparentemente en los sueros de las personas infectadas podrían haber anticuerpos que reaccionan con las miosinas, incluso con aquellas purificadas por electroelución. Si embargo, al tratar de hacer reaccionar a la miosina purificada por precipitación en KCl 0.04, no hubo reconocimiento alguno para este tipo de miosinas y lo cual podría estar asociado a su forma de purificación. (Fig. 16).

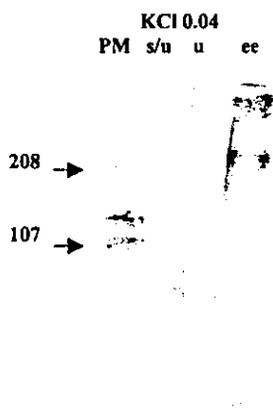


Figura 16. Detección de anticuerpos antimiosina en personas infectadas naturalmente. Luego de los corrimientos electroforéticos, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (1.5 Amp, 4°C, 1 h) y para la evaluación del reconocimiento fueron empleados sueros de personas infectadas (1:50). Para el revelado de la reacción, fueron empleados anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, y se empleó DAB y H₂O₂. Las miosinas analizadas fueron purificadas por KCl 0.04 M, analizadas en presencia (u) o en ausencia de urea (su), así como aquellas recuperadas desde electroeluciones (ee). Se señalan dos de los 7 marcadores de peso molecular.

La reacción de estos sueros contra miosinas purificadas, es un fenómeno semejante al observado cuando se emplean anticuerpos policlonales específicos o monoclonales.

DISCUSION DE RESULTADOS

Como se pudo observar, por la evaluación de los anticuerpos monoclonales recientemente obtenidos de los cultivos de los hibridomas, estos siguen manteniendo su reactividad hacia los componentes parasitarios con los cuales se hicieron reaccionar. El motivo de tal análisis fue para evaluar si los AcM 4B3 no habían perdido o se había alterado su reconocimiento hacia los antígenos totales, tal y como ya había sido publicado³ usando extractos totales de parásitos adultos. Lo mas importante de estos análisis fue la evaluación de si los AcM 4B3 reconocían los extractos de cisticercos (Fig. 1) y lo que se obtuvo indica que si hay tal reacción. Además del reconocimiento de estos antígenos, los resultados muestran que los hibridomas productores de estos AcM 4B3 son estables, producen activamente a estos AcM y que por su reconocimiento a extractos de cisticercos, ellos podían ser empleados para los estudios que a continuación serán mencionados.

Con base a que los AcM 4B3 reconocieron extractos totales de los metacéstodos, se consideró que esto mismo debía pasar con miosinas semipurificadas de estos parásitos y lo cual motivó a la preparación de miosinas parcialmente purificadas, tal y como se había hecho con las tenias. De igual forma, como sucedió con los extractos, los anticuerpos reaccionaron con las miosinas no importando su grado de purificación (Fig. 2), aunque aparentemente los resultados indican que el grado de pureza de las miosinas influye en el grado de reactividad de estos anticuerpos.

Con la idea de mejorar la evaluación de los reconocimientos hacia miosinas, se procedió a efectuar una purificación de los filamentos mediante precipitación selectiva con sales de KCl y luego, de efectuar ensayos de electroforesis e inmunoelectrotransferencia se observó que la miosina tenía un alto grado de pureza. El análisis electroforético mostró que estos filamentos pueden ser visualizados sobre los 200 kDa de peso molecular y que

podrían corresponder tanto a miosina nativa como a cadenas pesadas (Fig. 3a). Los ensayos de IET mostraron que el AcM 4B3 reconocía principalmente a la miosina nativa (Fig. 3b) aunque se observó el reconocimiento hacia otras fracciones de peso molecular semejante. Posiblemente, por la cercanía en peso y por la reactividad del AcM 4B3 hacia estas fracciones, ellas pudieran corresponder a isoformas de la miosina en estudio. En este sentido, se han hecho análisis relacionados con la estabilidad de la miosina frente a tratamientos clásicos para desnaturalización de proteínas y lo que se ha observado, en relación a miosinas de *Taenia solium* es que aparentemente ellas son estables bajo las condiciones en las que se les ha estudiado, lo cual podría indicar que los epítopes reconocidos por el AcM 4B3 son lineales y no conformacionales²⁹.

Una de las maneras planteadas para analizar la posibilidad de que las miosinas tuvieran isoformas, fue el planteamiento de la purificación individual de cada fracción. Con esta finalidad fueron implementadas varias tecnologías entre las que se consideró la separación mas efectiva de las proteínas de alto peso molecular mediante el uso de electroforesis en geles de menor concentración (5%) (Fig. 10). Los resultados obtenidos, aunque mostraron que era posible la resolución de estas proteínas grandes no permitieron la separación de las posibles isoformas que en parte pudiera estar influenciada por la alta concentración de las sales en las que las proteínas fueron purificadas. Sin embargo, la combinación de electroforesis con elución activa desde los geles, así como el empleo de diálisis exhaustiva y un nuevo corrimiento electroforético en presencia de urea (Fig. 10) mejoraba la resolución para evidenciar las posibles isoformas. El problema mas importante que se observó luego de emplear esta metodología de extracción y visualización, fue que el rendimiento del producto era muy bajo y todo el proceso era muy laborioso. Estas causas orillaron a buscar otra estrategia mas simple y se pensó en la recuperación de las proteínas luego de su separación electroforética en geles gelificados en presencia de un análogo de la bisacrilamida (Bis-acrililcistamina: BAC), que aparentemente por su alto contenido en

enlaces disulfuro los geles obtenidos pueden ser disueltos luego de su tratamiento con mercaptoetanol, y con ello favorecer la liberación de las proteínas contenidas en ellos. Desafortunadamente estos geles no pudieron ser empleados exitosamente, ya que durante los procesos de electroforesis ellos iban gradualmente deshaciéndose y finalmente no funcionaron para recuperar a la proteína, ya que en caso de hacer tratamiento de ellos con AcONa 4 M no era posible la identificación de las fracciones correspondientes y con ello favorecer su aislamiento. Considerando estos problemas, hubo que reconsiderar la recuperación de las fracciones proteicas luego de su separación electroforética en geles de acrilamida comunes y electroelución ya mencionados.

