

55



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"Miosina de cisticerco de Taenia solium como
producto de excreción / secreción in vitro
e in vivo"**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

VICTOR MANUEL REYES NICOLAS

**ASESOR:
MIBB JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNANDEZ**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

2000

A.S. 05-66



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Miosina de cisticerco de Taenia solium como producto
de excreción/secreción in vitro e in vivo".

que presenta el pasante: Reyes Nicolás Víctor Manuel
con número de cuenta: 9106778-0 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de enero de 2000

PRESIDENTE	MVZ. Pablo Martínez Labat	
VOCAL	MVZ. Angel G. Martínez Sosa	
SECRETARIO	MIBB. Javier Ambrosio Hernández	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	

El presente trabajo de tesis se realizó gracias al apoyo económico de las Comunidades Económicas Europeas y DGAPA con el numero de proyecto IN200297; y bajo el apoyo técnico de la Q.F.B. Mayra Yolanda Cruz Rivera y la Biol. Olivia Reynoso Ducoing del Laboratorio de la Dra. Ana Flisser S.

INDICE

	página
INDICE DE FIGURAS.	I
INDICE DE ABREVIATURAS.	II
RESUMEN .	III
INTRODUCCIÓN .	IV
CAPITULO I.MARCO TEÓRICO .	
1. Enfermedad Parasitaria .	1
1.1. Clasificación taxonómica .	3
1.2. Morfología de <i>T. solium</i> .	4
1.2.1.Fase de huevo .	4
1.2.2.Metacéstodo o cisticerco .	6
1.2.2.1. Desarrollo de los cisticercos en el hospedero .	7
1.2.3.Fase adulta .	8
1.3. Ciclo de vida .	10
1.4. Relación Hospedero-Parásito .	13
2. El citoesqueleto de los céstodos .	14.
2.1. Proteínas estructurales .	14
2.2. Citoesqueleto .	14
2.3. Paramiosina .	15
2.4. Actina .	16
2.5. Miosina .	17
CAPITULO II . PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
CAPITULO III . HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .	23
CAPITULO IV . MATERIAL Y MÉTODOS.	
4.1. Cisticercos de <i>Taenia solium</i> .	24
4.1.1. Obtención de parásitos.	24
4.1.2. Mantenimiento en cultivo <i>in vitro</i> .	24
4.1.3. Obtención de fluido vesicular.	25
4.2. Anticuerpos monoclonales 4B3.	25
4.2.1. Producción.	25
4.2.2. Evaluación del reconocimiento .	26
4.3. Miosina de cisticercos.	27

4.3.1. Aislamiento y purificación.	27
4.3.1.1. A partir de parásitos.	27
4.3.1.2. A partir de fluidos biológicos.	28
4.3.1.2.1. Extracción salina .	28
4.3.1.2.2. Captura de miosina por AcM 4B3 .	28
4.4. Evaluación de las miosinas.	29
4.4.1.1. Inmunopunto.	29
4.4.1.2. ELISA.	29
4.4.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	30
4.4.1.3.1. Geles convencionales.	30
4.4.1.3.2. Geles con EDTA/glicina	31
4.4.1.4. Inmunoelctrotransferencia.	31
4.4.1.5. Determinación de la actividad de ATPasa.	32
4.5. Miosina en fluido vesicular.	34
4.6. Miosina en sobrenadantes de cultivos.	34
4.7. Miosina en sueros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes humanos y de cerdos.	34
4.8. Diagrama de flujo.	35

CAPITULO V . RESULTADOS.

5.1. Miosina de cisticercos.	36
5.1.1. Evaluación de pureza y reconocimiento por anticuerpo monoclonal 4B3 .	36
5.1.2. Análisis de la miosina purificada por electroforesis en geles de EDTA/glicina .	38
5.2. Miosina en fluido vesicular	40
5.3. Miosina en sobrenadantes de cultivo	41
5.3.1. Cinética de liberación de miosina .	41
5.3.2. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina liberada in vitro por cisticercos de <i>T. solium</i> .	44
5.3.3. Análisis electroforético de la miosina liberada .	45
5.4. Miosina en sueros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes humanos y de cerdos.	49
5.4.1. Detección de miosina liberada por cisticercos en fluidos biológicos .	49
5.4.2. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina purificada de fluidos biológicos .	50
5.4.3. Electroforesis de miosina purificada de suero de cerdo infectado .	52

CAPITULO VI . DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1. Evaluación de la purificación y del reconocimiento de la miosina por AcM 4B3 .	53
---	----

6.2. Análisis de la miosina purificada por electroforesis en geles de EDTA/glicina .	54
6.3 Miosina en sobrenadantes de cultivo .	56
6.3.1 Cinética de liberación de miosina en cultivo parasitario .	57
6.3.2 Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina liberada en cultivo in vitro	58
6.3.3 Análisis electroforético de la miosina liberada .	58
6.4 Miosina parasitaria en fluidos biológicos de hospedero infectado .	60
6.4.1 Detección de miosina en fluidos biológicos .	60
6.4.2 Purificación de miosina a partir de fluidos biológicos .	60
6.4.3 Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina purificada de fluidos biológicos .	61
CAPITULO VII. CONCLUSIONES .	62
CAPITULO VIII .PERSPECTIVAS.	63
APÉNDICE .	65
Determinación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford .	65
Determinación de fósforo inorgánico (Pi) para actividad de ATPasa .	66
Electroforesis en geles de poliacrilamida .	67
Electroforesis en geles de poliacrilamida con glicina .	67
Preparación de geles y corrimiento electroforético .	67
Tinción con azul de Coomassie .	69
Tinción con plata .	69
Tinción inversa con Zinc-Imidazol .	69
Inmunoelectrotransferencia .	70
Técnica de ELISA .	71
Inmunopunto	73
Purificación de miosina circulante en fluidos biológicos de hospedero infectado	74
REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRAFICAS .	75

INDICE DE FIGURAS .

Figura		Pág
1	Huevos de <i>T.solium</i>	5
2	Morfología del metacéstono de <i>T.solium</i> .	6
3	Morfología del parásito adulto de <i>T.solium</i> .	8
4	Ciclo de vida de <i>T.solium</i> .	12
5	Estructura de una miosina convencional tipo II.	18
6	Origen de las isoformas de miosina por corte y empalme de genes.	19
7	Microscopía electrónica de la miosina.	20
8	Evaluación de la purificación de miosina de parásito de <i>T.solium</i> .	36
9	Miosinas de <i>T.solium</i> en geles con glicina/edta.	38
10	Identificación con la técnica de ELISA de miosina en líquido vesicular de cisticerco de <i>T.solium</i> cultivados in vitro.	39
11	Detección de miosina liberada en cultivo por el metacéstono de <i>T.solium</i> por inmunopunto y usando AcM 4B3.	40
12	Cinética de liberación de miosina por cisticerco de <i>T.solium</i> .	42
13	Determinación de la actividad ATPasa de la miosina liberada por cisticerco de <i>T.solium</i> .	43
14	Electroforesis en geles con glicina de los sobrenadantes de cultivo parasitario de cisticerco de <i>T.solium</i> .	45
15	Inmunolectrotransferencia para identificar el reconocimiento de miosina liberadas en medios de cultivo por diferentes Ac.	46
16	Inmunolectrotransferencia de miosinas provenientes de cultivos parasitarios.	47
17	Detección por ELISA de miosina de <i>T. solium</i> en fluidos biológicos.	48
18	Actividad de ATPasa de miosina purificada de fluidos de cerdo infectado.	50
19	Análisis en gel con glicina de miosina purificada por captura con AcM 4B3 a partir de suero de cerdo infectado.	51

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .

Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcTAcO	Ácido tricloro acético
Ag	Antígeno
AgB	Antígeno B Paramiosina
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
BDM	2,3 butanediona monoxima
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa (del inglés Enzyme Linked Immunoasorbent Assay)
CLE	Cadena ligera esencial
CLR	Cadena ligera regulatoria
DMSO	Dimetil sulfóxido
DAB	5 5' Diaminobenzidina
DSS	Dodecil sulfato de sodio
DTT	Ditiotreitol
IET	Inmunoelectrotransferencia
IMP	Inmunopunto
LCR	Líquido cefalorraquídeo
SNC	Sistema nervioso central
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos
SAF-KCl	Solución amortiguadora de fosfatos con KCl
OPD	orto fenilendiamina
Pi	Fósforo inorgánico
PVDF	Polivinildifluoruro

RESUMEN

La miosina es una proteína dimérica de 400 kDa, con actividad enzimática de MgATPasa dependiente de actina. Su función biológica se encuentra asociada con movilidad celular y muscular. Se ha logrado detectar miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en fluidos biológicos del modelo experimental de hámster dorado y en sobrenadantes de cultivos parasitario, por lo que en el presente proyecto se desea saber si esta proteína también es liberada por los cisticercos. La miosina de los cisticercos de *T. solium* fue purificada por precipitación salina con KCl 0.06M, analizada electroforéticamente y por inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo monoclonal 4B3 el cual reconoce únicamente a miosinas de ténidos. Se realizó el cultivo de 80 cisticercos de cerdo (40 de cerebro y 40 de músculo) durante 26 h en condiciones normales y en condiciones de evaginación (en presencia de bilis de cerdo) para estudiar la cinética de liberación de miosina. La técnica de ELISA directa usando AcM 4B3 fue empleada para cuantificar la miosina liberada, los cisticercos cultivados en presencia de bilis presentaron un incremento notorio de miosina liberada (hasta 6 µg/cisticerco), con alta actividad ATPasa y tres isoformas diferentes, mientras que los cisticercos recuperados de cerebro y músculo cultivados en condiciones normales mantuvieron una cantidad casi constante de liberación de miosina (3 µg/cisticerco), poca actividad ATPasa y una sola isoforma. También se detectó por ELISA la miosina del parásito, en fluidos biológicos de cerdos infectados (suero y LCR), pero no en humanos infestados.

Según los resultados obtenidos, fue posible la detección de miosina de los parásitos, tanto en sobrenadantes de cultivo como en algunos fluidos biológicos de animales infectados de manera natural. La proteína se encuentra íntegra y con actividad biológica además de que podría haber inducción de liberación de isoformas por las condiciones de cultivo, todo ello podría tener utilidad en la detección de los parásitos vivos.

INTRODUCCIÓN.

En México se reconoce a la cisticercosis y la teniosis causadas por *Taenia solium* como problemas importantes de salud pública, debido a su alta prevalencia. El estadio adulto del parásito es el causal de la teniosis, la cual puede pasar inadvertida debido a los síntomas tan ligeros que presenta; mientras que la cisticercosis es ocasionada por la fase larvaria o de metacéstodo, puede ser incapacitante cuando se localiza en el sistema nervioso central. Como en la mayoría de las parasitosis, la propagación de la enfermedad se debe principalmente a los malos hábitos de alimentación e higiene de la población, así como de insuficientes recursos en salud pública y el desarrollo urbano de la zona.^{3, 4, 8, 97 y 40}

De *T. solium* se conoce bastante en cuanto a su morfología, su ciclo de vida, de algunos de sus antígenos inmunodominantes como el antígeno B o paramiosina, la respuesta inmune de los hospederos, algunas proteínas importantes como son las glicoproteínas y proteasas, etc. Pero, no existen muchos antecedentes en lo relacionado a eventos y mecanismos de proteínas liberadas que utilizan tanto en la fase larvaria como en el adulto y gracias a ello puedan sobrevivir dentro de su hospedero por tan largos periodos.^{22, 42, 47, 59, 63, 64 y 77}

El presente proyecto de tesis surge como consecuencia de los estudios de caracterización molecular de una proteína muscular, la miosina tipo II o convencional, de *T. solium*, los cuales han sido hechos mediante anticuerpos monoclonales y policlonales específicos. Así como la determinación de la actividad enzimática de ATPasa dependiente de actina que presentan las miosinas. Con los estudios inmunoquímicos se logró la localización a nivel muscular del tejido parasitario además de su detección en materia fecal y sueros de hámsters infectados experimentalmente también se logró detectar la proteína.

Debido a las evidencias de que la miosina, a pesar de ser una proteína estructural, se planteó la posibilidad de demostrar que la miosina puede ser un producto de liberación (denominados también de excreción - secreción) de los parásitos, y debido a la relativa facilidad para obtener y mantener en condiciones in vitro los cisticercos se buscó él utilizarlos como modelo de investigación para el estudio de la miosina liberada. Por ello el proyecto se propuso efectuarlo en dos pasos: el primero consistió en demostrar que la proteína podía ser detectada en cultivo parasitario, mediante técnicas electroforéticas, inmunoenzimáticas y bioquímicas. Mientras que el siguiente paso sería el adaptar estas mismas técnicas para demostrar su presencia de miosina en fluidos biológicos del hospedero intermediario.^{6, 25 y 75}

La importancia de demostrar a la miosina como producto de liberación por parte de estos parásitos radica en que además de ser algo novedoso en el campo de la cisticercosis, ello podría tener aplicaciones diagnósticas muy interesantes.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1. ENFERMEDAD PARASITARIA.

Las enfermedades producidas por *Taenia solium* son dos: teniosis y cisticercosis, la primera es una enfermedad asintomática de diagnóstico difícil, mientras que la segunda puede llegar a ser una enfermedad muy seria. Estas enfermedades producidas por *T. solium* son consideradas parte de los problemas más importantes de salud pública en México.^{38 y 44}

La teniosis que también puede ser ocasionada por *Taenia saginata*, como se mencionó es una parasitosis asintomática y su diagnóstico clínico no es fácil, porque pueden presentarse síntomas ligeros como son debilidad, estreñimiento, anorexia, disminución de peso y algunas cefaleas, a diferencia de la cisticercosis la presencia de este parásito adulto no representa peligro alguna para la integridad del hospedero definitivo, sin embargo un portador de tenia favorece el mantenimiento del ciclo de vida de *T. solium* y por ello pudieran presentarse muchos casos más de cisticercosis. Sólo los cisticercos de *T. solium* pueden causar cisticercosis tanto en humanos como en el cerdo.^{4, 40, 41 y 97}

Un diagnóstico y tratamiento oportunos a un individuo infestado con tenia es importante para el control adecuado de la cisticercosis, ya que un solo parásito adulto que habite en el intestino cuando pierde un solo proglótido grávido que contienen hasta 60,000 huevos infectivos, mismos que al ser expulsados en las heces de la persona, pueden infestar tanto al hombre como al cerdo. Los resultados obtenidos en diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que existe una alta asociación entre individuos cisticercosos y portadores de tenia. Lo cual muestra el alto riesgo de convertirse en un enfermo de cisticercosis cuando se convive con un portador de tenia, esto habla de la estrecha relación entre las dos parasitosis y que esta dada por otros factores que favorecen la presencia de la parasitosis como son los de tipo social, en las que influyen las costumbres de la localidad y los hábitos higiénicos-dietéticos de la población.^{4, 40, 47, 97 y 98}

Con la idea de mejorar el diagnóstico convencional mediante exámenes coproparasitológicos, se desarrolló un método de captura de antígenos de tenia contenidos en las heces de los animales infectados experimentalmente, así como de personas enfermas. Este método, aunque muestra

cierta inespecificidad al no diferenciar a *T. solium* de *T. saginata*, permite un alto grado de sensibilidad durante períodos prepatentes y ello es de gran valor para el diagnóstico como para el monitoreo de la infección durante el tratamiento ya que solo los parásitos vivos producen más Antígenos (Ag's).^{1, 2, 3, 22 y 30}

Como fue mencionado, desde el punto de vista clínico, la cisticercosis tiene mayor trascendencia en la salud cuando se presenta a nivel del Sistema Nervioso Central, ya sea en el cerebro (conocida como neurocisticercosis) o en el globo ocular. El daño que los parásitos producen en estos sitios puede estar relacionado con un daño mecánico o por la reacción inflamatoria que se da por ellos, interrumpiendo así alguna función cerebral importante y relacionada con el sitio en donde se encuentre el parásito. Estos hechos hacen necesario el realizar un pronto diagnóstico y tratamiento, porque la cisticercosis puede convertirse en una causa de muerte o incapacitar al individuo de manera irreversible. En la neurocisticercosis los parásitos pueden alojarse en diferentes sitios como el espacio subaracnoideo, en los ventrículos cerebrales y en el parénquima en donde pueden afectar al cerebro o a la médula espinal; esa misma distribución parece afectar la forma y dimensiones del parásito: los recuperados de los ventrículos y los subaracnoideos tienden a ser los de mayores dimensiones y frecuentemente multilobulados (forma racemosa) mientras que los parenquimatosos por lo general son vesículas únicas.^{13, 40, 103 y 105}

El problema clínico más grave se deriva de reacciones inflamatorias de las meninges u obstrucciones en el flujo de líquido cefaloraquídeo con aumento subsecuente de la presión intracraneana.⁹⁴

1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La clasificación taxonómica de *Taenia solium* es la siguiente: ⁸

Phylum Platyhelminthes. Por ser organismos pluricelulares generalmente en forma de hoja o de cinta y con simetría bilateral. Estos parásitos presentan ciclos evolutivos complejos, con estadios larvarios diferentes a la fase adulta en morfología y funcionalidad.

Clase Cestoidea. Porque su estadio adulto es hermafrodita, presentan un escólex provisto de ventosas y de ganchos, además de cuello y estróbilo .

Subclase Eucestoda. El parásito adulto presenta órganos genitales masculinos y femeninos y la oncósfera tiene una corona de 6 ganchos.

Orden Cyclophyllidae. 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. 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. Son aplanados dorsoventralmente y semejantes a cintas.

Especie solium. Por ser un parásito de humanos y los individuos infestados generalmente sólo contienen un ejemplar.