Debido, a como ya fue mencionado, de que la resolución de las posibles isoformas mediante electroforesis de gradiente continuo no permitía resolver mejor la separación de tales isoformas, se decidió intentar tal separación mediante el empleo de geles de gradientes de concentración. La utilización de tales geles permitió mejorar la resolución de la separación de diferentes fracciones proteicas (Fig. 11) gracias a lo cual pudo ser observado que la miosina de cisticercos purificada por precipitación en KCl 0.04M presentaba dos bandas de alto peso molecular situadas por encima de los 208 kDa, a diferencia de cuando se le trataba con urea en donde se lograba la separación de las cadenas pesadas que conforman la miosina nativa. Cuando las fracciones proteicas eran separadas de los geles y electroeluidas, además de tratadas con urea, se podían obtener las tres fracciones descritas. Estos resultados indicaron que la miosina nativa y sus cadenas pesadas podían ser separadas dependiendo de las condiciones que se empleen después de su purificación en KCl 0.04M. El análisis del reconocimiento de las fracciones, mediante el empleo de anticuerpos, empleando estas proteínas purificadas indicó que se logran preservar los sitios de reconocimiento según lo observado por inmunopunto. Cuando se hizo el análisis de las fracciones purificadas y electroeluidas en presencia de diferentes anticuerpos (Fig. 12), se observó que los anticuerpos policlonales antimiosina nativa reconocen más fracciones de alto peso molecular, mientras que el AcM 4B3 sólo reconoce a una de ellas siempre y

cuando estas proteínas no hayan sido electroeluidas. De acuerdo a estos resultados podría haber posibilidades de que las bandas reconocidas por los anticuerpos policlonales correspondan a la miosina y sus isoformas, las cuales pueden ser mejor identificadas cuando la miosina es tratada con urea. En relación a este último punto, un análisis de un suero de un individuo infectado con cisticercosis mostró que reconocía una de las fracciones proteicas de la cadena pesada de miosina (Fig.16) (ver mas adelante). Uno de los aspectos interesantes en relación a los reconocimientos, como ya fue descrito, es que el AcM 4B3 no reconoció a las fracciones electroeluidas y ello podría estar relacionado que el proceso podría alterar el sitio de reconocimiento de estos AcM 4B3.

Con la finalidad de realizar un mejor control de los fragmentos de miosina obtenidos, dado que aún se tenían problemas de reconocimiento por parte de los AcM 4B3, se decidió hacer la captura de miosina empleando a la actina como agente de atrapado, tomando como base el hecho de que la miosina interactúa específicamente con la actina. La decisión de este forma de atrapado de la miosina se hizo luego de que se probó sin éxito el empleo de anticuerpos policlonales antimiosina. Aparentemente, la forma en que la miosina es atrapada por estos anticuerpos no es la misma siempre ²⁹ a pesar de que sea utilizada una dilución de reacción específica. Posiblemente con el caso de la actina se pueda atrapar a la miosina en una misma forma (a través de la región globular de la miosina) y de esta forma se puede obtenerse datos mas confiables. Este proceso de interacción actina-miosina está fundamentado en el hecho de que se sabe que la actina es una molécula, que cuando esta polimerizada (actina F), interacciona específicamente con la miosina tipo II y gracias a tal interacción se efectúan los eventos de movimiento muscular en tejidos de tipo músculo esquelético ³³. Los resultados preliminares obtenidos para la captura de miosina a través de actina, generado en el grupo de investigación donde se realizó el presente proyecto de investigación, han mostrado que la miosina capturada por este sistema podría ser de utilidad en el diagnóstico de las teniosis

experimental y naturalmente adquiridas (publicación en proceso). Con estos antecedentes, los resultados obtenidos relativos a la captura de miosina por actina, mostraron que hay mejor atrapado y reconocimiento por parte del AcM 4B3 (Fig.13), además en cada ensayo efectuado se encontró una mejor homogeneidad entre los resultados obtenidos.

Estos resultados, además, mostraron que el proceso de electroelución, no altera cambio alguno en los epítomos de las proteínas en estudio ya que los anticuerpos las reconocen bastante bien.

Con la idea de evaluar si las mismas miosinas eran identificadas por sueros de humanos infectados con cisticercosis, se hicieron ensayos semejantes y lo que se observó (Fig. 14), fue que aparentemente los sueros de las personas infectadas contienen anticuerpos los cuales son capaces de reconocer a las miosinas de diferente etapa de purificación. De acuerdo a estos resultados, cabría la posibilidad de que si la miosina de los parásitos es liberada, genera una respuesta inmune en su contra, la cual podría ser tan efectiva que siempre la miosina es reconocida bajo este formato de análisis. Estos resultados llevaron a pensar que si la miosina fuera liberada por los parásitos y es capaz de inducir anticuerpos en su contra, posiblemente existieran complejos inmunes los cuales podrían ser analizados y si se usaba algún método que rompiera esos complejos, podría darse la posibilidad de que la cantidad de miosina reconocida por los AcM 4B3 fuera mayor. Por estas causas, con la idea de separar a los complejos inmunes se hicieron tratamientos del suero de las personas infectadas con ATAcO al 2% ¹⁷. Los resultados obtenidos mostraron que aparentemente el método podría favorecer la liberación de la miosina desde los sueros tratados, aunque faltarían más mediciones para definir exactamente la cantidad de miosina liberada y cual es la que corresponde realmente a la de los parásitos (Fig. 15). Los análisis de sueros tratados con ATAcO revelaron que los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer algo en el suero y que por su

especificidad sólo podría tratarse de miosina (Fig. 15). Sin embargo, los datos no son suficientes como para definir la realidad de lo que se propone.