1.2. Morfología de *Taenia solium*.

T. solium presenta tres estadios de desarrollo que son: huevo, cisticercos o metacéstodo y parásito adulto o tenia; la teniosis que es enfermedad causada por los parásitos adultos, se conoce desde los tiempos de Hipócrates; en 1856 Kurchenmeister completó el ciclo biológico infectando a un presidiario con cisticercos, monitoreó la infestación y a los cuatro meses recuperó la *Taenia solium* adulta mediante tamizajes de materia fecal.⁶³

La forma adulta o tenia es llamada comúnmente "solitaria" y la forma de larva o metacéstodo es conocida como cisticerco, "tomatillo", "granillo" ó "zahuate", entre tantas denominaciones, debido al aspecto tan característico que le da a la carne de cerdo.⁴

1.2.1. Huevo.

Los huevos infectivos miden aproximadamente 30 μm de diámetro, se caracterizan por ser altamente pegajosos y resistentes al medio ambiente, ya que dentro o fuera de los proglótidos, se mantienen viables e infectantes por semanas o meses en suelos húmedos y sombreados. Están constituidos por una capa celular llamada vitelo, a través de la que obtienen nutrientes indispensables para la sobrevivencia del embrióforo antes del fenómeno de eclosión. El vitelo rodea al embrióforo y es la capa más susceptible al medio ambiente, mientras que el embrióforo el en cambio es muy resistente y está formado por una serie de tabiques llamados bloques embriofóricos constituidos de queratina y los cuales se encuentran unidos entre sí por una sustancia de cemento. Al interior de la cavidad formada por estos bloques se encuentra la membrana oncosférica que cubre a la oncosfera o embrión hexacanto, llamado así porque posee tres pares de ganchos.^{23, 37 y 102}

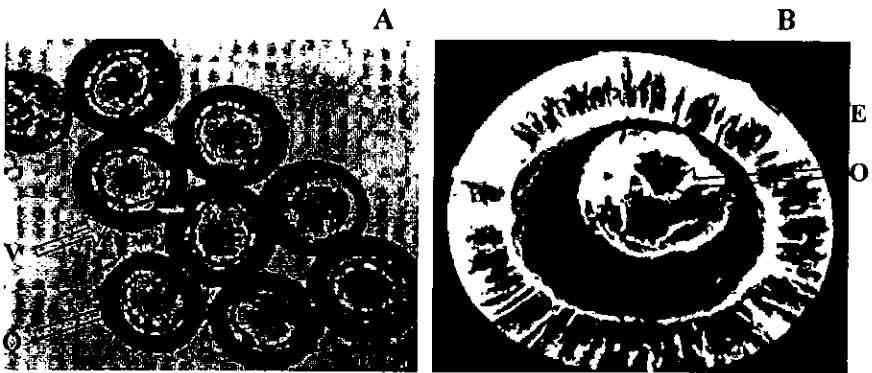


Figura 1 . Huevos de *T. solium*.: A) Microscopia de luz y B) Microscopía electrónica de barrido de huevos de *T. solium* donde se observan (O)oncósferas (V) vitelo y (E) embrióforo.⁶⁶

1.2.2. Metacéstodo.

Los cisticercos están constituidos por una vesícula de un diámetro aproximado de 0.5 a 2 cm ovalada y translúcida llena de un líquido denominado fluido vesicular. En uno de los lados de la vesícula, dentro del fluido vesicular se encuentra el escólex invaginado (Fig2) y bajo condiciones ambientales propicias del hospedero como son temperatura, presión de CO₂, enzimas, etc., puedan dar lugar al desarrollo del parásito adulto.^{38, 72 y 103}

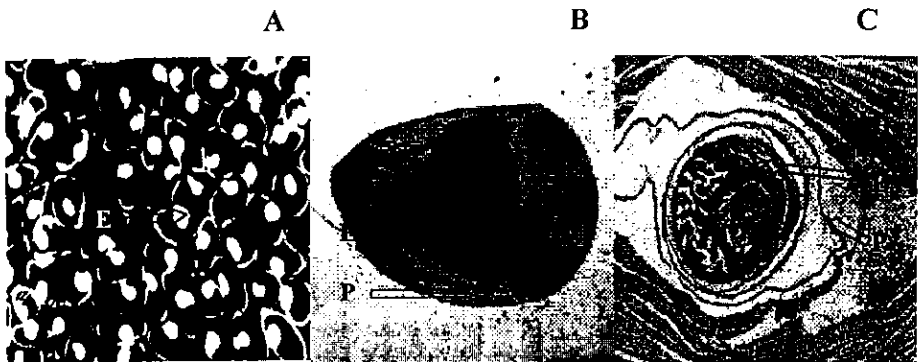


Figura 2. Morfología del metacéstodo o cisticercos. A) Parásitos recuperados de carne de cerdo (Imagen proporcionada por M en C. Guillemina Ávila), B) Dentro la pared vesicular se encuentra el escólex invaginado del cual bajo condiciones propicias del hospedero, da lugar al desarrollo del parásito adulto, C) Corte semifino de un cisticercos en el tejido muscular del hospedero intermediario, se puede observar con suma facilidad la íntima relación existente entre el tejido del parásito y el del hospedero. Se muestra (E) escólex, (P) pared vesicular y (H) tejido muscular del hospedero.³⁸

1.2.2.1. Desarrollo de los cisticercos en el hospedero.

Es común encontrar a las vesículas adoptando diversos aspectos macroscópicos, los que suelen interpretarse como fases secuenciadas del ciclo de vida del parásito.

- A) Etapa vesicular o quística. El parásito tiene membrana bien definida y el líquido vesicular con el escólex invaginado en su interior. Aparentemente esta es la etapa más temprana reconocible en el examen anatomopatológico.
- B) Etapa coloidal. La membrana de la vesícula muestra engrosamiento al examen microscópico, con formación de cápsula conectiva secundaria que la rodea, siendo fácil identificar las dos cápsulas, una del parásito y otra del tejido conectivo del hospedero. El contenido deja de ser líquido transparente y adopta el de sustancia gelatinosa blanquecina de aspecto hialino, el escólex puede ser identificado dentro de la vesícula.
- C) Etapa nodular granular. El cisticercos aparece en forma de nódulo, reducido posiblemente de su tamaño inicial, todavía encapsulado pero el escólex ya es reconocible fácilmente confundiendo con el resto del contenido del nódulo.
- D) Etapa nodular calcificada. El parásito se ve reducido a un nódulo calcificado totalmente y envuelto en una cápsula de tejido conectivo de espesor variable, no se conocen las etapas que corresponden al período previo a la formación de la vesícula.

1.2.3. Parásito adulto.

La tenia, habita de manera natural en el yeyuno del humano y mide entre 1.5 a 5 metros de longitud. En el extremo anterior del parásito se encuentra el escólex o cabeza, de aproximadamente 1 mm de diámetro, el cual cuenta con un rostelo armado, con una doble corona de ganchos grandes y pequeños (22-36 ganchos) y 4 ventosas las cuales actúan como órganos de fijación y quienes favorecen el anclaje del parásito en la pared del yeyuno. Estos órganos de fijación son ricos en tejido muscular y son controlados por un sencillo sistema nervioso formado por ganglios.^{40 y 41}

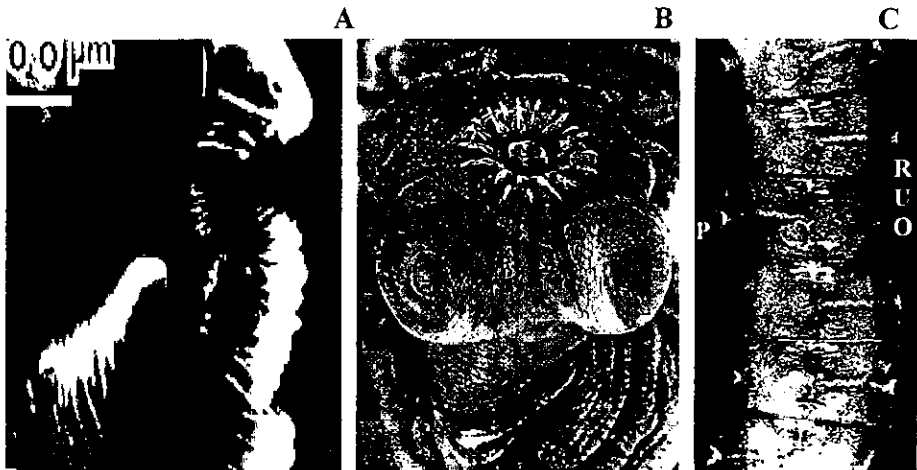


Figura 3. Morfología del parásito adulto de *T. solium*. A) Microscopía electrónica de barrido, muestra el escólex de un cisticerco de *T. solium* recién evaginado. B) La microscopía electrónica de barrido muestra el escólex constituido de la parte cefálica del parásito, rostelo armado con doble corona de ganchos (aún con restos de tejido del intestino del hospedero en sus ganchos) y las cuatro ventosas (Imagen tomada por el Dr. Amador Glea). C) Morfología de proglótidos pregrávidos de *Taenia solium* recuperados de un gerbo con 11 semanas post infección, (P)poro genital, (R)ramas uterinas, (U) útero y (O) ovarios.^{4, 17 y 74}

Las tenias habitan únicamente en el intestino delgado de los humanos en donde llegan sobrevive hasta 25 años. Una vez que el escólex o cabeza, se fija en el intestino a partir del cuello se producen los proglótidos. El conjunto de proglótidos unidos entre sí se denomina estróbilo y mientras los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados, los más distantes están totalmente diferenciados y contienen un gran número de huevos, por lo que se les da el nombre de grávidos.¹³

Esta segmentación genera una cadena estrobilar o estróbilo, en la cual cada segmento se denomina proglótido. Cuando cada proglótido se aleja del escólex cambia de tamaño y se hace más grande y genera tres diferentes tipos: proglótidos inmaduros, maduros y 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, los maduros en los que sus órganos reproductores son funcionales ya que se considera una unidad reproductora independiente porque posee órganos genitales masculinos y femeninos. Un proglótido grávido tiene semejanza a un saco lleno de huevos en un número aproximado de 30 000 a 50 000.^{13 y 105}

1.3. Ciclo de vida.

De las tres fases parasitarias de *T. solium*, dos se presentan en el hospedero definitivo y una en el intermediario; el hombre es el hospedero definitivo de *T. solium* porque en él se desarrolla la fase adulta del parásito, capaz de llevar a cabo la reproducción sexual. El hombre también puede alojar a los cisticercos pero el hospedero intermediario natural es el cerdo. El metacéstodo se aloja a nivel muscular o de SNC tanto en el hospedero intermediario como en el definitivo, aunque el cerdo es el principal hospedero intermediario de *T. solium*, algunas otras especies (perro, mono, gato, entre otros mamíferos), incluyendo al hombre, también pueden alojar a los cisticercos).^{4 y 97}

Un portador de tenia en sus heces desprende espontáneamente los proglótidos grávidos (promedio de 4-5/día). Generalmente, la primera expulsión de proglótidos ocurre entre 62 y 72 días después de la infección, cuando el parásito mide alrededor de 220 cm de largo. En el caso de los huevos estos pueden ser expulsados por los proglótidos o bien pueden ser liberados cuando los proglótidos excretados por el hospedero sufren putrefacción y liberan contenido. Los huevos, una vez liberados al medio ambiente, frente a factores de riesgo tales como la mala higiene en la preparación de alimentos, pueden facilitar la infección del hospedero definitivo para que desarrolle cisticercosis o bien alcanzar al hospedero intermediario si este ingiere la materia fecal con huevos infectivos.⁴⁴

Cuando los huevos ingeridos han alcanzado el tubo digestivo del hospedero intermediario, la acción de las enzimas proteolíticas y las sales biliares activan las oncósferas (también denominadas como embrión hexacanto), contenidas en los huevos. Las oncósferas activadas penetran en la mucosa intestinal del hospedero hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos, mecanismo mediante el cual se distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos, tales como el tejido subcutáneo, el músculo cardíaco, el cerebro, los ojos, etc. Aunque todavía no se conocen exactamente los eventos que ocurren después de la penetración de las oncósferas, pero lo que se sabe es que después de eclosionar el huevo el embrión con ayuda de sus ganchos articulados penetra el epitelio del intestino y luego por medio del torrente sanguíneo, estas formas

parasitarias llegan al lugar donde se alojaron hasta convertirse en un cisticerco. Este evento dura al menos 10 semanas y los cisticercos resultantes pueden alcanzar un tamaño de 0.5-2cm de diámetro. De esta manera es como se les puede encontrar infestando al cerdo. ^{4, 61 y 103}

El ciclo de vida se cierra cuando el humano ingiere carne cruda o insuficientemente cocida y que proviene de un cerdo cisticercoso. Luego como en el caso de los huevos, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, inducen a que los cisticercos evaginen y por medio de los ganchos y ventosas de la parte cefálica del escólex hay fijación en la pared intestinal del yeyuno y comienza a crecer hasta que logran desarrollarse en tenias de proglótidos grávidos. Este desarrollo de las tenias se presenta dentro de un período aproximado de 4 meses, momento en el cual empiezan a perder proglótidos grávidos. ^{17 y 117}

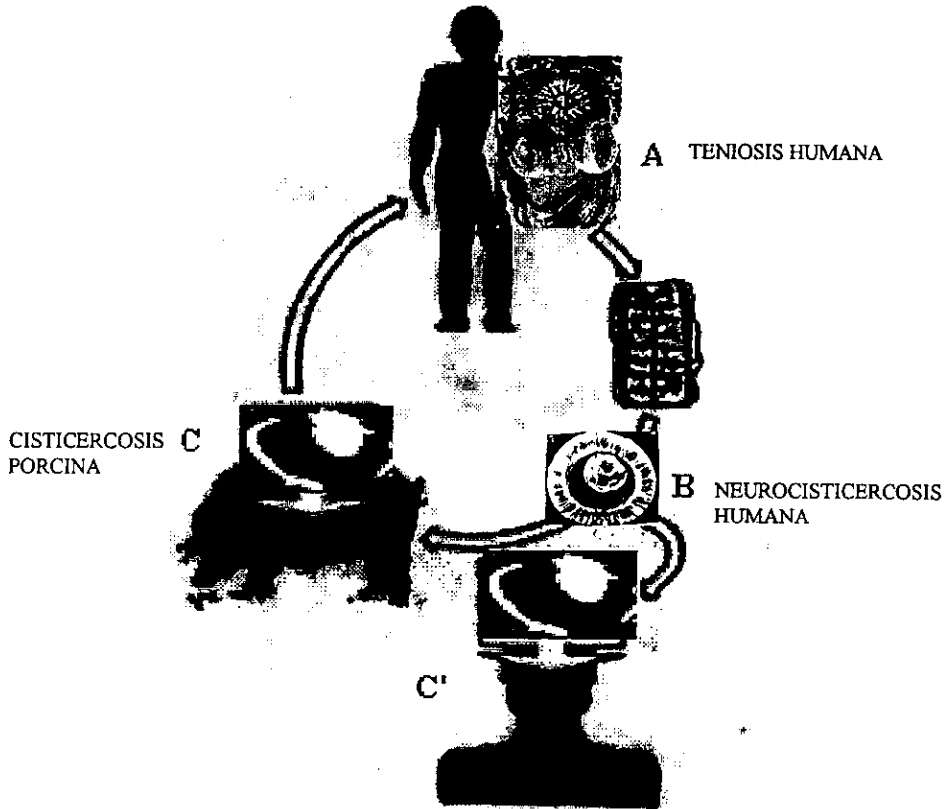


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. A; Parásito adulto en el hombre (hospedero definitivo). B; Huevo. , C y C'; Larva en el cerdo (hospedero intermediario y accidental respectivamente). Modificado de Flisser, 1989. Se muestran algunas de las enfermedades producidas por los parásitos .

1.4. La relación hospedero-parásito.

La relación hospedero-parásito en la parasitosis por *T. solium* es un fenómeno interesante que se presenta ya que, algunos de los hospederos infestados de cisticercosis son capaces de sobrevivir con una carga parasitaria considerable. Además dado que el parásito intenta permanecer viable hasta que llega a su hospedero intermediario y conseguir con ello desarrollarse hasta parásito adulto. De igual manera, resulta intrigante el que las tenias puedan lograr sobrevivir en un microambiente altamente adverso como lo presenta el intestino delgado de su hospedero. Aunque se desconocen los mecanismos exactos por los cuales los parásitos logran sobrevivir dentro de su hospedero, existe la posibilidad de que productos liberados por ellos faciliten tal adaptación, como ha sido propuesto para la paramiosina de los cisticercos.^{64 y 68}

Independientemente de lo que se conozca o se proponga, es claro que los parásitos han logrado establecer una simbiosis adecuada con su hospedero, y es gracias a ello que los parásitos mantienen su capacidad de infestación con lo que logran evadir los mecanismos de defensa mecánicos e inmunológicos del hospedero y es más manipularlos. Un ejemplo de ello son los resultados obtenidos con cisticercos de *T. crassiceps*, en donde se demostró que los parásitos tienen la capacidad de alterar la inmunidad dirigida en su contra, ya que pueden ingerir y degradar con proteasas a los anticuerpos producidos en contra de los parásitos.^{5, 13 y 114}

A diferencia de algunos conocimientos que se tienen dentro de la relación hospedero-parásito con los cisticercos, para las tenias aún no hay estudios semejantes.

1.2. EL CITOESQUELETO.

1.2.1. Proteínas estructurales.

Poco es el conocimiento que se tiene del citoesqueleto de los céstodos , la mayor parte de evidencias al respecto se han logrado mediante tinciones tejido específicas , principalmente realizadas en cisticercos , pero no hay muchos estudios con proteínas purificadas o plenamente caracterizadas . ^{12, 47, 62, 65 y 66}

La queratina es una de las proteína más estudiadas, se sabe que es rica en azufre y se encuentra en ganchos y embrióforos de ténidos. La colágena es otra proteína estructural, que es muy abundante en los mamíferos , ha sido caracterizada en las larvas de *Bothriocephalus scorpii* , *Nybelina spp.* y cisticercos de *Taenia solium* . En el caso de estos últimos, se ha visto que es similar a la de los vertebrados aunque en su composición de aminoácidos es diferente ya que la colágena de cisticercos no contiene hidroxiprolina .Esta proteína tiene una longitud de 280 nm con un peso molecular de 300 kDa ,y está conformada de tres subunidades de 100 kDa cada una .¹⁰³

1.2.2. Citoesqueleto de céstodos .

Las proteínas tienen un gran número de funciones celulares en los céstodos como son dar soporte estructural (citoesqueleto), la formación de sistemas contráctiles y transporte molecular, adicionalmente pueden actuar como hormonas, algunas son toxinas,antígenos, enzimas del metabolismo.^{62, 64, 82, 103 y 118}

En cuanto a proteínas del citoesqueleto, en céstodos se sabe poco pero se han estudiado a la paramiosina de *T. solium* y *Schistosoma mansoni* (dímero de 220 kDa) las cuales son altamente homólogas, además en *E. granulosus* se ha estudiado la tubulina (50 kDa) que conforma a los microtúbulos que son estructuras esenciales en procesos como mitosis, movilización de organelos y transporte de vesículas de excreción .^{62, 64, 82, 103 y 118}

Los organismos eucariotas emplean principalmente tres proteínas motoras para convertir la energía química proveniente de la hidrólisis de ATP en movimiento mecánico del citoesqueleto.

Estas proteínas son: miosina, cineína y dineína para quienes se ha descrito otras funciones biológicas.^{93, 96, 99, 101 y 116}

Con relación a la motilidad , se sabe que la base está determinada principalmente por la interacción entre los filamentos de la actina y los dímeros de miosina .Se sabe que la interacción actina miosina es la que determina el movimiento y dirección.^{28 y 90}

De la paramiosina o Ag B de *T. solium*, la mas estudiada de las proteínas musculares de parásitos céstodos (ver más adelante), de tal manera que ya es conocida su secuencia total de aminoácidos. En el caso de la miosina y actina a pesar de ser proteínas abundantes e importantes para las actividades musculares de todos los organismos vivos, aún no han sido caracterizadas en los céstodos , por lo que su papel en la relación huésped - parásito es desconocido .Como ya fue indicado, gracias a su visualización por técnicas microscópicas de las fibras musculares, es como se les ha relacionado con la evaginación del cisticerco, la fijación y la estabilización del parásito adulto en la mucosa intestinal, así como con el movimiento de proglótidos y la expulsión de los huevos.^{72 y 103}

1.2.4. Paramiosina .

Es una proteína filamentososa de α hélice, que en su forma dimérica tiene un peso molecular de 220kDa, se le descrito como una proteína estructural principal de invertebrados. Su estructura conformacional se asemeja a la de la miosina, ya que esta formada por dos subunidades, pero a diferencia de la miosina ; no tiene actividad de ATPasa y no interactúa con actina .Se cree que su principal función es la de mantener el tono muscular con un bajo costo energético ya que da una estructura inmóvil y estable no dependiente de energía dentro de la célula . Aparte de las posibilidades de su participación en eventos musculares de los parásitos se ha demostrado que la paramiosina es una proteína muy antigénica, reconocida por la mayoría de los sueros de los pacientes con neurocisticercosis, así como de cerdos infestados con cisticerco de *T.solium*, además se ha propuesto que esta proteína es secretada y se ha demostrado su efecto de inhibición en la activación del complemento y su fijación a colágena .Estas características de la

paramiosina la hacen ser proteína importante para la evasión de la respuesta inmune en la citicercosis por *T. solium*.^{24, 42, 63, 64 y 95}

1.2.5. Actina.

Esta es la proteína más importante del citoesqueleto, es una de las proteínas más abundantes en las células eucariotas conocidas; constituye la base de la estructura y el movimiento de estas células en general. Puede encontrarse en forma de monómero conocida como actina G (peso molecular 43 kDa) o como un polímero filamentosos denominado actina F.^{28 y 67}

Su papel fundamental como componente del citoesqueleto en las células. Proporciona la rigidez necesaria para dar forma a las células, junto con otros componentes del citoesqueleto, ayuda a organizar procesos celulares en espacio y tiempo como son la expresión de proteínas, localización de RNAm, citocinesis, secreción de vesículas y la transducción de señales.^{84, 110 y 108}

Es un elemento importante en los procesos de motilidad celular, por medio de rearrreglos del citoesqueleto ya sea actina o tubulina, o a través del movimiento de proteínas motoras, como la miosina que se desplaza sobre los filamentos de actina, ya que la actina provee la fuerza necesaria para la contracción muscular y otro tipo de movimientos menos especializados.

Se sabe relativamente poco en cuanto a la actina en los céstodos, a pesar de ser una proteína estructural presente en la mayoría de los organismos eucariotas estudiados. En estudios de biología molecular fueron aisladas de 3 a 8 secuencias homólogas a genes de actina en el DNA de *Taenia solium*, dos genes (PAT5 y PAT6) fueron secuenciados y predichas las secuencias de aminoácidos de las proteínas que codifican, las cuales mostraron un 100% de homología. Adicionalmente se demostró la expresión de al menos un gen en el cisticerco por inmunoelectrotransferencia.^{15 y 104}

1.2.6. MIOSINA.

Las miosinas pertenecen a una superfamilia de proteínas, dentro de las que es posible encontrar 13 familias diferentes; todas las miosinas tienen en común su alto peso molecular, su actividad de ATPasa y su afinidad por la actina. En general, son proteínas accesorias del citoesqueleto y del músculo, por lo que su actividad de ATPasa la realizan al interactuar con la actina.^{31, 45, 70 y 71}

De acuerdo a sus funciones biológicas, han sido divididas en musculares y no musculares, además se dice que las miosinas tipo II son convencionales y las demás son no convencionales. A las miosinas no musculares participan principalmente en la movilidad de organelos y vesículas dentro de la célula, mientras que a las miosinas musculares se les asocia con la contracción muscular, movimientos y reacomodos de membranas internas y externas con propósitos múltiples.^{78, 79 y 85}

Las miosinas más estudiadas son las tipo I y tipo II. La tipo II también denominada convencional o muscular y puede ser de tres tipos: de músculo liso, de músculo estriado y de músculo cardíaco, de las cuales incluso se han encontrado isoformas, y también se han descrito isoformas de miosinas tipo II no musculares. Las miosinas tipo II son proteínas que en su forma nativa son dímeros constituidos de 2 cadenas pesadas, de peso aproximado a los 400 kDa lo que permite su observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (Fig 5), ya que cada uno de sus monómeros o cadenas pesadas pesan 200 kDa, mientras que cada monómero tiene dos cadenas ligeras no necesariamente idénticas de aproximadamente 18 a 25 kDa y de las cuales una es denominada cadena ligera esencial (CLE) y la otra es la cadena ligera regulatoria (CLR) estas cadenas CLE y CLR son importantes para la actividad de MgATPasa dependiente de actina. En el aminoácido Ser 19 de las CLR se encuentra el sitio de fosforilación, que es fosforilado por cinasas de cadena ligera de miosina, un mecanismo más de control de la actividad ATPasa de la miosina. (Fig 7). Cada cadena pesada está constituida por una porción globular y una fibrilar, es en la porción globular (S1) en donde se encuentra el motor de la miosina y la actividad de

ATPasa, mientras que la porción fibrilar está constituida por una α hélice que le permite la asociación con otra cadena pesada, de tal manera que se genera una hélice complementaria en condiciones de baja fuerza iónica. En esta región fibrilar, además existe una porción de la molécula que es flexible por lo que se le denomina región de bisagra que permite que la molécula sufra torsiones, además es en esta porción fibrilar donde residen los sitios de interacción con otras miosinas mediante los cuales se organizan en miofilamentos. ^{16, 19, 24, 52, 53, 56, 57, 58, 93 y 99}



Figura 5. Microscopía electrónica de la miosina. A) Miosina de *T. solium* vista por microscopía electrónica de transmisión donde la flecha grande señala a la región filamentososa. B) Formación de filamento bipolar, y la flecha chica señala el punto de unión de las regiones filamentosas. (RG)Región globular, (C) cuello y (F) Filamento. ^{6 y 28}

El motivo por el cual existen isoformas de miosina está dado por los mecanismos postransduccionales mediante los cuales se genera diversidad a nivel de RNA y por tanto las isoformas, esto se ve en el caso de dos isoformas de miosinas tipo II del corazón (denominadas α y β), que provienen de un mismo y único gen pero por corte y empalme de genes de la región carboxiterminal y la parte globular se logran expresar dos isoformas diferentes (ver figura 6). Por otra parte las miosinas tipo II son proteínas altamente especializadas las cuales pueden ir cambiando en su composición aminoacídica según el estadio del organismo al que pertenecen, o para mantenerse expresadas a diferentes grados. ^{52, 78, 79 y 80}

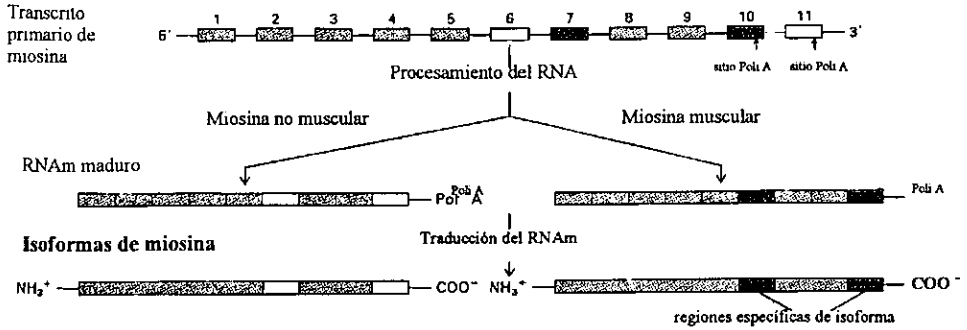


Figura 6. Origen de las isoformas de miosina por corte y empalme de genes. Cada una de las miosinas, musculares o no musculares, tienen regiones específicas. Dichas regiones determinan la afinidad de las miosinas por otras proteínas. (Modificado de DARNELL, 1990)

Varias características de las miosinas son importantes, por ejemplo: su peso molecular lo cual hace difícil su estudio con métodos de electroforesis habituales. También cada isoforma de miosina tiene una cinética de actividad ATPasa dependiente de actina característica, tal actividad ATPasa está influida a su vez por las isoformas de cadenas ligeras que se encuentran unidas a la parte globular. Las diferencias entre las isoformas de miosinas, también se refleja en su diferente velocidad de desplazamiento sobre los filamentos de actina.⁹⁹

Mientras algunas miosinas son adecuadas para el control de la motilidad y morfología de la célula, otras lo son más para otras funciones en el sarcómero, y este es el primer argumento que ha impulsado la búsqueda de isoformas de cadena pesada así como también de sus cadenas ligeras.^{112 y 115}

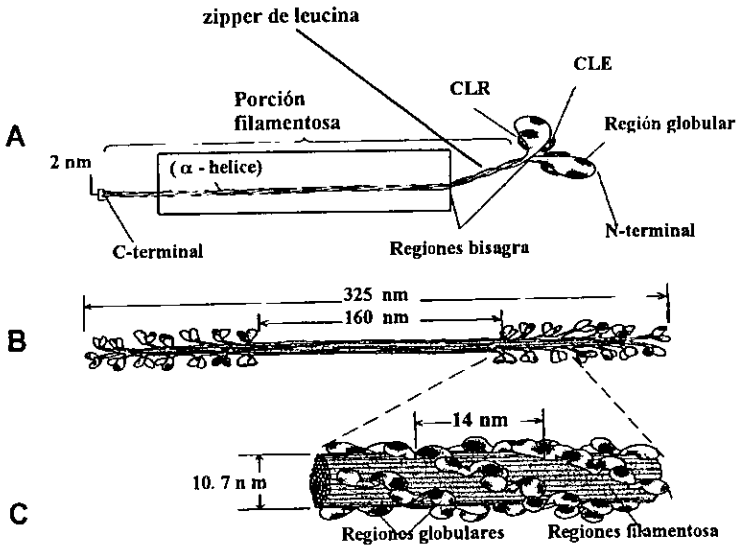


Figura 7. Estructura de una miosina convencional. Forma nativa o dimérica de 400 kDa (A) se señalan la cadena ligera esencial (CLE) además de la cadena ligera regulatoria (CLR), las regiones de bisagra, la región filamentosa en alfa hélice y los miofilamentos donde las regiones filamentosas de la miosina se encuentran ordenadas con dirección definida (filamentos bipolares) (B) y las regiones globulares expuestas en la superficie de los filamentos ordenados (C) .(modificado de DARNELL, 1990)

En lo relacionado con la actividad ATPasa de las miosinas dependiente de unión a actina , esta puede estar regulada de diversas maneras ; 1) Por su unión a filamentos de actina homóloga , 2) Por variación en las concentraciones de Ca^{+2} , Mg^{+2} y ATP , 3) Por la regulación propia de otras proteínas accesorias y constitutivas del sarcómero , 4) Por la fosforilación de su cadena ligera por cinasas de cadena ligera y 5) por la despolimerización de la actina , ya que la miosina solo tiene afinidad por la actina F o polimerica y no por la actina G o monomérica . 7,26, 27, 36, 60, 67, 87, 106 y

A pesar de todo el conocimiento que se tiene de la miosina y de otras proteínas accesorias al citoesqueleto, mucho es desconocido en el caso de los céstodos. En tremátodos, otro género de parásitos helmintos, y en especial en *Schistosoma mansoni*, se han logrado localizar tanto actina como miosina y aparentemente al analizar sobrenadantes de cultivo de estos parásitos se han recuperado fracciones inmunogénicas que son productos de liberación de los parásitos. El análisis electroforético de estas fracciones muestran que ellas presentan pesos moleculares semejantes al de cadena pesada de miosina (200kDa) y en su forma nativa (400 kDa).⁶⁹

Recientemente con el empleo de un anticuerpo monoclonal que reconoce miosina convencional de *T. solium*, se logró determinar la localización tisular en los parásitos de *T. solium* gracias a su carácter inmunogénico, también se logró aislar la miosina para observarla por microscopía electrónica de Transmisión (Fig 5). Lo más interesante de estos estudios es que la proteína estudiada fue detectada en materia fecal de animales infectados experimentalmente con cisticercos que se desarrollaron en parásito adulto, lo que plantea la posibilidad de que también se le encuentre como producto de liberación en cisticercos.^{6 y 76}

CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La miosina tipo II es una proteína bien estudiada y conocida en los organismos superiores, poco se ha hecho para estudiarla en parásitos helmintos y en especial en los céstodos. La miosina es una proteína de alto peso molecular (400 kDa en su forma nativa) constitutiva en todos los organismos eucariotas y participa como componente del citoesqueleto.²⁰

Con el presente proyecto de tesis se busca evaluar la posible liberación de miosina desde los metacéstodos de *T. solium*. De acuerdo a lo reportado en donde la proteína fue detectada en sobrenadante de cultivo del parásito adulto de *T. solium*, como en materia fecal del modelo experimental, hámster dorado.^{6 y 75}

Adicionalmente, se busca evaluar la participación de la miosina durante el fenómeno de evaginación de los cisticercos .

En caso de que se lograra identificar de forma específica a la proteína liberada, esto abriría la posibilidad de su posible uso en el diagnóstico de las enfermedades causadas por parásitos de *T. solium*, tal y como se ha logrado en la detección de miosina cardíaca en problemas cardíacos basada en su captura utilizando anticuerpos monoclonales. Estos métodos han resultado ser específicos y sensibles.^{55, 56 y 86}

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

HIPÓTESIS.

Si los cisticercos de *Taenia solium* liberan miosina al medio que los circunda entonces el fenómeno podrá ser estudiado en condiciones de cultivo (*in vitro*) con y sin estímulo de evaginación.

Si el fenómeno de liberación por parte de cisticercos de *T. solium* de miosina se presenta en condiciones *in vitro* entonces existe la posibilidad de que en condiciones *in vivo* se presente y se demostraría al detectar miosina liberada por cisticercos en fluidos biológicos de los hospederos infectados.

OBJETIVO GENERAL.

Demostrar la presencia de la miosina en medio de cultivo y en fluidos biológicos de hospederos infestados, como proteína de liberación de cisticercos de *Taenia solium* utilizando técnicas de electroforesis e inmunoenzimáticas.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Purificar miosina de cisticercos de *T. solium* con la finalidad de utilizarla como un patrón conocido en los estudios de cuantificación, actividad biológica y electroforesis.

Estandarizar ELISA empleando como anticuerpo primario 4B3 con la finalidad de utilizarla en la detección de miosina tanto en medio de cultivo como en fluidos biológicos de hospederos infestados.

Describir el comportamiento de la liberación de miosina a manera de cinética en ausencia y en presencia de bilis.

Establecer si existe una relación entre la localización de los parásitos y el comportamiento la cinética de liberación de miosina por cisticercos cultivados.

Determinar si la miosina liberada al medio de cultivo y en fluidos biológicos presenta actividad de MgATPasa dependiente de actina.

Estandarizar una técnica de inmunoelectrotransferencia para identificar la cadena pesada de miosina liberada al medio de cultivo.

Caracterizar mediante electroforesis las miosinas purificadas de cisticercos, así como las liberadas al medio de cultivo y suero de cerdo infectado.

CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Cisticercos de *Taenia solium*.

4.1.1. Obtención de parásitos. Todos los cisticercos utilizados en los diferentes estudios fueron obtenidos de un cerdo infestado naturalmente e inmediatamente después de la necropsia. De igual manera, en todos los experimentos, siempre se buscó emplear parásitos de tamaño semejante y los cuales tuvieran un aspecto macroscópico en el que no mostraran daño alguno. Para los estudios, una vez que los cisticercos fueron obtenidos, se les dieron lavados exhaustivos con solución salina amortiguada de fosfatos (SSAF) pH 7.2 a 4°C, con la finalidad de eliminar los restos de tejidos del huésped. Finalmente, los parásitos fueron congelados a -20°C hasta su uso. En el caso de los cisticercos destinados a cultivo parasitario, los parásitos fueron lavados 3 veces adicionales con SSAF suplementado con una mezcla de antibióticos al 1% (anfotericina 0.1µg/ml, estreptomycin 40µg/ml y penicilina G 10000 U/ml) e inmediatamente después los parásitos fueron trabajados dentro de la campana de flujo laminar.

4.1.2. Mantenimiento en cultivo *in vitro*. Una vez que los parásitos fueron recuperados y lavados, se les separó en grupos de 5 cisticercos y estos grupos fueron colocados en pozos de cajas de cultivo celular (Nunc de 24 pozos). A cada pozo se les adicionaron 2 ml de medio RPMI complementado con 0.4% de dextrosa y una mezcla de antibióticos en las proporciones descritas anteriormente. En el caso de los grupos de cisticercos utilizados para evaginación, al medio de cultivo se le agregó bilis de cerdo (concentración final de 5%). Transcurridos los tiempos de incubación establecidos, se hicieron recuperaciones de alícuotas de sobrenadantes de cultivos, las cuales fueron congeladas inmediatamente para su posterior análisis. Siempre que se hizo recuperación parcial o total de las alícuotas, se adicionó medio de cultivo fresco según la cantidad tomada. Todos los experimentos de cultivo *in vitro* fueron efectuados bajo condiciones determinadas (37°C, CO₂ al 5% y humedad relativa del 98%).⁷³

4.1.3. Obtención de fluido vesicular. Una vez transcurridos los tiempos de incubación determinados, los cisticercos de los grupos seleccionados fueron recuperados del cultivo parasitario y colocados en tubos eppendorf para su centrifugación (11000 g, 15 min, 4°C). Una vez que se efectuó la centrifugación, el sobrenadante correspondiente al fluido vesicular de los parásitos fue separado del tejido de los mismos e inmediatamente fue congelado para su posterior análisis.