Los análisis de los posibles reconocimientos a miosina hechos en presencia de los sueros de humanos analizados y de miosinas purificadas por electroelución mediante IET (Fig. 16) indican que posiblemente los anticuerpos presentes en los sueros de personas infectadas pueden reconocer, entre otras proteínas, a la miosina purificada por electroelución (Sin importar si se trata de miosina nativa o de sus cadenas pesadas). Resultados en los que se encontró que estos sueros no eran capaces de reaccionar al enfrentarlos a la miosina purificada por precipitación en KCl 0.04, a diferencia de lo sucedido con las electroeluidas, aparentemente no pueden ser explicados con los análisis que fueron efectuados. A pesar de la baja reactividad del AcM 4B3 hacia la miosina electroeluida puede ser observado, al compararla con la reactividad de el suero de humano, que estos últimos podrían estar reconociendo otra forma diferente de miosina que el AcM 4B3 y lo cual, tendría que ser confirmado por aislamiento de las posibles isoformas de miosina y evaluación de su reactividad frente a sueros de humanos.

El hecho de poder encontrar miosina de parásitos o anticuerpos antimiosina de parásitos en el suero de las personas infectadas podría tener importancia en relación al diagnóstico de esta parasitosis, tal y como ha sido pensado para el caso de las tenias o bien que la presencia de proteínas del citoesqueleto, liberadas o altamente inmunogenicas, tenga que ver algo con la relación huésped-parásito.

CONCLUSIONES

Los AcM 4B3, que por su caracterización inmunoquímica inicial se demostró que, reconocen extractos crudos y miosina de parásitos adultos, también tienden a reaccionar con sustancias semejantes de cisticercos y ello podría deberse a que de un estadio parasitario a otro se mantienen estas mismas proteínas.

Es posible, de acuerdo a lo visto en el presente trabajo de tesis, que dependiendo de la forma en que sea preparada la miosina desde cisticercos se presente el grado de reactividad de los anticuerpos utilizados.

Posiblemente, de acuerdo al esquema de purificación por sales de los filamentos de miosina, se obtengan miosinas con alto grado de pureza de tal suerte que se pueda hacer la separación de posibles isoformas, como lo muestran los resultados por IET con los anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados. Es posible, además, que esas formas de miosina puedan ser aisladas empleando procesos como electroelución en combinación con diálisis exhaustiva. Estos procesos, asociados al empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida en gradientes de concentración (5-22.5%), aparentemente, permiten mejorar la resolución en la separación de las miosinas y por ende su análisis.

Posiblemente, como lo muestra la reactividad de los AcM 4B3 hacia las miosinas separadas por gradientes de concentración, existan al menos dos formas de miosina que presentan un alto peso molecular (>208 kDa) y que esto mismo puede suceder cuando la miosina es tratada en presencia de urea que separa las cadenas pesadas.

Según los resultados por inmunopunto de las fracciones recuperadas de los geles y electroeluidas, los sitios de reconocimiento de los anticuerpos se logran preservar para los anticuerpos policlonales, mientras que para los AcM 4B3 éstas aparentemente no se encuentran. El reconocimiento de estas fracciones electroeluidas por los anticuerpos policlonales, aparentemente permite ver como tales anticuerpos reconocen a isoformas de miosinas, lo cual se repite cuando las miosinas son tratadas con urea.

La evaluación de la miosina capturada por actina purificada de los parásitos, mostró que es posible de efectuar bajo las condiciones que previamente habían sido establecidas y gracias, a ello se lograron algunos avances relacionados con la identificación de miosina purificada y electroeluída estudiada frente a sueros de humanos. Los resultados obtenidos podrían ser un indicativo de que los sueros de humanos infectados con cisticercosis tienen anticuerpos antimiosina, los cuales podrían reconocer a la miosina en diferentes etapas de purificación e incluso electroeluídas. Por estas causas, cabría la posibilidad de que la miosina de los parásitos al ser liberada induzca en el huésped infectado anticuerpos específicos y la posibilidad de que sean generados complejos inmunes como se intentó demostrarlo en el presente trabajo. Para confirmar estos últimos argumentos se requiere efectuar otros tipos de experimentos que lo comprueben.

Por medio de los resultados obtenidos en el presente proyecto es posible que se puedan dar algunos parámetros que permitan estandarizar algún método de detección de miosina de parásitos de *T. solium*, el cual a su vez pudiera favorecer o mejorar el diagnóstico de la taeniosis y la cisticercosis. Esto podría ser logrado mediante la detección de anticuerpos antimiosina de parásitos o bien mediante la demostración de la presencia de miosina en fluidos biológicos de los individuos infectados. La importancia de encontrar o detectar miosina de los parásitos, o de anticuerpos antimiosina en las personas o cerdos infectados naturalmente podría ser relevante no solo para el diagnóstico, sino para avanzar en el comprensión de la relación huésped-parásito en estas parasitosis.

PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.

Durante el desarrollo del presente proyecto de tesis se presentaron ciertas dificultades, las cuales permitieron optimizar y mejorar los métodos de purificación de miosina de cisticerco así como el considerar que la reproducibilidad del proyecto depende de las actividad biológica de las muestras ya que dicha actividad esta dada en función del tiempo transcurrido desde la preparación.

Es recomendable contar con un método de conservación adecuado para mantener la funcionalidad de la proteína purificada.

Se propone estandarizar la detección de anticuerpos antimiosina y miosina circulante en personas infectadas naturalmente, para método de diagnóstico.

Mientras se encuentra otro método de purificación de miosina con mayor resolución se recomienda utilizar GELPOLI en gradiente de concentración (5-22.5%) y electroclución.

APENDICE

9. 1. Cuantificación de proteínas. Micrométodo colorimétrico

El método empleado consistió en la determinación de proteínas con base a lo descrito originalmente por Bradford en 1976 y que corresponde a una modificación recomendada por el fabricante del reactivo de reacción (BIO RAD Protein Assay). La técnica está basada en un microensayo en placa con el reactivo de reacción modificado al originalmente propuesto. La base de la detección de las proteínas está determinado por el cambio de color del reactivo azul brillante de coomassie G-250 y este cambio de color está directamente relacionado con la concentración de proteínas. El colorante, para efectuar la reacción con las proteínas, inicialmente reacciona mediante fuerzas de Vander Walls e interacciones hidrofóbicas con los residuos de arginina y con menor intensidad, con los residuos de histidina, tirosina, triptófano, lisina y fenilalanina.