4.2. Anticuerpos monoclonales 4B3.

4.2.1. Producción. En todos los estudios del presente proyecto de tesis fueron empleados los sobrenadantes de cultivo de hibridomas de ratón 4B3, los cuales son la fuente de los AcM 4B3. De estos anticuerpos fue demostrado que reconocen a miosina de parásitos de *T. solium* y que son anticuerpos IgG1 y que provienen de la fusión con un mieloma no productor denominado X63AG8. Para la obtención de los sobrenadantes de cultivo, los hibridomas mantenidos en nitrógeno líquido fueron descongelados en medio RPMI estéril no complementado y centrifugados (2000 g, 5 min, temperatura ambiente). Finalmente, luego de eliminar totalmente al agente crioprotector DMSO, se recuperó el paquete celular y las células fueron puestas en medio de cultivo para su mantenimiento, expansión y producción de AcM 4B3. El medio de cultivo consistió en RPMI complementado con suero fetal de bovino al 10%, antibióticos al 1% (como fue descrito para el complemento de la SSAF), Glicina al 1%, Glutamina al 1.6%, aminoácidos no esenciales al 1% y anti PPL0 al 1%. Luego, una vez que las células fueron puestas en cultivo, ellas fueron mantenidas bajo condiciones definidas (37°C, CO₂ al 5% y una humedad relativa del 92%). Una vez que las células se encontraban en crecimiento exponencial se hicieron recuperaciones de los sobrenadantes de cultivo, los cuales fueron reemplazados con medio de cultivo fresco.^{6y25}

Los sobrenadantes obtenidos fueron considerados como fuentes de AcM 4B3 de la forma previamente indicada. Una vez que los sobrenadantes fueron evaluados en su cantidad y calidad de reconocimiento a miosinas (sección 2.2.), fueron fraccionados en alícuotas y congelados a -20°C hasta su uso.

4.2.2. Evaluación de la calidad de los AcM 4B3 producidos. Para estos fines fueron empleados ensayos inmunoenzimáticos en placa (ELISA), los pozos de las placas fueron sensibilizados con una incubación (37°C , 2 h) con $100\mu\text{l}$ de miosina semipurificada de cisticercos de *T. solium* diluida en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 ($0.1\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, las placas fueron lavadas con SSAF-Tween 20 al 0.3% y bloqueadas con $150\mu\text{l}$ de SSAF-Tween 0.3%-leche al 5% y nuevamente las placas fueron incubadas bajo las condiciones descritas anteriormente. Nuevamente, las placas fueron lavadas y procesadas como se indicó anteriormente, para ser posteriormente puestas en contacto con $100\mu\text{l}$ de sobrenadantes de cultivo bajo las condiciones de incubación ya descritas. Luego de la eliminación del exceso de los anticuerpos por los lavados a las placas les fueron adicionados los anticuerpos policlonales de cabra conjugados a peroxidasa anti IgG de ratón (1:1000). Nuevamente, como lo descrito para los sobrenadantes de cultivo, los anticuerpos secundarios fueron incubados bajo condiciones semejantes. Una vez transcurridos los tiempos de incubación, los anticuerpos marcados fueron revelados por adición del sustrato específico (ortofenilendiamina al 4% y H_2O_2 al 0.004%). Para la detención de la reacción enzimática, luego de 5 minutos de reacción, se adicionó una solución de H_2SO_4 2N. El registro de los valores de absorbancia relacionados con las reacciones enzimáticas, fueron medidas en un elisómetro (Bio-Rad) a una longitud de onda de 492 nm.

En todos los ensayos, como control positivo se emplearon los sobrenadantes de cultivo ya probados y como control negativo, fue empleado el sobrenadante del mieloma originario del hibridoma (Ag8X68). Para los estudios, aquellos sobrenadantes con un valor de absorbancia mayor a 0.8 fueron considerados los mejores para el estudio, fueron fraccionados en alícuotas y almacenados a -20°C hasta su uso.

4.3. Miosina de cisticercos.

4.3.1. Aislamiento y purificación.

4.3.1.1. A partir de parásitos. La preparación de esta proteína se hizo con base a lo descrito para la obtención de miosina de tejidos musculares y para parásitos adultos de *T. solium*. De manera resumida, el proceso consiste en la homogeneización en un politrón de los cisticercos previamente lavados, una vez que los parásitos fueron homogenizados en presencia de una solución de NaCl 0.2M en baño de hielo, a la suspensión resultante se le hizo una extracción de las proteínas del citoesqueleto mediante agitación suave a 4°C toda la noche. La suspensión resultante fue centrifugada (30000g, 30 min, 4°C) y el paquete recuperado fue nuevamente homogenizado en presencia de una solución de KCl 0.6M pH 6.5 y en un baño de hielo. Nuevamente, la suspensión obtenida fue centrifugada (15000 g, 30 min, 4°C) y el sobrenadante recuperado, aún en la solución de KCl 0.6M, fue diluido con goteo constante y lento en agua bidestilada fría, hasta obtener una concentración del KCl de 0.04M. Debido a la dilución del KCl (1:15) , los filamentos de miosina se precipitaron y una vez recuperados por decantación fueron resuspendidos en KCl 0.6 M y fueron cuantificadas para medir su contenido de proteína. La determinación de la concentración de proteína se hizo a través de un micrométodo colorimétrico comercial de Bradford (BioRad) empleando a la albúmina sérica bovina fracción V (Sigma) como proteína estándar (ver apéndice).^{6 y 31}

Una vez que las proteínas fueron cuantificadas, para su almacenamiento fueron mezcladas con glicerol (1:1), se les fraccionó en alícuotas, las cuales fueron debidamente etiquetadas y almacenadas a -20°C hasta su uso.

4.3.1.2. A partir de fluidos biológicos. Para la identificación y aislamiento de miosina desde estas fuentes, principalmente desde suero y líquido cefalorraquídeo, fueron utilizadas dos estrategias diferentes: una consistió en la extracción salina de la proteína y la otra, consistió en la captura de la proteína empleando a los anticuerpos monoclonales 4B3 y recuperando a la miosina por ruptura de complejos inmunes.

4.3.1.2.1. Extracción salina. Para los fines perseguidos, tanto el suero como el LCR fueron tratados para favorecer la ruptura de complejos inmunes mediante la adición de ácido tricloroacético al 2% (1:1). A este agente de ruptura se le permitió reaccionar por espacio de 20 min bajo una temperatura de 4°C. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla resultante fue neutralizada con una solución amortiguada de fosfatos pH 7.0 (SAF-KCl) al doble de concentración mezclada con KCl 0.6 M (2:1). Posteriormente la mezcla obtenida fue centrifugada (11000 g, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes obtenidos fueron recuperados y congelados a -20°C hasta ser utilizados.

4.3.1.2.2. Captura con AcM 4B3. Para estos fines, los micropozos de placas de ELISA (Nunc Maxisorb) fueron sensibilizadas con sobrenadantes de hibridomas productores de los AcM 4B3, luego de los lavados de cada pozo (ver apéndice correspondiente) a cada uno de ellos se le adicionaron los sueros de los cerdos infestados. Previamente a estos sueros se les había determinado la presencia de miosina circulante por ensayos de ELISA directa e inmunopunto (ver sección 3.2.1.).

Para la separación de la miosina atrapada por los AcM 4B3 en los micropozos, a cada uno de estos les fueron adicionados 20 µl de una solución de ácido tricloroacético y la solución obtenida, correspondiente a la miosina (según la electroforesis en poliacrilamida, sección. 3.2.3.), se neutralizó con la solución SSF-KCl y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida para su posterior tinción con plata.

4.4. Evaluación de las miosinas.

4.4.1. Inmunopunto. En todos estos estudios se empleó un aparato de inmunopunto (Biorad) en el que los antígenos eran adsorbidos a membranas de PVDF (Millipore) previamente activada con metanol como lo indica el fabricante. Para la adsorción de las proteínas, 10 µl de los antígenos (sobrenadante de cultivo o miosina purificada de cisticercos de *T. solium*) se adicionaron en presencia de vacío y se permitió la adsorción de ellos a la membrana por espacio de 20 min.

Posteriormente las membranas fueron retiradas del aparato y bloqueadas con leche descremada al 5%, la cual contenía Tween 20 al 0.3% e incubadas bajo condiciones definidas (a temperatura ambiente, 2 h). Una vez bloqueadas las membranas ellas fueron lavadas dos veces con SSAF-Tween 20 al 0.3% y nuevamente fueron puestas en incubación en presencia de sobrenadantes de cultivo que contenía AcM 4B3 bajo condiciones definidas (a temperatura ambiente, 2h). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 2 lavados mas y posteriormente las membranas fueron puestas en presencia de una solución de anticuerpos de cabra peroxidado 1:5000 anti IgG de ratón (anticuerpos secundarios) bajo las condiciones ya establecidas en presencia de anticuerpos. Una vez que se eliminó el exceso de anticuerpos secundarios, para el revelado de la reacción enzimática, se adicionaron a los pozos la 5'5 Diaminobenzidina al 0.1% y el H₂O₂ al 30% (0.05%). La reacción enzimática fue terminada por adición de agua destilada a los 5 minutos permitidos para dicha reacción.

4.4.2. ELISA. La detección de miosina liberada por los cisticercos cultivados se hizo desde los sobrenadantes de cultivo (25µl), los cuales fueron adsorbidos a los micropozos de placas Nunc Maxisorb. Para favorecer la adsorción de los antígenos, fueron mezclados con una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 (volumen final 100µl) y las placas fueron puestas en incubación (37°C, 2 h). Transcurrido el tiempo de incubación, los micropozos fueron lavados con

SSAF-Tween 20 al 0.3% y posteriormente se realizó un bloqueo con SSAF-Tween 0.3%-leche al 5% (150 μ l) bajo las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente. Luego de que una vez más las placas fueron lavadas, se les adicionó los sobrenadantes de los AcM 4B3 (100 μ l) y una vez más las placas fueron puestas bajo incubación en las condiciones ya descritas. De igual manera, transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos y luego de los lavados, a los micropozos se les adicionó un volumen semejante de anticuerpos policlonales de cabra conjugados a peroxidasa (1:1000) anti IgG de ratón. Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos secundarios y una vez que los pozos fueron lavados, a cada uno de ellos se hizo la adición del sustrato H₂O₂ 0.004% y del cromógeno ortofenilendiamina al 4%, ambos disueltos juntos en SSAF, y se les permitió que efectuaran la reacción enzimática con la que indirectamente mostraban la reacción antígeno-anticuerpo. Luego de transcurridos 5 min. la reacción enzimática fue detenida por la adición de H₂ SO₄ 2N y cada una de las lecturas de las reacciones coloridas fueron medidas en un elisómetro (2550 EIA READER Bio-Rad) con un filtro de longitud de onda de 492 nm. Los controles empleados en estos ensayos fueron extracto de miosina de cisticercos de *T. solium* (0.5 μ g) (control positivo), sobrenadante de cultivo de AcM 4B3 bien caracterizado (Control positivo) y como controles negativos se usaron la solución de carbonatos, alícuotas de medio de cultivo en presencia o en ausencia de bilis (utilizada para la estimulación de la evaginación de los cisticercos) y el sobrenadante del mieloma original de AG8X67 (AG8) con el cual se realizaron las fusiones y que se sabe es un mieloma no productor de anticuerpos.

4.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

4.4.3.1. Geles convencionales. Para los análisis de todas las proteínas, las muestras fueron fraccionadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia o en ausencia de urea como agente caotrópico y separadas bajo condiciones definidas (80 V, 3 h, geles del 6% al 7.5%), usando un equipo de electroforesis de placas de vidrio de 8 x 10 cm (Mighty Small, Hoffer) En el caso de que las muestras fueron analizadas con el agente caotrópico, el coctel de electroforesis contenía urea 8 M e inmediatamente después de haber adicionado el coctel; las

muestras fueron mantenidas en baño maría a ebullición (4 min.). Todas las electroforesis fueron siempre llevadas a cabo por duplicado, uno de los geles resultantes fue teñido con Azul Brillante de Coomassie y el otro fue sometido a electrotransferencia a membranas de PVDF como será descrito posteriormente.

4.4.3.2. Geles con EDTA/glicina. En el caso del análisis de las miosinas, luego de que fueron preparadas y tratadas con EDTA 5mM como inhibidor de metaloproteasas, ellas fueron tratadas con coctel de electroforesis que permite una mejor separación de isoformas de miosina. El tratamiento de las muestras, luego de la adición de este coctel especial que contiene urea 8 M, tiourea 2M, Tris base 0.05 M, Ditiotreitól 0.075 M, SDS 3% (p/v) y 0.004% (p/v) de azul de bromofenol, se hizo tal y como fue descrito para electroforesis convencional. La diferencia entre estos geles y los convencionales, está basada en el cambio de la composición de los primeros ya que ellos contienen EDTA al 0.0015% en el gel concentrador y glicina al 0.0075% en el gel separador. Las condiciones del fraccionamiento electroforético fueron establecidas con base a lo descrito por WADA y col. 1996 y ajustadas a condiciones definidas (1er etapa de corrida: 100 v, 20 min. y 4° C. 2da. Etapa de corrida; 150 v, 3 h y 4°C) para la misma cámara empleada en los geles convencionales.

De la misma manera fue ajustada la cantidad de muestra analizada (de 0.8 a 1µg de proteína total), la cual fue previo a su análisis mezclada con el coctel de electroforesis seleccionado (proporción 1:1). Una vez que transcurrió la electroforesis, los geles recuperados fueron teñidos mediante tinción inversa de Zinc/Imidazol y/o tinción neutra con Plata.^{10 y 39}

4.4.4. Inmunoelectrotransferencia.

Una vez que las muestras fueron sometidas a su separación electroforética, fueron transferidas a membranas de polivinildifluoruro de 0.45 µm (PVDF, MILLIPORE) usando una minicámara Hoffer. Previo a las electrotransferencias, las membranas fueron activadas con metanol por 10 s y luego la transferencia de las proteínas desde los geles se hizo bajo condiciones

definidas (500 mA, 16 h, 4°C) . La verificación de la eficiencia de la transferencia desde los geles se hizo mediante su tinción con Plata.

Para los ensayos de inmunoprecipitación de las proteínas fraccionadas con los anticuerpos, una vez que las membranas fueron recuperadas de la electrotransferencia, se les sometió a un tratamiento semejante al inmunopunto cuando se hicieron ensayos con los AcM 4B3 y sus anticuerpos secundarios respectivos. A diferencia del inmunopunto, en estos ensayos de IET también se hicieron evaluaciones de las proteínas mediante anticuerpos policlonales comerciales antimiosina (SIGMA) preparados en conejo (1:1000) y los cuales fueron hechos reaccionar con anticuerpos anti IgG de conejo preparados en cabra y conjugados a peroxidasa (SIGMA) (1:1000). También en estos ensayos se hicieron reaccionar anticuerpos policlonales producidos en hámster en contra de la cadena pesada de miosina de cisticercos de *T. solium* (1:2000), como anticuerpos secundarios fueron utilizados anticuerpos de cabra anti IgG de hámster conjugados a peroxidasa (SIGMA) (1:1000).

En el caso del revelado de la reacción enzimática, las membranas fueron incubadas en presencia del mismo cromógeno usado para la actividad de peroxidasa, sólo que la solución estaba complementada con un agente que incrementó el contraste del inmunoprecipitado y la composición de dicha solución fue de DAB al 0.6%, sulfato de amonio Níquel al 0.93% y peróxido de hidrógeno al 0.001% todos disueltos en SSAF. La reacción se detuvo, luego de la aparición de las bandas de inmunoprecipitación, mediante la adición de agua destilada.

4.4.5. Determinación de la actividad de ATPasa.

Para estos fines se siguieron dos procesos diferentes; uno para la medición de la cantidad del fósforo inorgánico libre (Pi) y otro para establecer las condiciones experimentales necesarias en la medición de la actividad enzimática. Para la determinación de la cantidad de Pi, lo primero que se hizo consistió en la preparación de una curva de calibración con diferentes concentraciones de Na_2HPO_4 (1-25 nmoles). Previamente fue solubilizada la sal en el medio de cultivo complementado, el cual ya ha sido descrito en lo relacionado con el cultivo de los parásitos. Una vez preparadas las

diferentes soluciones, estas fueron hechas reaccionar con una solución que contenía verde de malaquita (ver apéndice) y se permitió la reacción durante 2 min. Una vez concluido el tiempo de incubación, a cada una de las soluciones se les adicionó 400 μ l de ácido cítrico al 10% y se permitió la reacción durante 30 min. Finalmente, el color obtenido de las soluciones fue medido espectrofotométricamente a 600 nm. Las lecturas fueron hechas dentro del intervalo de 2 h posteriores a la obtención de las soluciones coloridas, principalmente a los 30 minutos, y el cual es el tiempo de estabilidad del colorante. Para el cálculo de las concentraciones del fósforo libre, se trazaron gráficos para los que se calculó la correlación de la recta obtenida y en las que se hicieron cálculos de conversión de los valores de absorbancia a cantidad (nm) de Pi.^{53 y 87}

Luego, debido a la extrapolación de los resultados de absorbancia de las muestras problema (ver más adelante) con la curva estándar, se logró la estimación de la cantidad de Pi presente en las muestras problema.

En lo relacionado con las condiciones usadas para favorecer la actividad de la ATPasa de miosina, se hizo lo siguiente: para evaluar la actividad de miosina exógena (usada en estos ensayos como un control positivo de actividad), luego de que fueron preparados los filamentos de miosina en KCl 0.4M, se tomaron alícuotas de esta solución (equivalentes a 5 nMoles) y se depositaron en tubos Eppendorf. Luego, a cada uno de los tubos se le adicionó medio de reacción (un volumen de 180.5 μ l) el cual contenía tris Base 55 mM pH 9 - 9.5, CaCl₂ 11 mM, ATP 6.8 mM, agua desionizada (MILLIQ) y actina F 4.2×10^{-3} mM. La adición de la actina se hizo inmediatamente antes de poner en incubación la miosina con el medio de reacción, una vez hecha la mezcla, los tubos fueron puestos a incubación bajo condiciones establecidas (25°C en baño maría, 30 min.) y transcurrido el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionó Se hizo la adición de miosina y se puso a incubar con el medio de reacción, se tomó el tiempo de para detener la reacción enzimática, a los 10 min se adicionaron 100 μ l de ácido tricloro acético al 15% y los tubos fueron inmediatamente sumergidos en hielo en donde fueron mantenidos por una hora. Transcurrido el tiempo, los tubos fueron centrifugados (11,000 g 8 min.) y de ellos se recuperan 100 μ l de cada sobrenadante a los cuales les fueron adicionados 300 μ l de agua desionizada y

bidestilada. Para la cuantificación de Pi en las muestras procesadas, la reacción colorimétrica fue desarrollada por adición de 400 μ l del reactivo de verde de malaquita, 2 min después de haber adicionado el colorante, para detener la reacción colorida se agregaron 400 μ l de ácido cítrico al 10%, se les mezcló vigorosamente y se efectuó la lectura del color.