9.1.1. Preparación de la curva de calibración con proteínas conocidas.

Como proteína estándar fue utilizada ASB para la curva de calibración, 40 μ L de la proteína estándar fueron adicionados dependiendo de la concentración de la proteína estándar; empleando intervalos de concentración (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 3.2, 4.0 μ g). Las proteínas fueron analizadas en una placa flexible de 96 micropozos (Micro test III, Becton Dickinson). Posteriormente las proteínas fueron puestas en contacto con 160 μ l del reactivo de Bradford (dilución:1:5 con agua bidestilada). Previamente el reactivo de Bradford fue filtrado a través de una membrana (Diámetro de poro igual a 0.22 μ m; Cameo 25 AS) para eliminar los posibles grumos formados y la posible interferencia en el ensayo. Posterior a la adición del reactivo colorido, se permitió la reacción por un intervalo de 5 min y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. Esta reacción es estable

durante 30 min. Todas las lecturas fueron tomadas de reacciones hechas por duplicado de las cuales se obtuvieron los valores promedio. Se hicieron determinaciones de la absorbancia de la proteína en ausencia del reactivo colorido como blanco de la reacción bajo las condiciones descritas. Todas las lecturas fueron realizadas en el equipo DYNATECH MR 5000 utilizando un filtro de una longitud de onda de 570 nm.

9.1.2. Determinación de la concentración de proteína.

1 μ L de muestra por analizar, aforada a 40 μ L de volumen final con SSAF pH 7.2, fue diluída y tratada como se indicó en la curva de calibración. La determinación de la concentración real se hizo con base a los valores de absorbancia promedio de la muestra y su interpolación con una curva de regresión lineal, de acuerdo a las concentraciones de proteína estándar utilizadas. Finalmente la concentración de las proteínas en las muestras problema se hizo con base a la dilución inicial de las muestras.

9. 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La necesidad de lograr una separación de las proteínas contenidas en una mezcla de varias, con base a sus pesos moleculares y su migración en un campo eléctrico, hizo necesario el empleo de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (GELPOLI) en ausencia o en presencia de condiciones reductoras. Para su análisis las proteínas fueron solubilizadas, previo a su separación por electroforesis, en un medio denominado coctel que contenía un detergente aniónico como el dodecil sulfato de sodio (DSS) con la finalidad de romper las interacciones no covalentes en las proteínas nativas, un agente reductor como el β -mercaptoetanol con la finalidad de separar los puentes disulfuro y ayudar a la pérdida de estructuras secundarias y terciarias

permitiendo la estructura primaria ⁸¹. De esta forma, este tratamiento ayudó a que las proteínas más pequeñas se desplazaran más rápidamente de las grandes durante la electroforesis y las proteínas de mayor peso molecular se mantuvieron casi en el punto de aplicación de la muestra. Está diferencia en la migración de las proteínas, se debe a que los poros formados por el entrelazamiento de la mezcla de acrilamida y bisacrilamida tienen diferentes tamaños dependiendo de la concentración a la que hayan sido utilizados estos reactivos y esto favorece que las moléculas más pequeñas se desplacen más fácilmente que las moléculas mayores ⁸¹. Las miosinas en un gel porcentual siempre permanecieron en la parte superior de los geles dado que tienen un peso molecular alto (igual o mayor a 200 kDa).

9.2.1. Separación electroforética en GELPOLI.

Para estos fines se utilizó una minicámara de electroforesis vertical Hoefer (Migthy Small II, SE 260) con todos los implementos recomendados por el fabricante. Los geles fueron preparados de acuerdo a lo recomendado y descrito por Hames (1981); para geles de gradiente continuo a diferentes concentraciones y con los componentes correspondientes para favorecer su gelificación (al 5%, 7.5%, 10% y el que forma un gradiente de 5 % a 22.5 % fue preparado como se indica en el manual del Departamento de salud y servicios humanos). Se emplearon dos diferentes tipos de geles, uno llamado concentrador o superior y otro separador o inferior para lograr la completa separación de las proteínas. En la preparación del gel concentrador se utilizaron peines que generaron pozos de 2, 5 o 10 carriles de acuerdo a las necesidades analíticas que se requerían, dichos pozos tenían una capacidad de, 30 y 60 μL de muestra respectivamente. También se utilizaron peines denominados preparativos para separar mayores cantidades de proteína (300 μL). Las mezclas de proteínas, luego de haber sido tratadas con coctel y calentamiento (ebullición 5min) se colocaron en los pozos del gel y con la ayuda de la corriente eléctrica separar las proteínas electroforéticamente.

Para geles continuos.

Solución Stock	Gel concentrador	Gel separador	
		5 %	10 %
	5 %	5 %	10 %
Acrilamida-bisacrilamida Al 30 %	330 µL	5 mL	10 mL
Buffer pH=8.8 ^a	-----	3.75 mL	3.75 mL
Buffer pH=6.8 ^b	250 µL	-----	-----
SDS 10 %	20 µL	300 µL	300 µL
Persulfato de amonio 1.5 %		1.5 mL	1.5 mL
Persulfato de amonio 10 %	20 µL		
Agua destilada	1.4 mL	19.75 mL	12.25 mL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL

^a Solución de Tris-base (tris-hidroximetil aminometano) 2 M pH 8.8

^b Solución de Tris-HCl (cloruro de tris-hidroximetil aminometano) 2 M pH 6.8

Para geles en gradiente de 5 a 22.5 % .

Solución Stock	Gel concentrador	Gel separador	
		5 %	22.5 %
		5 %	22.5 %
Acrilamida-bisacrilamida Al 40 %	1 mL	6.49 mL	29.24 mL
Buffer pH=9.18 ^a	----	12.99 mL	12.99 mL
Buffer pH=6.14 ^b	1mL	-----	-----
Persulfato de amonio (1.5mg / 100 µl)	75 µL	-----	-----
(25mg / 3ml H ₂ O)	-----	800 µL	490 µL
Agua destilada	2 mL	30.88 mL	8.44 mL
TEMED (concentrado)	6 µL	-----	-----
(250 ul + 1.8 ml H ₂ O)	----	810 µL	810 µL
Volumen total		51.97 mL	51.97 mL

^a Solución de Tris-HCl pH 9.18.

^b Solución de Tris-H₂SO₄ pH 6.14

NOTA: Con estas cantidades se prepararon 10 geles de 0.75mm en una cámara de gradiente (Multicaster. HOEFER), adaptada a un sistema de vasos conectores (Gradient Makers. HOEFER) y una bomba peristáltica (12000 Varioperpex.BROMMA).

Reactivos:

Buffer pH=9.18. Se preparó una solución con 205.6g de Tris-base (Bio-Rad) y agua suficiente para disolver el Tris (aproximadamente 800mL), posteriormente con HCl concentrado se ajustó el pH a 9.18, después de ajustar el pH se aforó la solución a 1000mL con agua.

Buffer pH=6.14. Se tituló una disolución que contenía 2.62g de Tris-base y agua frente a H₂SO₄ 2M ajustando exactamente a pH 6.14, posteriormente se aforó a 100mL con H₂Odd.

Acrilamida-bisacrilamida al 40%. Se pesaron 40g de acrilamida (Bio-Rad) + 1g de bisacrilamida (Bio-Rad), disolviéndolos en agua caliente, posteriormente se aforó a 100mL y filtró a través de una membrana de Millipore de 45µ. Se recomienda prepararla 1 día antes de su uso y almacenar a 4° C aislada de la luz (vida media de 3 meses).

Buffer de la cámara inferior. Se realizó una dilución 1:4 en agua del buffer del gel inferior (buffer pH=9.18).

Buffer de la cámara superior. A 2.47g de ácido bórico (BAKER), 4.92g de tris-base y 10mL de SDS (al 10% (Bio-Rad)) se les adicionó agua hasta llegar al aforó de 1000mL.

9. 3. Inmunoelectrotransferencia.

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET), descrita por Towbin y cols. en 1979, es uno de los métodos más útiles con que se cuenta en la actualidad para el análisis antigénico.

Este método combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliácridamida en presencia o ausencia de detergentes como dodecil sulfato de sodio (SDS), con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida. Posteriormente, estas proteínas así separadas fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa (NC) o de Nylon, en donde se unen a los grupos reactivos del papel, quedando así inmobilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón que se obtuvo sobre el papel es una copia del patrón

de separación obtenido en el gel. Es necesario en esta fase del procedimiento bloquear con alguna proteína que no interfiera (por ejemplo, gelatina, albúmina sérica bovina o leche) con los sitios reactivos del papel que quedan libres, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se emplean a continuación. En la etapa siguiente la membrana de NC se hace reaccionar con los anticuerpos problema, los cuales se unen a los antígenos correspondientes que están inmovilizados en el papel⁸.

9.3.1. Revelado de la reacción inmunoenzimática.

Inicialmente la membrana (NC o PVDF) fue puesta a bloquear (leche Sveltes 5% en SSAF-Tween 20) a TA, en agitación suave y continua durante 1 h, luego las membranas fueron lavadas dos ocasiones de 5 min cada una con SSAF-Tween y posteriormente lavadas durante 3 ocasiones con SSAF. Después fueron adicionados los anticuerpos policlonales o monoclonales como es indicado para el inmunopunto así mismo el revelado (DAB 500µg/mL en SSAF y 6µL de H₂O₂).

9.4. Tinción con Azul de Coomassie brillante

Para la tinción de las proteínas se empleó el azul de Coomassie brillante R-250. Luego de recuperar los geles de la electroforesis, éstos fueron colocados en una solución que contenía azul de coomassie 0.73mM, metanol al 30%, ácido acético al 10% y agua bidestilada c.b.p. 500mL. La tinción fue efectuada en presencia de calor (Temperatura de ebullición, 2h) dentro de una campana de extracción o bien durante toda la noche a TA. Para el desteñido de los geles fue empleada una solución de ácido acético al 10% y en presencia de calor dentro de una campana de extracción. Se hicieron varios cambios de esta solución de desteñido hasta que los geles fueron aclarados y solo se observaron las bandas.

Luego los geles desteñidos previo al secado fueron fotografiados o escaneados para su conservación, el secado se realizó en un aparato Bio-Rad 224 en presencia de calor y vacío. Para el fotografiado fue empleada una película blanco y negro (Kodak),asa 100 y una cámara Nikon o Cannon con un lente con apertura de diafragma 4, 5 u 8 y 1 min de exposición. Para el escaneo fue empleado un equipo Epson a 300 puntos de resolución.

9. 5 . Tinción con acetato de sodio 4M ⁵⁴ .

La diferencia de esta tinción con la de coomassie se basa en que en esta las fracciones antigénicas pueden ser reconocidas en los geles sin que sean fijadas y de esta forma se logra obtener las proteínas con su actividad biológica.

Esta técnica fue empleada luego de que las proteínas fueron separadas por electroforesis preparativa. La sensibilidad del método es muy alta (aproximadamente 1-2µg de proteína por fragmento). Los fragmentos recuperados fueron tratados para ser utilizados para la electroelectroelución y de esta manera obtener una proteína pura.

9. 6. Tinción de proteínas con nitrato de plata.

Otra técnica utilizada para el análisis e identificación de las proteínas separadas electroforéticamente es la tinción con nitrato de plata (Silver Stain Kit. SIGMA.AG-25) la cual posee mayor sensibilidad que las anteriores y permite identificar mínimas cantidades de proteína (120-300ng) ya que la cantidad de proteína pura que se obtuvo es mínima , por lo que para su análisis de purificación requiere técnicas muy sensibles como esta.

El Kit se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (SIGMA) iniciando la fijación de las proteínas separadas electroforéticamente en el gel con una solución inicial de

FALTA PAGINA

No. 65

anticuerpo antimiosina comercial. En el momento que se determinó que la purificación de la proteína era la adecuada, se hizo una determinación de su concentración mediante un micrométodo comercial (Protein Assay. No. Cat. 500-0006 BIO-RAD) basado en el método de Bradford ⁶. Con este material puro y cuantificado se procedió al tratamiento químico respectivo para la separación de cadenas pesadas, su recuperación desde los geles preparativos de poliacrilamida, su extracción por electroelución y su posterior análisis con el anticuerpo monoclonal 4B3 (AcM 4B3).

9. 7. Inmunopunto.