4.5. Miosina en fluido vesicular.

Una vez que el fluido vesicular fue recuperado de los cisticercos, como se indicó en el inciso 3.2.2, alícuotas del mismo fueron adsorbidas como antígenos en placas de ELISA y procesadas como fue descrito en el inciso indicado.

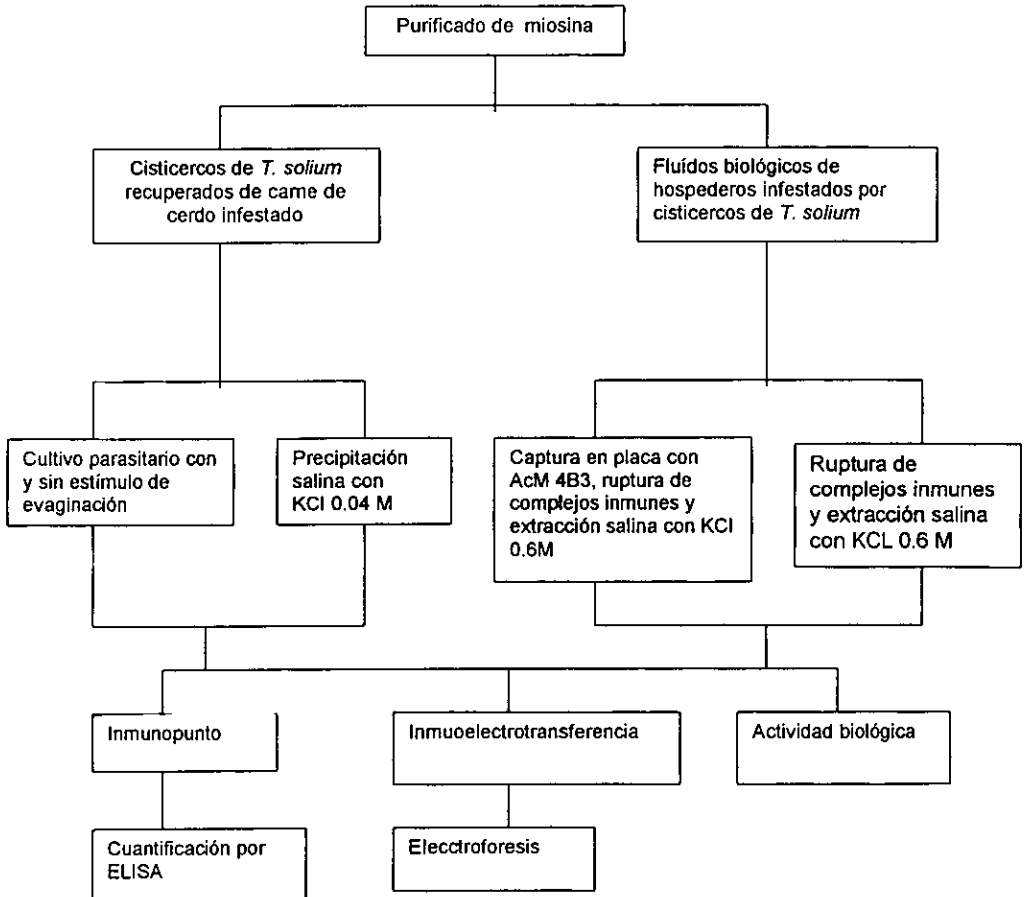
4.6. Miosina en sobrenadantes de cultivos.

Para la identificación y cuantificación, así como para la determinación de actividad de ATPasa y el análisis de las proteínas mediante geles con EDTA/glicina se aplicaron los procesos descrito en los incisos 3.2.2., 3.2.5. y 3.2.2.3. respectivamente.

4.7. Miosina en sueros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes humanos y de cerdos.

Los sueros y líquidos cefalorraquídeos de humanos y cerdos infestados fueron recuperados desde infecciones naturales. En el caso de los cerdos, se hizo la recuperación del líquido cefalorraquídeo inmediatamente después del sacrificio de los animales. Para la identificación y cuantificación, así como para la determinación de actividad de ATPasa y el análisis de las proteínas mediante geles con EDTA/glicina se aplicaron los procesos descritos en los incisos 3.2.2, 3.2.5 y 3.2.2.3 respectivamente.

4.8. Diagrama de flujo



CAPITULO V. RESULTADOS.

5.1. MIOSINA DE CISTICERCOS DE *Taenia solium*.

5.1.1. Evaluación de la purificación y del reconocimiento de miosina por AcM 4B3. Mediante análisis de miosinas de cisticercos y de tenias por electroforesis en geles de acrilamida al 6%, previamente evaluadas en lo referente a su pureza y actividad enzimática, se demostró que dichas proteínas pueden ser separadas tanto en su forma dimérica (PM: 400 kDa) como en su forma monómerica (PM: 200 kDa). Para la optimización en el rendimiento de los monómeros, las miosinas fueron tratadas con urea 8M y las proteínas correspondientes a la cadena pesada de miosina en los marcadores de peso molecular comerciales (Fig 8A). Los resultados de IET, mostraron que los AcM 4B3 reconocen ambas formas de miosina, pero en el caso de las cadenas pesadas es más claro el reconocimiento. De esta inmuno-electrotransferencia en la Figura 8B se puede observar un corrimiento electroforético distinto entre la cadena pesada de miosina purificada de adulto (carril 4) y la de cisticerco (carril 5), mientras la miosina de adulto se ve como una sola banda nítida a la altura de 200 kDa la miosina purificada de cisticercos presenta dos bandas con un peso molecular aproximado de 200 kDa.

Los AcM 4B3 reaccionaron con al menos dos bandas de peso molecular semejante las cuales no correspondieron al AgB, en el caso de la miosina nativa o dimérica, también los AcM 4B3 reconocieron a otras bandas, las cuales no eran observables en geles teñidos con azul de Coomassie (Fig 8B). En el caso de los AcM usados, fueron obtenidos luego del descongelamiento y expansión del hibridoma, se demostró que estos se encontraban en una buena cantidad en los sobrenadantes y mantenían el reconocimiento hacia su antígeno (al evaluarlos por ELISA).

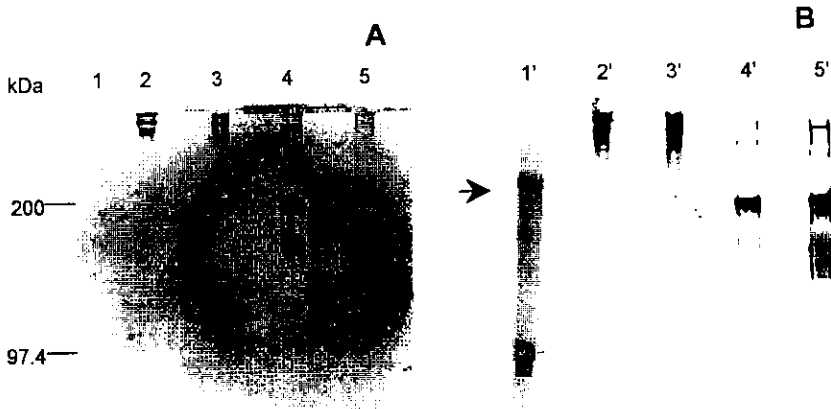


Figura 8. Evaluación de la purificación de miosinas de parásitos de *Taenia solium*. Miosinas purificadas de cisticercos y tenias fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (A) e inmunoelectrotransferencia (B). Para la extracción de la proteína, los parásitos fueron homogenizados en KCl 0.6M y las miosinas extraídas fueron precipitadas en KCl 0.04M. Luego de su solubilización en glicerol, las proteínas (30 ug) fueron analizadas (electroforesis: 100 v, 4 h, 4°C y electransferencia: 1.5 Amp, 2 h, 4°C). Marcadores preteñidos (carriles 1 y 1') que contienen a la cadena pesada de miosina de cerdo (punta de flecha). Miosinas de parásitos adultos (carriles 2, 2', 4 y 4') y cisticercos (carriles 3,3',5 y 5'). Miosinas nativas (carriles 2, 2', 3 y 3'), cadenas pesadas por tratamiento con urea 8 M (Carriles 4, 4', 5 y 5'). La inmunoelectrotransferencia fue efectuada en membranas de PVDF, para lo cual las miosinas fueron hechas reaccionar con el AcM 4B3 y con anticuerpos policlonales de cabra anti IgG de ratón conjugados a peroxidasa. El revelado de la reacción se hizo con DAB y H₂O₂.

5.1.2. Análisis de la miosina purificada por electroforesis en geles de EDTA/glicina. Con la finalidad de lograr la separación de posibles isoformas de miosina, una vez que los filamentos fueron obtenidos se les mezcló previamente con el coctel especial y luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos con zinc-imidazol. Según los resultados obtenidos es posible la identificación de varias bandas de peso molecular semejante al de la cadena pesada, el número de bandas identificadas corresponden a 4 ó 5 de un peso molecular muy semejante a 200 kDa, así como otra banda de peso molecular menor que no correspondía a la paramiosina (Fig 9).

El sistema descrito anteriormente para la separación de otras posibles formas de miosina aparentemente es reproducible, ya que cuando son analizadas otras miosinas purificadas se obtienen resultados semejantes (Fig 9A). Con la idea de evaluar si las bandas no aparecían por una posible autodegradación, las muestras fueron analizadas en presencia de EDTA 5 mM como inhibidor de metaloproteasas y los resultados que se obtuvieron mostraron que la resolución del fraccionamiento se veía afectada ya que se perdía la definición de la separación de las bandas (Fig 9B). Otro de los resultados que se obtuvieron del análisis de miosina en presencia de EDTA, es que esta proteína no puede ser empleada para ensayos de actividad MgATPasa dependiente de actina, mientras que cuando se le utiliza sin EDTA, ella se vuelve susceptible a la degradación por metaloproteasas y ello podría ocasionar que durante las separaciones electroforéticas, se presenten artefactos que no tienen que ver con la miosina en estudio.

Otro de los resultados obtenidos referente a la tinción de los geles, fue que el empleo de la tinción de Zinc/imidazol permite obtener mejor definición de las bandas de miosina, en cambio la tinción de plata no permite ver todas las bandas, sin embargo se prefirió su empleo debido a que facilita el contraste para la visualización de bandas.

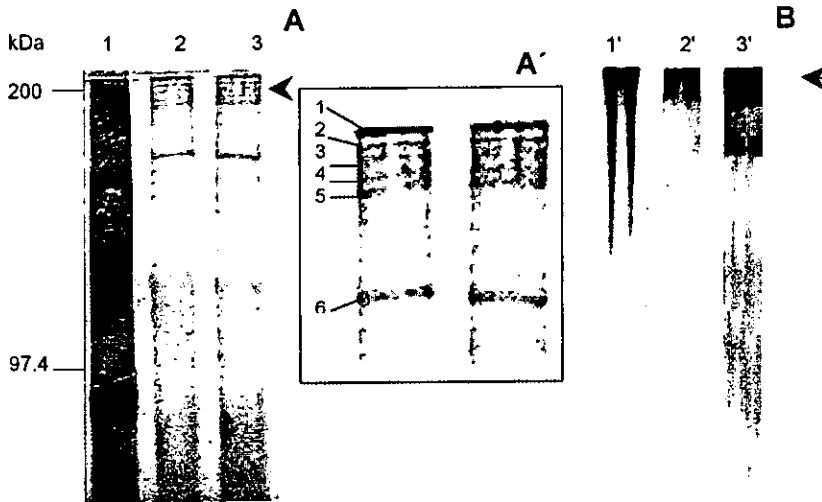


Figura 9. Miosinas de *T. solium* en gels con glicina/EDTA. Miosinas purificadas con KCl 0.04 M fueron sometidas a electroforesis (1a corrida: 80 V, 20 min. y 2a corrida: 150 V, 3 h), los fraccionamiento fueron hechos a 4°C. El gel superior contenía EDTA 0.005% y el gel inferior contenía glicina al 0.01%. Miosina purificada en ausencia (A) y en presencia de inhibidores de proteasas (B). El gel obtenido en A fue teñido con una tinción inversa de Zn-Imidazol y el obtenido en B fue teñido con Plata. Pesos moleculares (carril 1) y cadenas pesadas de miosina (punta de flecha) (carriles 2, 2', 3 y 3'). La miosina comercial de cerdo fue analizada en el carril 1', mientras que la miosina de cisticercos de *T. solium* fue analizada en los carriles 2, 2', 3 y 3'. Todas las proteínas para su análisis electroforético fueron preparadas en coctel que permite la definición de posibles isoformas. En A' se muestra una amplificación de las 6 bandas obserbadas en A.

5.2. Miosina en fluido vesicular. Según los resultados obtenidos aparentemente no es posible la detección de miosina en fluido vesicular de los cisticercos. No influye, para ello, que los cisticercos provengan de músculo o cerebro e incluso, no importa que ellos hayan sido mantenidos en cultivo en presencia de bilis (Fig 10).

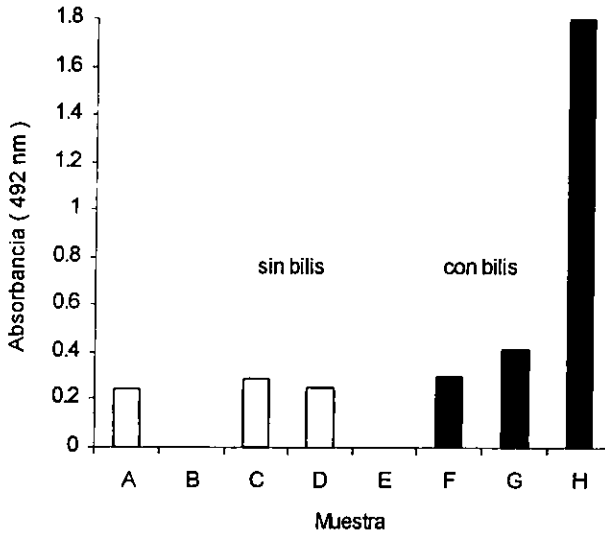


Figura 10. Identificación con la técnica de ELISA de miosina en líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* cultivados in vitro. En la gráfica se muestra la absorbancia a 492 nm de; control negativo sin muestra (A), medio a las 0 h de cultivo de los cisticercos (B), líquido vesicular de los cisticercos cultivados provenientes de cerebro (C) y de músculo (D) después de cultivarlos, medio con bilis a las 0 h de cultivo (E), líquido vesicular de los cisticercos cultivados en presencia de bilis provenientes de cerebro (F) y de músculo (G), medio de cultivo con bilis al que le agregó 1mg de miosina purificada de cisticercos de *T. Solium* (H).

5.3. Miosina en sobrenadantes de cultivo.

5.3.1. Cinética de liberación de miosina. Según los resultados, es posible que los cisticercos en cultivo liberen miosina (Fig 11E) y que esta liberación se incremente cuando el medio de cultivo contiene bilis (Fig 11F). Posiblemente en la bilis de cerdo infectado haya miosina que pudiera provenir de los parásitos, ya que los anticuerpos antimiosina reaccionaron intensamente frente a bilis sola (Fig 11B). Cuando esta bilis es mezclada con medio de cultivo, en una proporción del 25%, los anticuerpos reaccionan débilmente en ensayos de inmunopunto (Fig 11C). Los sobrenadantes de cultivo con bilis al 5% no dieron reacción positiva frente a los AcM 4B3. Esta concentración de bilis al 25% fue usada para inducir a una evaginación rápida (2 h), mientras que la adición de bilis al 5% induce a una evaginación más lenta (24 h en promedio). La evaluación del efecto del praziquantel sobre la liberación de miosina, mostró que en presencia del medicamento, los parásitos liberan mayor cantidad de proteína (Fig 11 G) en comparación con lo producido por la butanediona-monoxima (Fig 11 H).






			Observaciones
A			-
B			+++
C			++
D			+/-
E			+/-
F			+++
G			+++
H			++
			+

Figura 11 . Detección de miosina liberada en cultivo por el metacésto de *T. solium* por Inmunopunto y usando AcM 4B3 (por duplicado) A. Medio de cultivo únicamente (RPMI) . B. Bilis de cerdo infectado. C. Medio de evaginación (RPMI+ bilis de cerdo al 25%) . D. Cultivo del metacésto en RPMI 24 h a 37 °C . E. Cultivo del metacésto en RPMI 12 h a 4 °C. F. Cultivo del metacésto en medio de evaginación 2 h a 37 °C. G. Cultivo del metacésto en medio de evaginación 2h a 37 °C en presencia de Praziquantel . H. Cultivo del metacésto en medio de evaginación 2h a 37 C en presencia de Butanedionamonoxima . I. Cultivo del metacésto en RPMI 4 días a 4 °C.

Una vez estandarizado el ELISA directo, empleando a los AcM4B3 como anticuerpos primarios, se hizo posible el monitoreo de la liberación de miosina , gracias a ello , hubo la posibilidades de cuantificar la miosina liberada por los parásitos a diferentes tiempos de cultivo. Los resultados obtenidos muestran que la miosina es liberada por los cisticercos, independientemente de que hallan sido recuperados de músculo o cerebro, además, de que la presencia de bilis al 5% aparentemente induce que los cisticercos liberen una mayor cantidad de miosina (Fig 12 A y B).Posiblemente que tanta miosina sea liberada depende de la viabilidad de los parásitos y de su capacidad de evaginación (Fig 12), ya que cuando evaginan los cisticercos hay mayor cantidad de miosina que cuando no hay evaginación. De igual manera,es posible que los cisticercos recuperados de músculo liberan más miosina que los recuperados de cerebro cuando están en presencia de bilis (Fig 12 A y B) sin embargo, el porcentaje de evaginación de los primeros es menor que de los segundos y lo cual se observa mejor al comparar la evaginación vs la cantidad de miosina. Una observación interesante es el hecho de que la máxima liberación de miosina (24 h) coincidió con el máximo porcentaje de evaginación (Fig 12 A y B).

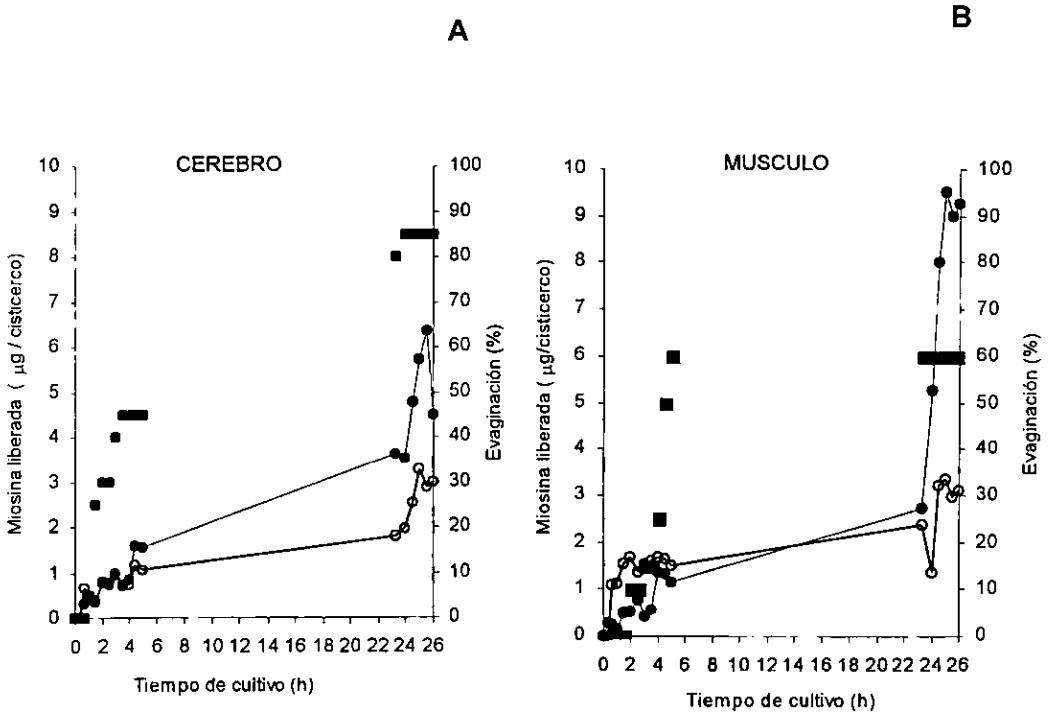


Figura 12 . Cinética de liberación de miosina por cisticercos de *T. solium*

A y B) Cultivo de cisticercos recuperados de cerdo, en presencia (●) y ausencia de bilis (○) de cerdo (5%), se muestra cantidad de miosina liberada al medio y porcentaje de evaginación (■). (A) cisticercos recuperados de cerebro de cerdo y (B) cisticercos recuperados de músculo de cerdo). El total del lote es de 80 cisticercos, 40 provenientes de cerebro de cerdo y 40 recuperados de músculo de cerdo, los lotes se organizaron en grupos de cinco.

5.3.2. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina liberada en cultivo *in vitro*. Según los resultados obtenidos, la miosina contenida en los sobrenadantes de cultivo mantiene su actividad biológica de ATPasa en presencia de actina; ya que, independientemente del tiempo en que la proteína haya sido liberada, se observó que podía ser medida la cantidad de Pi obtenido por la degradación del ATP (Fig 13). La presencia de bilis, como factor de estimulación de la evaginación de los cisticercos, parece que de alguna forma induce a que se incremente sustancialmente la capacidad ATPasa de la miosina.

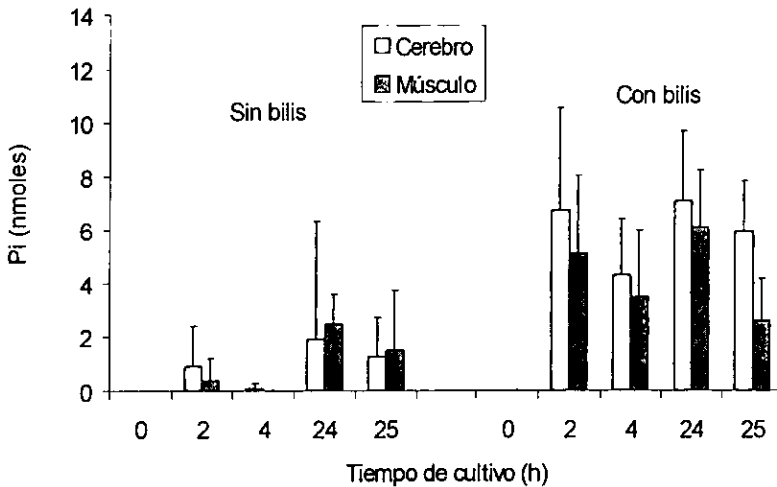


Figura 13. Determinación de la actividad ATPasa de la miosina liberada por cisticercos de *T. solium*. Los parásitos fueron incubados en presencia de bilis o en su ausencia y además, fueron comparados aquellos obtenidos de músculo (barras blancas) y de cerebro (barras grises). Las líneas sobre las barras muestran el valor de la desviación estándar obtenida. A) Sobrenadante de cultivo de cisticercos recuperados de cerebro de cerdo. B) Sobrenadante de cultivo de cisticercos recuperados de músculo de cerdo. C) Comparación entre la actividad ATPasa de miosina liberada en el sobrenadante de cultivo con y sin bilis.

La comparación de la cantidad de miosina liberada por los parásitos recuperados de músculo o cerebro, no correspondió a los niveles de actividad biológica medidos a los mismos sobrenadantes y aparentemente no tienen relación alguna.

5.3.3. Análisis electroforético de miosina liberada. Luego de la tinción con el nitrato de Plata, con los geles obtenidos se observó que en los sobrenadantes de cultivo sin bilis se encuentran bandas de alto peso molecular (iguales a 200 kDa) (Fig 14A), mientras que en los sobrenadantes obtenidos en presencia de bilis, hay aparición de otras bandas situadas entre los 97 y los 200 kDa (Fig 14B). Aquellas bandas situadas en los 200 kDa tuvieron correspondencia con la cadena pesada de miosina comercial de cerdo (Sigma), y con la de miosina extraída de cerdo (Fig 14A). En el caso de los filamentos obtenidos de los parásitos, se observó que en los carriles correspondientes no existen bandas bien definidas (carriles 4, 5), aunque las proteínas encontradas ahí tienen un peso molecular cercano a los 200 kDa y según los resultados de la diálisis (Carril 5), no se logra mejorar la resolución de las bandas. Aparentemente, conforme transcurre el tiempo, no hay variación en la aparición de bandas de 200 kDa durante el cultivo en ausencia de bilis (Fig 14A, carriles 7-10); mientras que, en su presencia conforme transcurre el tiempo de cultivo parece favorecer la aparición de las bandas situadas entre los 97 y 200 kDa (Fig 4B, carriles 7-10). En el caso de la presencia de bilis, aparentemente durante las 2 y 4 h de cultivo, aparecen dos bandas (Fig 14B, carriles 7 y 8) y cuando el tiempo de cultivo se incrementa hasta 23 y 25 h, aparece una banda de menor peso molecular (Fig 14B, carriles 9 y 10). No se observó la presencia de proteína alguna, en el análisis del medio de cultivo en el momento que fueron adicionados los parásitos, así como en el sobrenadante inmediatamente retirado (Fig 14A y B, carriles 6.).

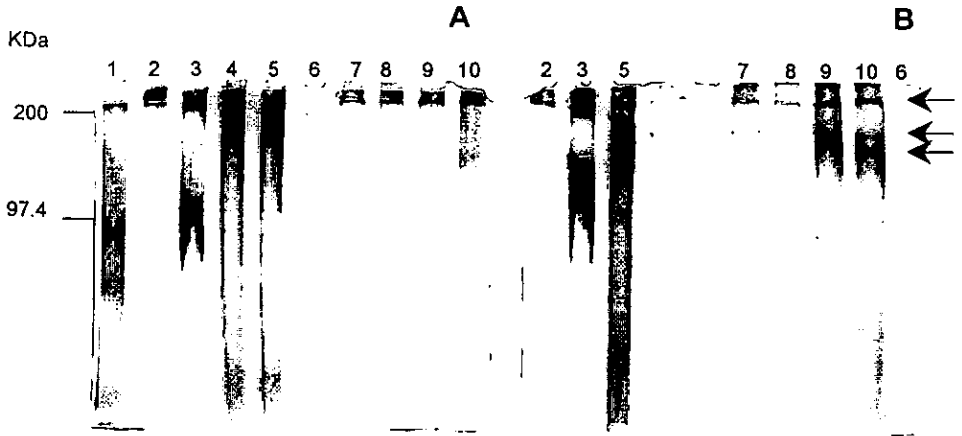


Figura 14 . Electroforesis en geles con glicina de los sobrenadantes de cultivo parasitario de cisticercos de *T. solium* . A) medio de cultivo sin bilis B)medio de cultivo con bilis . 1) Pesos moleculares 2) Miosina comercial en forma de cadena pesada (SIGMA) 3) Miosina extraída de músculo de cerdo (obtenida por precipitación con KCL 4)Miosina extraída de cisticercos de *T. solium* 5)Miosina extraída de cisticercos de *T. solium* y dializada 6) Medio de cultivo recuperado al tiempo cero de la cinética 7) Medio de cultivo recuperado a las 2h 8) medio de cultivo recuperado a las 4h 9) Medio de cultivo recuperado a las 23h 10) Medio de cultivo recuperado a las 25h . Todas las concentraciones de proteínas se ajustaron a 1 μ g por pozo .

Con la idea de evaluar si las bandas reveladas correspondían a miosinas, se realizó la inmunoelectrotransferencia de los geles a PVDF y se enfrentaron con AcM4B3 y policlonales de cadena pesada. Los resultados obtenidos mostraron que los Ac reconocen a la banda correspondiente a miosina tanto purificada de los párasitos (Fig 15A) como de los sobrenadantes de cultivo (Fig 15B) y no pasó lo mismo con el AcM4B3 (Fig 15C). Al parecer esto se debe a que el epitopo reconocido por el AcM no es inmunodominante en el caso de las miosinas liberadas por los cisticercos cultivados.

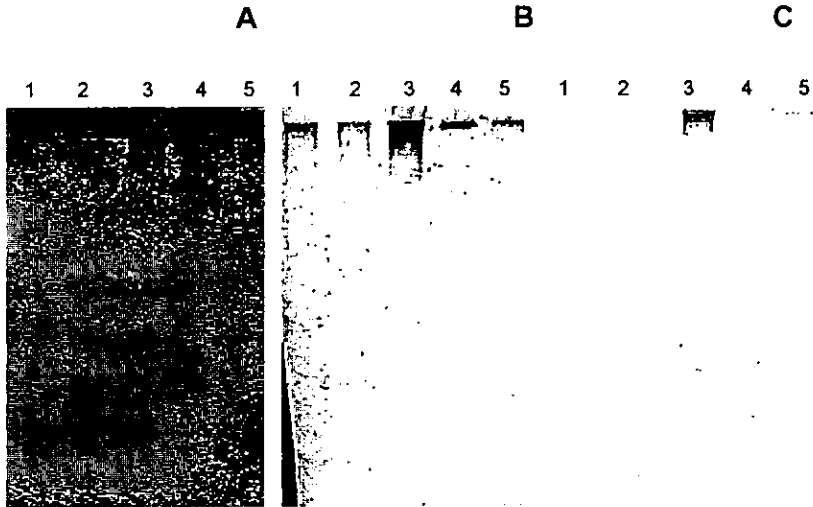


Figura 15 . Inmunoelectrotransferencias para identificar reconocimiento de miosina liberadas al medio de cultivo por diferentes anticuerpos . A) Revelado con suero anticadena pesada de miosina de cisticercos de *T. solium* elaborado en hámster 1) Marcador de peso molecular de 200 kDa 2) Cadena pesada de miosina comercial de cerdo (SIGMA) 3) Miosina de cisticerco de *T. solium* (cadena pesada) 3) Miosina de cisticercos de *T. crassiceps* . B) revelado con anticadena pesada de miosina de cisticercos de *T. solium* en hámster 1 y 2) Cultivo de 2 h de cisticercos de *T. solium* 3) Miosina de cisticercos de *T. solium* (cadena pesada) 4) Miosina comercial (cadena pesada) 5) Marcador de peso molecular 200 kDa C) Revelado con anticuerpo murino monoclonal 4B3 1 y 2) Cultivo de 2 h de cisticercos de *T. solium* 3) Miosina de cisticercos de *T. solium* (cadena pesada) 4) Miosina comercial (cadena pesada) 5) Marcador de peso molecular 200 kDa

Según lo observado por el reconocimiento de los Ac, las miosinas en los sobrenadantes de cultivo son reconocidas por los Ac policlonales de hámster anticadena pesada de miosina; dos bandas son reconocidas (Fig 16B carril 10) cuando en el cultivo hubo medio de evaginación, así como a las 24h de cultivo.

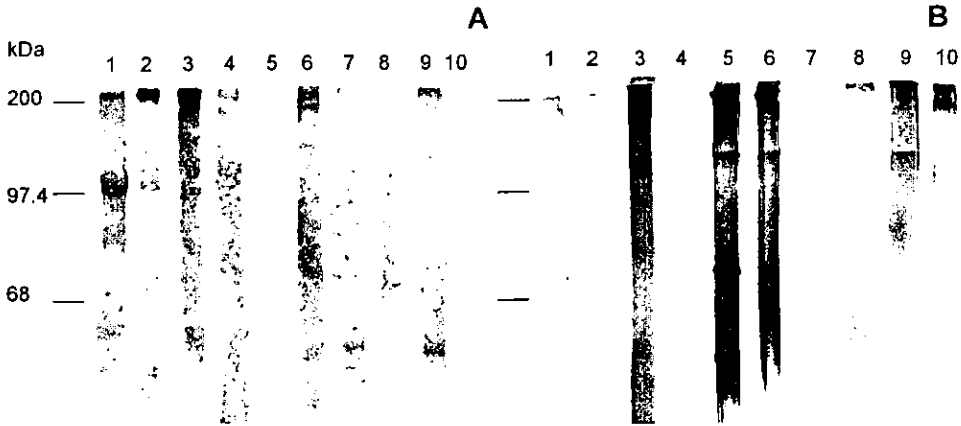


Figura 16. Inmunoelctrotransferencia de miosinas provenientes de cultivo parasitario. Western Blot A) revelado con anticuerpos comerciales anti miosina en conejo (SIGMA) B) revelado con anticuerpos contra cadena pesada en hámster; 1) Marcadores de pesos moleculares , 2) Miosina comercial (Sigma) , 3) Miosina de cisticercos de *T. solium* (nativa) , 4) Miosina de cisticercos de *T. solium* (Cadena pesada) , 5) Medio de cultivo con Bilis al 5% , 6) Miosina de cisticercos de *T. solium* diluida en medio de cultivo con bilis al 5% , 7) Medio de cultivo de cisticercos provenientes de músculo de cerdo a la 26 h de cultivo , 8) Medio de cultivo con bilis al 5% de cisticercos recuperados de cerebro de cerdo a las 5h de cultivo , 3B) Miosina de cisticercos de *T. solium* , 4B) Medio de evaginación 5B) Cadena pesada de miosina de cisticercos de *T. solium* , 6B) Cadena pesada de miosina de cisticercos de *T. solium* con medio de evaginación , 7B) Sobrenadante de cultivo sin bilis a las 26 h de cultivo , 8B) Sobrenadante de cultivo con bilis a las 6 h 9) Medio de cultivo con bilis al 5% de cisticercos provenientes de cerebro de cerdo a las 24 h de cultivo , 10) Medio de cultivo con bilis al 5% de cisticercos provenientes de cerebro de cerdo a las 26 h de cultivo.

5.4. Miosina en suero y líquidos cefalorraquídeos de humanos y cerdos infectados.

5.4.1. Detección de miosina de *T.solium* .

Según los resultados obtenidos, sólo es posible la detección de miosina en muestras provenientes de cerdo mientras que en las de humano aparentemente no es posible detectar a la proteína (Fig 17), aunque las muestras hayan sido sometidas a una ruptura de complejos inmunes con TCA. De igual manera es posible que la miosina de los parásitos no se vea afectada por el tratamiento empleado para su recuperación a partir de las muestras (Fig 17).

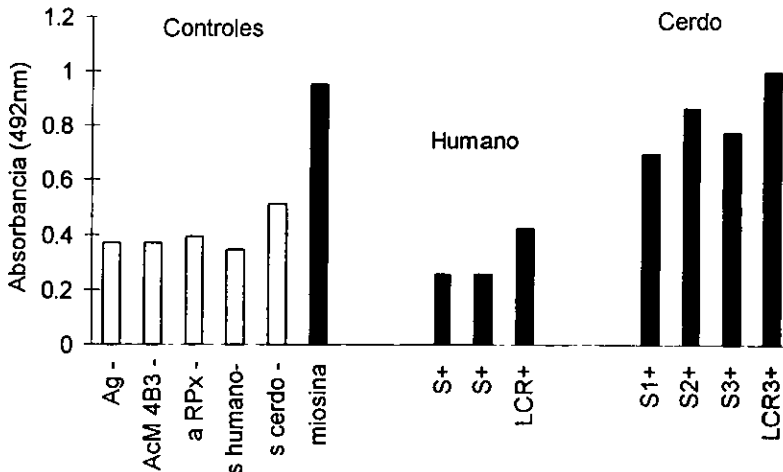


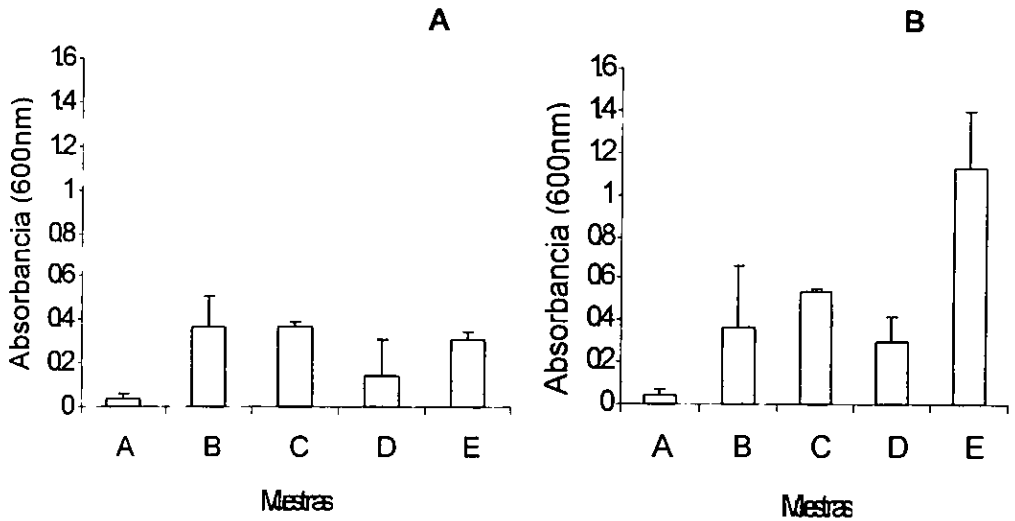
Figura 17. Detección por ELISA de miosina de *T.solium* en fluidos biológicos. Previo al estudio, los fluidos fueron sometidos a un tratamiento con AcTAcO al 2%. Posteriormente, para la detección de miosina fueron empleados sobrenadantes de cultivo de hibridoma Ag68X63 como Ac primarios. luego para revelado, las muestras fueron hechas reaccionar con un Ac de cabra secundario anti IgG de ratón peroxidado (1:2000). Los controles del ensayo fueron: Ag - (sin Antígeno), ACM - 4B3 (sin Ac primario), - aRP (sin Ac secundario). Las muestras fueron sometidas a ruptura de complejos inmunes con ácido tricloroacético y detección mediante el empleo del anticuerpo monoclonal murino 4B3. (BC) Pozo únicamente con buffer de carbonatos (sin 4B3) sin adicionar el anticuerpo monoclonal (sin secundario) sin adición del anticuerpo anti ratón peroxidado (s humano -) suero de humano no infectado con cisticercos (miosina) miosina de cisticercos de *T.solium* adicionada a suero de humano sano (S +) suero de humano infectado diagnosticado por Western Blot (LCR +) LCR de humano infectado v positivo a western Blot (s cerdo -) Suero de cerdo no infectado por cisticercos .