Actualmente existe un gran número de ensayos inmunológicos para detectar anticuerpos y/o antígenos, dentro de ellos, el ELISA, ha sido uno de los ensayos más socorridos por su alta sensibilidad y especificidad, así como por su fácil ejecución. Debido a ello, se han descrito una amplia variedad de modificaciones de ELISA entre los que se encuentra el inmunopunto (DOT BLOT, DOT ELISA o simplemente BLOT) y en estas modificaciones, se emplea como soporte para el acoplamiento del antígeno ó el anticuerpo, una membrana de nitrocelulosa o PVDF.

Para el presente proyecto de tesis, la técnica empleada consistió en adsorber a una membrana de nitrocelulosa 5 μ L de la proteína con la ayuda del BIO-DOT (Bio-Rad) y aplicación de vacío hasta secar las muestras y luego la membrana fue puesta a bloquear (37°C, 30min) empleando leche semidescremada (Sveltes comercial) al 5% disuelta en SSAF-Tween 20 al 0.3%. Posteriormente los antígenos reaccionaron con los anticuerpos policlonales o monoclonales 1:1000 o sobrenadante total a 37°C, 1h. Después de la adición de estos anticuerpos, fue adicionado un anticuerpo secundario policlonal comercial (SIGMA) conjugado a peroxidasa (anti IgG de conejo o anti IgG de hámster 1:1000; 37°C, 2h. Cuando fue empleado el AcM como anticuerpo secundario fue usado antiratón conjugado a peroxidasa (1:1000, 37°C, 2h). En todos los casos para el revelado de la reacción enzimática fue empleada la DAB (500 μ g/mL) diluida

en SSAF y H_2O_2 (0.6%). Una vez desarrollado el color en cada punto la reacción fue detenida por adición de agua destilada.

*NOTA: Durante los bloqueos y los cambios de anticuerpo fueron realizados dos lavados de 2 min cada uno. Primero se hizo un lavado con SSAF-Tween 20 al 0.3% y después SSAF pH7.2, en cada ocasión fue eliminado el sobrenadante entre estos procesos.

Ya que las proteínas pasaron por un proceso muy largo de purificación se determinó la actividad biológica de las mismas por inmonopunto así mismo demostrar la presencia o ausencia del epítipo de reconocimiento.

Con la ayuda de un equipo de dotblot y empleando membranas de nitrocelulosa (NC), en cada pozo fueron adicionados $5\mu L$ ($2\mu g$) de las miosinas a evaluar: miosina comercial (control positivo), KCl 0.6M, KCl 0.04M, CP.EE, CP.BAC, MN.EE, MN.BAC, CP.EE ($4\mu g$).

Posterior a la adsorción de las miosinas se realizó un bloqueo durante 30min. transcurrido el tiempo de bloqueo se procedió a la incubación con los diferentes anticuerpos primarios (Ac pol: antimiosina comercial, anticadena pesada, antimiosina nativa y los AcM's 4B3 y 12DO1) ($25^\circ C$, 1h) se permitió la reacción con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (SIGMA), los cuales fueron utilizados a una dilución de 1:1000. El revelado de la reacción se llevó a cabo con DAB ($30\mu g/60mL$) y H_2O_2 al 30%.

REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRAFICAS

1. Allan JC, Avila G, García-Noval J, Flisser A & Craig PS. (1992). Immunodiagnosis of Taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. **101**: 473- 477 .
2. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette JP, Larralde C, Velázquez V y Willms K. (1987). Cisticercosis, una recopilación de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *T. solium* . Fondo de Cultura Económica . México .
3. Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Morán E, Erksfeld K & Flisser A. (1997). Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*. **116** (6): 545-553.
4. Atias A & Neghme A. (1984). Parasitología clínica. Edit. Mediterraneo. Chile. 29-33.
5. Beaver CP, Jung CR & Lupp WE. (1992). Parasitología clínica. 2ª Ed. Edit. Salvat. México. 435-438.
6. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248- 254.
7. Brown HW. (1975). Basic Clinical Parasitology. Appleton - Century -Crofts. New York. 4ª.Ed. 172- 177.
8. Burnette WN. (1981). Western blotting: Electroforetic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**; 185-203.
9. Cañedo L, Laclette JP, Morales E. (1982). Evagination of the metacestode of *Taenia solium* in Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. *Academic Press*. 363- 373.
10. Cohen C. (1982). Matching molecules in the catch mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. **79**: 3176- 3178.
11. Correa MD, Plancarte A, Sandoval MA, Rogríguez E, del Rosal A, Meza - Lucas & Flisser A. (1989). Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. *Acta Leidensia* **57**: (2): 93- 99.

12. Craig PS, Macpherson CNL & Nelson GS. (1986). The identification of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using anti-oncospherical monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene* 35:152- 158.
13. Cruz MY. (1995). Caracterización de Anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos del estadio adulto de *Taenia solium*. Tesis de licenciatura. FESC.UNAM. México.
14. Chaicumpa W, Yuwaporn R, Buri D, Chongsua M. & Echeverria P. (1992). Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella typhi* antigen in urine. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 2513- 2515 .
15. Cheney R, Riley M & Mooseker M.. (1993). Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 24: 215- 223.
16. Darnell G, Lodish H, Baltimore D. (1990). *Molecular Cell Biology*, 2nd edn. Scientific American Books- New York..
17. De Jonge N., Fillie YE, Deelder AM. (1987). A simple and rapid treatment (trichloroacetic acid precipitation) of serum samples to prevent non-specific reactions in the immunoassay of proteoglycan. *Journal of Immunological Methods*. 99:195-197.
18. Deutsch VR, Biadsi S, Eldor A, Muhrad A & Kahane Y. (1990). Characterization of monoclonal antibodies to human platelet myosin that recognize highly conserved epitopes within the 50 kDa fragment of myosin subfragment-1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1038: 286- 290.
19. Dowben RM.. (1969). General physiology a Molecular Approach. A harper International . Harper.& Row U.S.A. 499- 522.
20. Epstein H, Miller D, Ortiz I & Berliner G. (1985). Myosin and Paramyosin are organized about a newly identified core structure. *The Journal of Cell Biology*. 100: 904- 915.
21. Espreafico ME., Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AC, Camilli PV, Learson RE, & Mooseker MS. (1992). Primary Structure and Cellular Localization of Chicken Brain Myosin-V (p190), an Unconventional Myosin with Calmodulin Light Chains. *The Journal of Cell Biology*. 119:(6):1541- 1557.
22. Faust E, Rusell PF, Jung R.C. (1974). Craig and Faust's Clinical Parasitology . 8ª Ed. London. Lea and Febiger Philadelphia. 529- 539.