5.4.2. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina purificada de fluidos biológicos.

La detección de actividad enzimática MgATPasa dependiente de actina para la miosina liberada al medio de cultivo, se encuentra activa ya que es posible detectar al P_i liberado (en presencia de actina homóloga), lo cual es una forma indirecta de medir la actividad enzimática de la miosina; Los resultados muestran que en el sistema de cultivo parasitario es posible encontrar P_i liberado.

La evaluación de la actividad MgATPasa dependiente de actina, en presencia de bilis al 5%, mostró que dicha actividad se encuentra incrementada una vez que el parásito ha evaginado. El aumento de tal actividad enzimática es independiente del origen de los cisticercos, aunque los parásitos provenientes de cerebro liberan más miosina.

Un aspecto notorio es el perfil de actividad mostrado por cada purificado, ya que mientras se encuentra con un mayor grado de pureza la miosina obtenida por captura con 4B3 no cuenta con tanta actividad como en el caso del extracto salino de miosina proveniente de fluidos de cerdo. Con la captura de miosina con el anticuerpo monoclonal 4B3 se asegura una gran pureza, pero la limitante que se tiene es que la miosina que es reconocida por el anticuerpo 4B3 corresponde a la miosina liberada en condiciones normales de cultivo y las otras isoformas no (Fig 18).



Gráfica 18. Actividad de ATPasa de purificados de miosina de fluidos de cerdo infectado A) Purificado mediante captura con Abm 4B3 B) Extracción salina de miosina con KCl 0.6 después de una ruptura de complejos inmunes con TCA 2% . (A) Agua MilliQ usada para el estudio (B) Miosina purificada de cisticercos de *T. solium* adicionada a suero de cerdo no infectado en cantidad de 1 μ g (C) suero de cerdo sano (D) suero de cerdo infectado (E) LCR de cerdo infectado . La actividad ATPasa se determinó mediante la medición de Pi liberado por la hidrólisis de ATP (ver apéndice) en presencia de actina purificada de cisticercos de *T. solium*

5.4.3. Electroforesis de miosina purificada de suero de cerdo infectado

Según el análisis electroforético es posible aislar la miosina contenida en sueros de cerdo infestado (Fig 19 carril 4) la cual presenta un peso molecular semejante al de la cadena pesada de miosina de cisticerco (Fig 19 carril 2) y a la liberada por los parásitos adultos en cultivo (Fig. 19 carril 5).

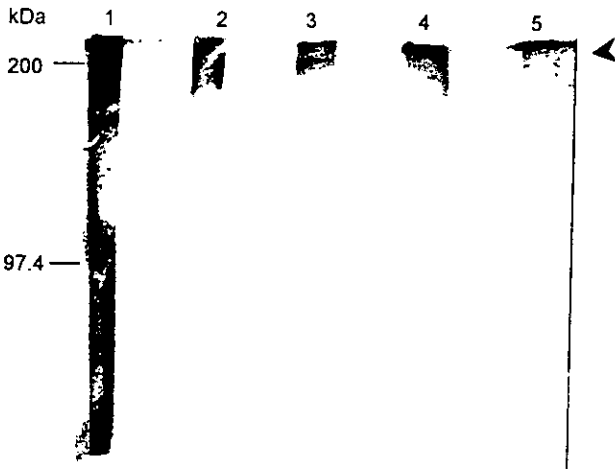


Figura 19. Análisis en gel con glicina de miosina purificada por captura con 4B3 a partir de suero de cerdo infectado. Se muestra el perfil electroforético de pesos moleculares de referencia (1) Cadena pesada de miosina de cisticercos de *T. solium* (2) Cadena pesada de miosina liberada por cisticercos de *T. solium* en condiciones de cultivo sin bilis a las 12 h (3) Cadena pesada de miosina purificada de sangre de cerdo infectado (método de captura en placa) (4) Miosina liberada por parásito adulto de *T. solium* cultivada in vitro (5). La punta de flecha indica la presencia de cadena pesada

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1. Evaluación de la purificación y del reconocimiento de miosina por AcM 4B3.

Bajo las condiciones experimentales usadas fue posible obtener a la miosina de cisticercos tanto en su forma nativa como en la forma monomérica o de cadena pesada; para su obtención de esta miosina, tuvieron que ser utilizadas condiciones desnaturalizantes que favorecieran a la separación de los monómeros.²⁷

Una de las dificultades más importantes a las que hay que enfrentarse en el estudio de la miosina es la degradación proteica, al parecer esta proteína tiene una vida estable corta, por lo que fue necesario para estudios más finos el emplear una modificación a la purificación antes utilizada y esta consistía en adicionar EDTA 5 mM como inhibidor de metaloproteasas ya que está reportado que los extractos salinos de cisticercos de *Taenia solium* son ricos en proteasas de este tipo. La separación de monómeros no alteró el sitio de reconocimiento de los Ac's M 4B3, ya que ellos siguieron reaccionando con las proteínas de igual manera como había sido demostrado en otros estadios. Inclusive también en los resultados se pudo observar que los Ac's M4B3 reaccionaban con más de una fracción antigénica de 200 kD, lo cual nuevamente apoyaba la posibilidad de que existieran más de una forma de cadena pesada de miosina como ha sido demostrado en otras miosinas no parasitarias.^{6, 26, 35, 58, 71, 80, 112 y 114}

Es interesante el hecho de que existan isoformas de miosina en los parásitos adultos y en los cisticercos ya que pueden estar asociadas a mecanismos especializados del metacéstodo en los cuales la isoforma no presente en el parásito adulto intervienen, sobre las diferencias entre el metacéstodo y el parásito adulto a nivel de sus proteínas tanto estructurales como enzimas no se sabe mucho, pero indudablemente debe haber proteínas estructurales y enzimas del tegumento o del metabolismo que en el parásito adulto se expresan mientras que en la fase larvaria no o se expresan de manera diferente.^{24, 72 y 104}

Al respecto Moore L. y col. (1992) reportaron que en diferentes estadios de desarrollo de los pollos se da un cambio de isoformas de miosinas (monitoreado por la secuencia de cada miosina) es un efecto del corte y empalme alternativo en los genes de miosina, y aunque en todo momento del desarrollo pueden estar presentes todas las isoformas, son una o varias isoformas

las que predominan, este puede ser el caso de la miosina de *T. solium* en las fases de cisticerco y adulto.

6.2. Análisis de la miosina purificada por electroforesis en geles de EDTA/glicina.

Debido a que la demostración de la presencia de isoformas de miosina no era fácilmente reproducibles en geles convencionales de acrilamida de gradiente continuo, se decidió implementar otro tipo de electroforesis basada en la separación de las proteínas mediante geles que contienen EDTA en el gel superior y glicina en el gel inferior. Estos geles con un bajo contenido de acrilamida (6.5%) permiten la entrada de proteínas de alto peso molecular, con relativa facilidad, al gel separador.¹¹²

El gel con glicina presenta el mismo principio de separación que el GELPOLI-DSS habitual, la diferencia radica en que hay dos componentes adicionales: 1) Adición de EDTA a la formulación del gel superior con la finalidad de eliminar cationes divalentes (como calcio) que puedan estar interaccionando con las proteínas de manera que las estabilice o favorezca su polimerización, 2) Incorporación de glicina al gel separador que en condiciones de pH básico (8.7) forma la especie glicinato de carga neta negativa. Bajo estas condiciones, al estar cargado el gel con una carga neta negativa, va a retener proteínas que tengan gran número de cargas parciales positivas con lo que se logra someter por largos espacios de tiempo a las proteínas bajo un intenso campo eléctrico favoreciendo su separación (mientras más grande sea una proteína más cargas parciales positivas va a tener) y ello se ve reflejado en una mayor definición de bandas por efecto de este campo eléctrico intenso que se induce para separar las proteínas y una carga opuesta que limita la migración de proteínas. En el caso de la glicina que esta contenida en la solución amortiguada de corrida, se encuentra en forma de zwitterion al igual que el que está en el gel superior (pH 6.5), por lo que hay una carga total neutra en estos sitios.³³

Para corroborar esto se empezaron los primeros ensayos con la finalidad de optimizar la corrida electroforética en cuanto a condiciones de voltaje y tiempo en el sistema Hoffer de minigeles. Las condiciones resultantes de la estandarización y optimización de la técnica de electroforesis en geles de glicina, con respecto a las originales fueron muy diferentes a las

inicialmente reportadas ya que hubo que adaptar las condiciones a minigeles, por lo cual se estandarizaron el tiempo de corrida y la cantidad de proteína que se adiciona por carril. La tinción a utilizar en este tipo de geles es la de Zinc Imidazol debido a la rapidez de revelado o la tinción de plata modificada por Blum por su sensibilidad.^{10 y 39}

En el análisis electroforético de la miosina de cisticercos tratada con coctel especial para separación de isoformas en su forma de cadena pesada facilitó la identificación del número de isoformas presentes en los parásitos la tinción inversa de Zn-imidazol. Dos bandas fueron visualizadas por IET (Fig 8B) correspondientes a la miosina y la resolución de su separación se logró a través del sistema de geles con glicina. Un análisis de la banda más pesada revelada en IET (Fig 8 B carril 5) mostró que puede haber separación de cinco bandas las cuales tienen poca diferencia de peso molecular entre ellas.

Se logró la detección por IMP y ELISA de miosina liberada por cisticercos mantenidos en cultivo *in vitro*. El empleo del anticuerpo monoclonal 4B3 evitó las posibilidades de reacciones cruzadas con otras proteínas. La idea de haber utilizado esas técnicas es porque reunían características de alta sensibilidad y bajo fondo de reacción.

Las condiciones estandarizadas para su uso con medio de cultivo (diluciones de anticuerpos, tiempo de incubación y bloqueo) permitieron que se logrará alta sensibilidad al método de ELISA y fuera de 0.035 µg de miosina / pozo y en la técnica de IMP fuera de 0.5 µg de miosina/punto.

6.3. Miosina en sobrenadantes de cultivo.

Según lo reportado acerca de la inmunolocalización de miosina, tanto en cisticercos como en tenias, esta proteína es de localización muscular y cabría la posibilidad de que su papel biológico, durante el fenómeno de evaginación de los cisticercos, fuera muy importante para la motilidad de los parásitos y por ello se decidió estudiarla durante dicho fenómeno. De igual importancia podría ser el papel de la miosina liberada por los parásitos, ya que también a sido demostrado que en los sobrenadantes de heces de hamsters infectados y en sobrenadantes de cultivos de tenia hay miosina de los parásitos.⁶

En este sentido, preguntas como ¿la miosina es liberada por tener alguna función fuera del parásito?, ¿se encuentra íntegra?, ¿tiene implicación en la interacción hospedero- parásito?, son planteamientos susceptibles de ser estudiados. Con el IMP pudo detectarse a la miosina liberada de cisticercos en presencia y en ausencia de bilis, y hubo interferencia por la bilis de cerdo a pesar de la baja reactividad con los Ac's. El empleo del medio de cultivo complementado y con bilis dió menor reactividad que la bilis sólo y eso fue útil para la detección de la proteína. Los cisticercos cultivados, bajo las condiciones establecidas, aparentemente no generaron daño alguno a la viabilidad de los parásitos ni a su integridad morfológica cuando se les observaba con el microscopio invertido a un aumento de 10x y 45x.

Según los resultados obtenidos, la adición de bilis al medio de cultivo, fue un fuerte estimulante de la actividad muscular del parásito ya que incluso sus movimientos se vuelven más vigorosos por estímulo de la evaginación. El análisis de la miosina liberada bajo estas condiciones, con el uso de geles con glicina, mostró que en presencia de bilis podría ser inducida la expresión de isoformas diferentes cuando hay estímulo (Fig 14) esto podría llevar a varias consideraciones como que los parásitos liberen esta proteína con la finalidad de que interaccione con otras proteínas del hospedero y así modular su microambiente de alguna manera, que los parásitos la liberen con la finalidad de cambiar las isoformas de miosina del estadio larvario por las isoformas útiles para el parásito adulto ò porque los parásitos liberen esta proteína para enmascarar una respuesta inmune del hospedero, ya que las miosinas tipo II son altamente conservadas tanto la

miosina del hospedero como del parásito deben ser muy parecidas, entonces el sistema inmune del hospedero no tendría porque reaccionar en contra del parásito si este presenta Ag's a su alrededor semejantes a los del hospedero.^{21, 22 y 29}

Cuando los parásitos fueron cultivados en presencia de prazicuantel (PZQ), se vió claramente que los parásitos se dañaron y ello se reflejó en el IMP, por el aumento en la liberación de miosina. Este mismo efecto se observó en presencia de 2,3-butanediona monoxima (BDM). Posiblemente el efecto del PZQ pudiera estar asociado a nivel de los canales de calcio del cisticerco. En el caso del BDM se alteran los mecanismos de fisión y motilidad actomiosina dependiente, principalmente por la inhibición específica de la actividad ATPasa de miosina y se ha visto que influye en la excreción / secreción de sustancias (Fig 11).^{43, 104 y 107}

6.3.1. Cinética de liberación de miosina en cultivo parasitario.

De acuerdo a la estandarización de las condiciones de cultivo de los cisticercos, evaluadas mediante la detección de miosina con la técnica de ELISA, se determinó que el punto de interés en el seguimiento de la cinética se encontraba antes de las 26 h de cultivo, dado que después no se presentaban cambios apreciables en cuanto a la cantidad de miosina liberada (Fig 12)

La evaluación de la miosina liberada tanto por cisticercos recuperados de músculo como de cerebro, mostró que no había una influencia del origen de los cisticercos en su liberación de miosina (Fig 12A y 12B). En ambos casos, la adición de bilis al medio de cultivo, estimuló la evaginación de los cisticercos. Es importante notar que a mayor cantidad de miosina liberada por parte de los parásitos hay un menor porcentaje de evaginación (Fig 12B), si los parásitos no evaginan por no ser estimulados a ello entonces la cantidad de miosina liberada es poca (menos de 3 μ g por cisticerco a las 24h), estos sugiere que los parásitos para evaginar requieren liberar miosina, pero si se libera en exceso puede interferir con la capacidad de evaginar del parásito. Cuando se liberan más de 6 μ g de miosina el porcentaje de evaginación disminuye, lo que evidencia que debe existir un equilibrio (y como consecuencia un mecanismo de control) entre la miosina requerida en el interior del parásito y que se libera de manera habitual por el parásito que

no ha sido estimulado hacia la evaginación sin exceder una concentración de $3\mu\text{g}$ en el medio. Por tanto un parásito que libera entre 3 y $6\mu\text{g}$ de miosina (a las 24 h) tiene una mayor posibilidad de evaginar que un cisticerco que libera más de $6\mu\text{g}$ de miosina (a las 24 h).^{17 y 43}

6.3.2. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina liberada en cultivo *in vitro*.

Con los actuales resultados no es posible explicar los mecanismos por los cuales se da un aumento o disminución en el fenómeno de evaginación, debido a la gran intensidad con que se tiene que presentar la actividad muscular durante la evaginación, se tendría que pensar que esta proteína debería estar en mayor concentración dentro del parásito. Esto hace surgir una pregunta con respecto a esta gran cantidad de miosina liberada, y esta es ¿la proteína liberada se encuentra íntegra y si es así presenta alguna actividad MgATPasa? .Para contestar esta pregunta se buscó determinar la actividad ATPasa de la miosina liberada, mediante la técnica colorimétrica para la detección de Pi, producto de la hidrólisis enzimática de ATP. Este método colorimétrico fue adaptado en el laboratorio a la activación enzimática de la miosina.^{53 y 87}

Debido a que las concentraciones de miosina a utilizar en el estudio, de acuerdo con la técnica estandarizada, eran menores se adaptaron los volúmenes de reacción con la finalidad de utilizar la menor cantidad de sobrenadante de cultivo parasitario posible sin alterar la linealidad en la determinación de Pi por la técnica colorimétrica utilizada (ver apéndice) gracias a esto fue posible determinar la actividad enzimática de la miosina liberada (Fig 13) tanto en sobrenadante de cultivo con bilis y sin bili.

Una vez que se determinó que la miosina liberada se encontraba activa, se decidió determinar si se encontraba íntegra.

6.3.3. Análisis electroforético de miosina liberada.

El análisis electroforético de los sobrenadantes de cultivo, empleando geles con glicina (figura 4), mostró que la miosina liberada se encuentra íntegra con un peso molecular de 200 kDa.

Un fenómeno interesante que se observó en los análisis electroforéticos, fue que bajo condiciones de evaginación, hubo la aparición de dos nuevas bandas de un menor peso molecular (Fig 14B) y las cuales podrían corresponder a isoformas de miosina . No es posible visualizar estas bandas por IET a partir de geles con glicina ya que las proteínas quedan atrapadas en el gel, por lo que se optó por realizar una IET a partir de un análisis electroforético habitual (Fig 16B) y solo se lograron separar dos bandas, que son reconocidas por anticuerpos anti miosina de cisticercos de *T. solium* preparados en hámster. Es posible que la aparición de estas isoformas esté relacionada con el aumento de la actividad enzimática de la misma frente a condiciones de evaginación de los cisticercos .