23. Flisser A, Plancarte A y Correa D. (1988). La epidemiología de la cisticercosis humana . En " La cisticercosis en México " (simposio). *Gaceta Medica Mexicana*. 124: 192- 193.
24. Flisser A, Madrazo I & Delgado H. (1997). Cisticercosis humana. Edit. Manual moderno.
25. Flisser A, Woodhouse E. & Larralde C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies and nonresponders. *Clinical Experimental Immunology*. 39: 27- 37.
26. Gemmell M, Matyas Z, Pawlowski Z, Soulsby E, Larralde C, Nelson GS & Rosicki Z. (1983). Guidelines for surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. VPH/83.49. *World Health Organization*. Geneva. 1- 207.
27. Gemmell MA & Lawson JR (1989). The ovine cysticercosis as models for research in to epidemiology and control of the human and porcine cysticercosis *Taenia solium*. Epidemiological considerations. *Acta Leidensia*. 57 (2) 165- 172..
28. Giese AC. (1973). Cell Physiology. 4th Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
29. González L. (1998). Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales producidos contra parasitos adultos de *T. solium* hacia diferentes miosinas. Tesis de licenciatura. UNIVERSIDAD LA SALLE. México.
30. Guerra G, Flisser A, Cañedo L & Lacleste JP. (1982). Biochemical and immunological characterisation of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C & Beltran, F. *Cysticercosis: Present states knowledge and perspective*. Academic Press. New York. 437- 451.
31. Gulick A & Rayment I. (1997). Structural studies on myosin II: communications between distant protein domains. *BioEssays*. 19 (7); 561- 569.
32. Harlow & Lane. (1988). Antibodies . A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory .USA. 70.
33. Holmes K. (1996). Muscle proteins-their actions and interactions. *Current Opinions in Structural Biology*. 6(6); 781- 789.

34. Katoh H, Suzuki T, Hiroi Y, Ohtaji E, Suzuki S, Yazaki Y & Nagai R. (1995a). Diagnosis of aortic dissection by immunoassay for circulating smooth muscle myosin. *Lancet*. **345**: (8943): 191- 192.
35. Katoh H, Suzuki T, Yokomori K, Suzuki S, Ohtaji E, Watanabe M., Yazaki Y & Nagai R. (1995b). A novel immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain in serum. *Journal of Immunological Methods* **185**: 57- 63.
36. Kwak J, & Yoon C. (1996). A convenient method for epitope competition analysis of two monoclonal antibodies for their antigen binding. *J Immunol Methods* **191**: 49-54.
37. Keilbach NM, de Aluja AS & Sarti EA. (1989). A programme to control taeniais-cysticercosis (*T.solium*) experiences in a Mexican village. *Acta Leidensia*. **57**: 181- 189.
38. Kimura A, Ikeda H, Yasuda S, Yamaguchi K & Tsuji T. (1995). Brain tissue identification based on myosin heavy chain isoforms. *International Journal of Legal Medicine (Germany)*. **107** (4); 193- 196.
39. Kimura A, Tsuji T, Maltosa R, Fujitami N, Ohmori K, & Matsumura S. (1991). Tissue-specific and nontissue specific heavy chain isoforms of myosin in the brain as revealed by monoclonal antibodies. *Biochemica et Biophysica Acta protein Structure and Molecular Enzymology*. **1118**: 59- 69.
40. King L, Jiang M J, Huang TS & Shev GC. (1995). Protease-susceptible sites and properties of fragments of aortic smooth -musclemyosin. *Journal of Chemistry*. **312**: 511- 518.
41. Laclette JP, Alagon A, Willms K & Torre-Blanco A. (1990). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *T. solium*. *The Journal of Parasitology*. **73**: 121- 129
42. Laclette JP, Landa A, Arcos L & Williims K. (1991). Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. **44**: 287- 296.
43. Laclette JP, Merchant MT & Willms K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen b in the metacestode of *Taenia solium* . *Journal of Parasitology*. **73**: 121- 129.
44. Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT & Willms K. (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In: Flisser A; Willms K; Laclette JP; Larralde C; Ridaura C; Beltran F. (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. USA. 375-388.

45. Laclette JP, Rodríguez M, Landa A, Arcos L, De Alba P & Mancilla (1989). The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leidensia*. 57 (2); 115- 122.
46. Laclette JP, Shoemaker CH B, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing & Nicholson-Weller A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Parasitology*. 148: 124-128.
47. Laclette JP, Skelly PJ, Merchant MT & Shoemaker Ch. B. (1995). Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization patten of paramyosin in platyhelminth parasites . *Experimental Parasitology*. 81:140- 143.
48. Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A & Shoemaker C. (1993). CDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol*. 60; 343-348.
49. Lehninger A. (1981). Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. 2nd. Edition. New York. 769.
50. Lumsden RD, Voge M & Sogandares-Bernal F. (1982). The metacestode tegument: Fine structure de velopment, topochemistry and interactions with the host . In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. USA. 307-361.
51. Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD, & Selkirk ME. (1991). *Parasite antigens, parasite antigens, parasite genes*. A laboratory manual for molecular parasitology. Ed. Cambridge University Press. UK.
52. Mc Manus DP & Smyth JD. (1984). The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Great Britain . 11:283-304.
53. Moore L, Arrizubieta M, Tidyman W, Herman L & Bandman E. (1992). Analysis of the chicken fast myosin heavy chain family. Localization os Isoform-spezifc antibody epitopes and regions of divergence. *Journal of Molecular Biology*. 225:1143- 1151.
54. Moore A, Lutwick L, Schantz P, Pilcher J, Wilson M, Hightower A, Chapnick E, Abter E, Grossman J, Fried J, Wore D, Haichou X., Hyon S, Barbour R, Antor R, Hakin A. (1995). Seroprevalence of cysticercosis in an orthodox Jewish community. *American Journal of Tropical- Medicine and Higiene*. 53: (5):439-442.

55. Newport GR, Harrison RA, McKerrow J, Tarr P, Kallestad J & Agabian N. (1987). Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. *Molecular Biochemical Parasitology*. 26:29-38.
56. Nieto D. (1982). Opening adress historical notes on cysticercosis in Flisser A *et al.* (1982). *Cysticercosis: Present states of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. 1-7.
57. NOM-021-SSA-2-1994. Para la vigilancia, prevención y control del complejo teniasis / cisticercosis en el primer nivel de atención médica. D. O. F. Tomo CDXCIV. No. 9. 31: 58-67.
58. Pearse V, Pearse J, Bochshaum M & Buschsham R. (1987). *Living invertebrates*. California. USA. Blackwell Scientific. Publ. *The Boxwood Press*. 242- 246.
59. Pinder CJ, Sleep JA, Bennett MP & Gratzler WB. (1995). Concentrated Tris Solutions for the Preparation, Depolymerization, and Assay of Actin: Application to Erythroid Actin. *Analytical Biochemistry*. 225:291-295.
60. Pollard T, Doberstein S & Zot H. (1991). Myosin I. *Annual Review Physiology*. 53: 653- 681.
61. Raghavan N, Mawa CV, Fitzgerald PC, Tuan RS, Slatko BE, Oteesen EA & Notman TB. (1992). Characterization of a muscle-associated antigen from *Wuchereria bancrofti*. *Experimental Parasitology*. 75:379-389.
62. Rayment I, Smith C & Yount R. (1996). The active site of myosin. *American Review of Physiology*. 58: 671- 702.
63. Ridaura C. (1989). Cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México. Flisser A & Malagon F. Eds. Limusa- Noriega. México. 125- 127.
64. Rodríguez del Rosal E, Correa D, Flisser A. (1989). Swine cysticercosis: Detection of parasite products in serum. *Veterinary Record*. 124, 488.
65. Roitt I, Brostoff J & Male D. (1993). *Inmunología 3ª*. Ed. Masson - Salvat Medicina. 6.1-6.14.
66. Rosser BWC, Wick M, Waldbillig DM & Bandman E. (1996). Heterogeneity of myosin heavy- chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochemical of Cell Biology*. 74:715-728.

67. Ruppel KM & Spudich JA. (1995). Myosin motor function structural and mutagenic approaches. *Current Opinions in Celular Biology Cytoskeleton*. 7: 89-93.
68. Sarti E. (1997). La tenioiss y la cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*. 39 (3); 225-231.
69. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Lopez AS, Roberts J, & Flisser A. (1992). Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis in humans and pigs in a village in Morelos. México, *American Journal of Tropical Medicine Higiene*. 46: 677-684.
70. Sarti-Gutierrez EJ, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gómez Dandoy H, & Flisser A. (1988). *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis in a Mexican village. *Tropical Medicine and Parasitology*. 39: 194-198.
71. Sarti E, Flisser A, Schantz P, Gleizer M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M & Wijeyaratne P. (1997). Development and evaluation of a health education intervention a gainst. *Taenia solium* in a rural community in México. *Am J Trop Med Hyg*. 56 (2); 127-132.
72. Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL & Hartman BJ. (1992). Neurocysticercosis in a northodox jewish community in New York city, New England. *Journal of Medicine*. 372: 692-65.
73. Schantz PM. & Sarti E. (1989). Diagnostic methods and epidemiological surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia*. 57:181-189.
74. Schenone H, Villaroel F, Rojas A & Ramírez R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America, in *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. 25-38.
75. Sellers J, Goodson H & Wang F. (1996). Amyosin family reunion. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 17: 7- 22.
76. Slais J. (1982). Morphology of the colex of cisticercus cellulosae in brain cysticercosis. En Flisser A *et al.* (1982). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. 235-260.
77. Smyth JD & Mc Manus DP. (1989). *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press. Melbourne, Australia. 115: 189- 194.

78. Solc C, Derfler B, Duyk G & Corey D. (1994). Molecular cloning of myosins from the bullfrog saccular macula: a candidate for the hair cell adaptation motor. *Aud Neuros.* 1: 63- 75.
79. Soulsby E.J.L. (1974). Parasitic zoonoses. Clinical and Experimental Studies. *Academic press.* New York. 199-201.
80. Sprent J.F.A. (1969). Helminth. In Soulsby E.J.L. Parasitic zoonoses. Clinical and experimental studies. *Academic Press.* New York. 200.
81. Stryer L. (1988). Bioquímica. Tomo I. 3ª Ed. Reverte, Barcelona. 43-47.
82. Sweeney H. (1996). Special topic: Molecular motors of eukaryotic cells. *American Review of Physiology.* 58: 671- 702.
83. Titus M. (1997). Unconventional myosins: new frontiers in actin- based motors. *Cell Biology.* 7: 119- 123.
84. Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 76:4250-4354.
85. Toyoshima Y.Y, Kron S.J, McNally E.M, Niebling K.R, Toyoshima C.H & Spudich J (1987). Myosin Subfragment-1 Sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature.* 328:526-539.
86. Vianna L.G, Macedo V & Costa J.M. (1991). Cisticercose musculo cutanea e visceral-doen carara. *Rev. Inst. Trop.* (Sau Paulo). 33: 129- 136.
87. Villagran- Uribe J, Olvera- Rabiela. (1989). La cisticercosis en el material de autopsia del hospital general de México. En cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México. Flisser A. & Malagon F, Eds. Limusa- Noriega. México. 97-105.
88. Voet D & Voet J. (1990). Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona. 50, 81, 192-194.
89. Warrick H & Spudich J. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *American Review of Cell Biology.* 3: 379- 421.
90. Wright A.F, Jackson Y. (1996). Myosin diversity and disease. *Elsevier Science.* 12: (6):206-209.

91. Yoshino K. (1933). Studies on the post- embryoral development of *Taenia solium*, Part III on the development of cysticercus cellulosae within the definite intermediate host. *Journal of Medicine Assn Formosa.* **32**; 166- 169.
92. Zenteno- Alanis G. (1982). A classification of human cysticercosis in Flisser, A., *et al.* (1982). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Academic Press : New York. 107- 126.