Cuando se analizaron las bandas por IET, se encontró que dependiendo de con que anticuerpos se hiciera el revelado se presentaba un reconocimiento diferente de bandas. Cuando fueron usados los anticuerpos policlonales anti cadena pesada de miosina se observó un mayor reconocimiento hacia la miosina liberada, mientras que al usar al AcM 4B3 se observó un reconocimiento preferente por miosina purificada y poco reconocimiento de la miosina liberada. Estos resultados indican que posiblemente bajo ciertas condiciones ambientales, la miosina liberada por los cisticercos presentan el epítipo reconocido por el AcM4B3 en diferentes proporciones con respecto a la miosina que es purificada de los parásitos. Este hallazgo es importante, ya que si se pretende detectar a la miosina , como Ag circulante durante la infección parasitaria , se tendría que buscar un anticuerpo policlonal específico contra la miosina liberada por los parásitos .

Debido a problemas de la IET a partir de geles de glicina, porque la proteína era retenida en el gel, se tuvo que volver a emplear la IET a partir de geles preparados de manera habitual y se observó que los Ac's reaccionaban con más de una banda, lo cual podría ser un fuerte indicativo de que existen isoformas de miosina .

Otra posible explicación de que los AcM's no reconozcan preferentemente a la miosina liberada, puede ser que esta miosina que es liberada presente epítipos diferentes a la encontrada en los extractos de los parásitos completos parásitos completos.

6.4. Miosina parasitaria en fluidos biológicos de hospedero infestado.

6.4.1. Detección de la miosina en fluidos biológicos.

Fue posible la detección de la miosina por la técnica de ELISA utilizando como anticuerpo primario al AcM4B3, aunque este anticuerpo no reconoce preferentemente a la miosina liberada su uso permitió asegurar la no reacción con otros productos de liberación de los parásitos y otras proteínas del propio hospedero, en suero y LCR de cerdos infestados de manera natural mientras que ello no fue posible en humanos infectados, la explicación más lógica se refiere a la carga parasitaria de los hospederos. ⁶

6.4.2. Purificación de Miosina a partir de fluidos biológicos.

Con la idea de mejorar la identificación y purificación de miosina, se buscó adaptar un método de captura de Ag's con AcM's 4B3 y la posterior ruptura de estos complejos inmunes con la finalidad de recuperar la miosina con un alto grado de pureza. Gracias al empleo de esta técnica se logró purificar la miosina circulante en el suero del hospedero intermediario infectado con cisticercos, para poder someterla a ensayos de actividad enzimática y análisis electroforético en geles con glicina. Los resultados mostraron que la miosina purificada a partir de suero de cerdo presenta menor actividad enzimática que la miosina purificada a partir del parásito completo.

Una posible causa de que la miosina purificada a partir de fluidos biológicos presente una menor actividad ATPasa, puede ser debido a que la miosina liberada (en condiciones de estímulo de evaginación) presenta una actividad elevada atribuible a las isoformas encontradas, mientras que el AcM4B3 (utilizado en la purificación por captura de miosina) sólo reconoce una isoforma que puede ser la de menor actividad biológica. ⁶

El análisis por electroforesis en geles con glicina de la miosina purificada de fluidos biológicos del hospedero mostró que se encuentra íntegra (Fig 19) lo que confirma que la proteína se encuentra activa.

6.4.3. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina purificada de fluidos biológicos.

Con los resultados obtenidos no es posible ni determinar el papel biológico de la miosina liberada por los cisticercos ni su papel en la relación hospedero-parásito. Es de llamar la atención que la proteína liberada esté completa y mantenga su actividad enzimática tanto en condiciones de infección natural como en condiciones *in vitro*. Resulta interesante un reporte en el cual se demuestra que las miosinas tipo II en su porción filamentosa son activadores y sustrato del plasminógeno.⁹³

Aunque a la miosina liberada por los cisticercos no le ha sido demostrada ninguna actividad vinculada con la relación hospedero parásito, el que se trate de una proteína tan grande fortalece la posibilidad de que pueda interactuar con otras proteínas semejantes como son la paramiosina, ya que puede haber cierta afinidad entre estas, debido a que se copurifican (como pasa en los casos de purificación de proteínas estructurales y organizadoras del citoesqueleto) y entonces cobra sentido este supuesto si se considera que la paramiosina interactúa con otras proteínas fuera del cisticercos (como son colágeno y proteína C1q de la cascada del complemento), entonces la función de la miosina y sus posibles isoformas pudiera estar dada de una manera semejante o en colaboración con la paramiosina, en el caso de que fuese así se podría comenzar la búsqueda del papel de la miosina en la relación huésped parásito, en la formación de la cápsula que en alguna ocasiones recubre a los cisticercos dentro del hospedero.^{61 y 63}

Finalmente, el mecanismo por el cual la miosina es liberada por los parásitos, es un dilema que pudiera ser estudiado en detalle y es un caso semejante al de la paramiosina (otra proteína estructural) en el cual no se ha dilucidado el mecanismo de liberación y no se ha dado explicación alguna. Posiblemente al estimular la evaginación de los parásitos y empleando algún tipo de marcaje de las miosinas liberadas, podría prestarse para un estudio de microscopía de luz o electrónica con la finalidad de localizar la salida de la miosina del parásito.⁶

CAPÍTULO VI . CONCLUSIONES.

Se logró purificar la miosina de cisticercos de *T. solium* en sus formas de miosina nativa y cadenas pesadas .

Con la miosina purificada se logró la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas para su detección de miosina, las técnicas tuvieron alta sensibilidad (0.035 µg) y mantuvieron la especificidad por el empleo del AcM 4B3.

De igual manera con la obtención de miosina en ausencia o presencia de metaloproteasas ,se logró la adaptación de la técnica de electroforesis en geles con glicina a un sistema de minigeles . Ésta técnica permitió la visualización de isoformas de miosina.

Se logró la estandarización de las condiciones adecuadas de cultivo de cisticercos, con lo que se pudo detectar la miosina liberada y además gracias a esto se pudo evaluar la influencia en la evaginación.

Se logró determinar que la liberación de miosina por parte de los parásitos es estimulada por la inducción de la evaginación.

Posiblemente los Ac'sM 4B3 solo reconocen una sola forma de miosina, la cual es diferente a las liberadas por los parásitos durante su evaginación.

La estandarización de la captura de la miosina para su purificación permitió que a partir de LCR y suero de cerdo, en los cuales se había determinado la presencia de miosina por ELISA, se pudiera establecer que la proteína se encuentra circulando íntegra y activa.

Por lo que se puede afirmar que la miosina liberada por los cisticercos *in vitro* e *in vivo* se encuentra en forma de miosina nativa.

CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos y su análisis, surgen varios puntos que podrían ser estudiados y que podrían brindar más claridad sobre el papel que juegan las miosinas que han sido liberadas por los parásitos.

- Elaborar anticuerpos monoclonales contra la miosina liberada por cisticercos de *T. solium* que puedan ser utilizados en la técnica de ELISA en la detección de miosina circulante en fluidos biológicos de hospederos infestados.
- Estudiar posibles bloqueadores de la liberación de miosina (probablemente cestocidas) con la finalidad de conocer más sobre los mecanismos de liberación implicados.
- Implementar técnicas de microscopía con la finalidad de localizar en el parásito la miosina que es liberada.
- Ya que la miosina liberada por parásitos ha sido detectada y purificada en fluidos biológicos del hospedero intermediario, pero no en el definitivo, entonces es posible que se produzcan anticuerpos por parte del hospedero que reconozcan a la miosina liberada de cisticercos de *T. solium*, si fuera así el caso, aumentaría la posibilidad de desarrollar una nueva tecnología diagnóstica altamente específica y sensible basada en la búsqueda de estos Ac's.

- Continuar con la búsqueda de isoformas por técnicas de IET.
- Realizar digestiones enzimáticas de cada una de las isoformas con la finalidad de identificar los sitios que las diferencien.
- Resolver la inquietud de si las isoformas de miosina en cisticercos de *T. solium* son las mismas isoformas presentes en el parásito adulto y, además, si estas son diferentes con respecto a otros parásitos ténidos .
- Comparar lo descrito de proteínas liberadas de alto peso molecular que pudieran ser miosina como en el caso de *S. mansoni* con lo estudiado en cisticercos de *T. Solium*.
68, 69 y 91
- Determinar experimentalmente si existe afinidad entre la miosina, colágeno y el componente C1q del complemento como lo existe en el caso de la paramiosina.

Determinación de proteínas por el micrométodo colorimétrico de Bradford.¹⁰

La técnica empleada para la determinación de proteínas está basada en un microensayo utilizando un reactivo comercial (BIO RAD Protein Assay) modificado, que en un principio fue propuesto por Bradford en 1976. El fundamento del método es el virre del azul brillante de coomasie G-250 con respecto a la concentración de proteínas, debido a su afinidad a residuos de arginina y en menor proporción a histidina, tirosina, triptófano, lisina y fenilalanina. Para las determinaciones de concentración de proteína total en los extractos de miosina se utilizó como estándar a la Albúmina Sérica Bovina fracción V (ASB, SIGMA).

Curva de calibración de proteínas para Miosina nativa.

Las alícuotas del estándar de ASB (1µg/ µl) de la curva de calibración con la concentración establecida (ver tabla 1), fueron colocadas en tubos de ensayo a los que posteriormente se les adicionaron el volumen correspondiente de agua para después de agitar adicionar 200µl del reactivo de Bradford (Bio Rad) a una dilución previa de 1:2 con agua bidestilada. Con los valores de Absorbancia que se obtuvieron con la proteína estándar, se realizó una regresión lineal y con ella se interpolaron los valores de absorbancia presentados por las muestras para poder obtener su concentración final.

µl de ASB (1µg/µl)	Reactivo comercial (µL)	H ₂ O	D . O (590 nm)
0	200	800	0
5	200	795	0.3406
10	200	790	0.5251
15	200	785	0.6783
20	200	780	0.8837
25	200	775	0.9193

Tabla 1: Muestra la distribución de la curva de calibración de proteínas para el caso de la Miosina nativa.

Determinación de la concentración de proteína a muestra problema .

La determinación de la concentración real se hace con base a los valores de absorbancia promedio de la muestra y, mediante una regresión lineal utilizando los valores promedio de la proteína estándar y sus concentraciones conocidas . Se interpolan los valores de concentración respectivos ,los cuales fueron calculados con su valor real al considerar la dilución inicial de las muestras analizadas .

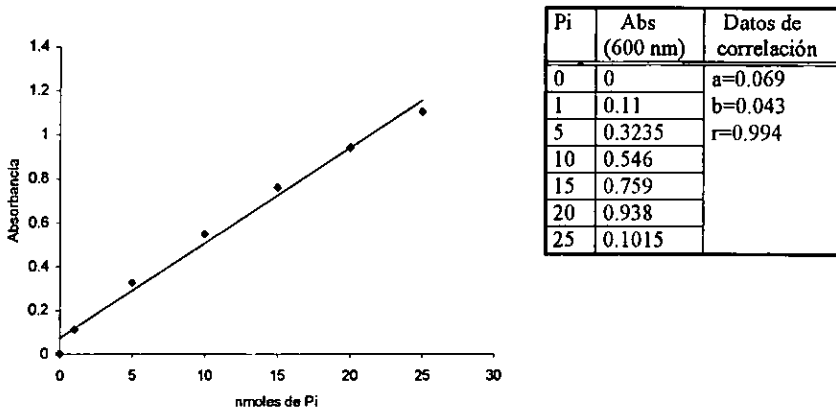
Determinación de fósforo inorgánico (Pi) para actividad ATPasa .³²

Se mezclan una parte de solución A (Polivinilalcohol 0.55% y verde de malaquita 0.055%) con una parte de solución B (Molibdato de amonio 2.5% preparado en HCl 4N) y se adicionan 4 mg de P-metilaminofenol sulfato por cada ml de solución reactiva , se mezclan bien y se dejan reposar 30 min. antes de usarse .

A la muestra (o los puntos de la curva patrón que debe contener de 1-25 nmoles de Pi) , se le lleva a un volumen final de 400 µl con agua Milli Q , se le adicionan 400 µl de mezcla reactiva y se deja incubar por espacio de 2 min. , al cabo de los cuales se detiene la reacción con 400 µl de ácido cítrico al 10%. Después de 30 min se lee a 600 nm (el color es estable 2 h).

Determinación de la concentración de Pi .

La determinación de la concentración real de Pi se hace con base a los valores de absorbancia promedio de la muestra y, mediante una regresión lineal elaborada con los valores promedio de fósforo inorgánico y sus concentraciones conocidas . Entonces se interpolan los valores de concentración respectivos ,los cuales fueron calculados con su valor real al considerar la dilución inicial de las muestras analizadas . (ver gráfica 1)



Gráfica 1 . Se muestra la curva de calibración para la determinación de Pi producto de la actividad ATPasa de miosina y en el recuadro se muestran los valores promedio obtenidos y sus correspondientes valores de correlación .

Electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS

La electroforesis es el movimiento de las moléculas cargadas en un inductor eléctrico utilizando un medio de soporte, método empleado profusamente para la separación analítica de moléculas biológicas. El medio puede ser un amortiguador, un gradiente de sacarosa, papel de nitrocelulosa, celulosa o geles de poliacrilamida, almidón o agarosa. El método comúnmente empleado es la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-GELPOL). El SDS desnaturaliza las proteínas al romper interacciones no covalentes y les confiere una carga neta superficial negativa. En estas condiciones las proteínas migran de manera diferencial dependiendo de su tamaño (peso molecular) y de esta manera se separan. La diferencia de migración se puede modular por el tamaño de poro del gel que es reflejo de la proporción y concentración de acrilamida y bisacrilamida. Tienen diferentes tamaños dependiendo de la concentración a la que estos hallan sido empleados. Las proteínas pueden someterse a condiciones reductoras mediante el empleo de β -mercaptoetanol, urea, tiourea u otro, ya que rompen puentes disulfuro, por lo que pierden su estructura secundaria y en cambio mantienen su estructura primaria.

Los geles fueron preparados en forma de gradiente continuo a diferentes concentraciones y con los reactivos correspondientes, como se muestra en la tabla 2. Se emplean para dichos fines dos tipos de geles: un gel superior en el cual mediante la formación de un gradiente de voltaje en la fase líquida se concentra la muestra; y un gel inferior o separador en el cual se logra la separación de las proteínas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS con glicina.

El gel con glicina presenta el mismo principio de separación que el SDS-PAGE habitual, la diferencia radica en dos componentes adicionales, uno es la adición de EDTA a la formulación del gel superior lo que tiene como finalidad el eliminar cationes divalentes (como calcio) que puedan estar interaccionando con las proteínas ya sea estabilizándolas o favoreciendo su polimerización. En el gel separador se incorpora glicina que en condiciones de pH básico (8.7) forma la especie glicinato de carga neta negativa, al estar cargado el gel con una carga neta negativa va a retener proteínas que tengan gran número de cargas parciales positivas (mientras más grande sea una proteína más cargas parciales positivas va a tener) con lo que se logra una mayor definición de bandas por efecto de un campo eléctrico intenso que se induce para separar las proteínas y una carga opuesta que limita la migración de proteínas.

En el caso de la glicina que está en el amortiguador de corrida se encuentra en forma de zwitterion al igual que el que está en el gel superior (pH 6.5), por lo que tiene una carga total neutra.

Preparación de geles y corrimiento electroforético.

Se lavan los vidrios con agua destilada y alcohol al 70%, se secan perfectamente y se montan en el aparato para la elaboración de geles (Hoffer) en el siguiente orden: a) vidrio b) 2 separadores c) alúmina y se fijan con la ayuda de pinzas especiales (Hoffer). Se preparan por separado las mezclas del gel, separador (tabla No 1) y del gel concentrador (tabla No 2), sin agregar el TEMED (catalizador) hasta que fueran a ser utilizados. Se agrega la mezcla del gel separador (con el cuidado de formar el menor número de burbujas) y la solución se vacía en el sándwich lentamente con una pipeta pasteur evitando la formación de burbujas. Inmediatamente se adicionaron 200 μ L de Isobutanol - Agua bidestilada (1:1), con la finalidad de favorecer una superficie plana en la superficie y evitar protuberancias que modifiquen el corrimiento electroforético y se dejó reposar hasta que se realice la polimerización completamente (de

preferencia se preparan un día antes de usarlos para mayor nitidez de bandas) .Se lava la superficie del gel con Agua bidestilada para eliminar el alcohol-agua .

Posteriormente se adicionó el TEMED a la mezcla del gel concentrador el cual se adicionó sobre el gel separador previamente montado en la cámara de Electroforesis y se coloca el peine adecuado evitando la formación de burbujas, se espera la polimerización del gel , posteriormente se retira el peine y se lavan los pozos con el amortiguador de corrida.

Se llena la cámara con el amortiguador de corrida en la parte de abajo y en la parte anterior del gel hasta el borde de la cámara .

Se agregaron en los pozos formados en el gel las muestras requeridas , previamente hervidas en proporción 1:1 en coctel de muestra que en su formulación contiene azul de bromofenol como frenete de corrida.Se conecta la cámara a la fuente de poder (Bio Rad Power Pack 1000), ajustándose a las condiciones de voltaje y amperaje requeridas.

Se realiza el corrimiento de la Electroforesis hasta que el colorante azul de bromofenol salga o hasta que algún peso molecular específico salga del gel.

Solución Stock	Gel superior (1)	Gel superior (2)	Gel separador (1)	Gel separador con glicina (2)
Concentración del gel			6%	6.5 %
Acilamida-bisacrilamida	270 µl	600 µl	6 ml	2.4 ml
Amortiguador pH= 8.8 ^a			3.75 ml	250 µl
Amortiguador pH= 6.8 ^b	555 µl	175 µl		
SDS 10%	22 µl	200 µl	300 µl	440 µl
Persulfato de amonio 1.5 %	111 µl	333 µl	1.5 ml	366.5 µl
Agua destilada	1.25 ml	2.9 ml	18.45 ml	6.7 ml
TEMED	5.8 µl	10 µl	15 µl	11 µl
Glicina				625 µl
EDTA 1%		750 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.

Tabla 2 . Soluciones requeridas para la preparación de los geles SDS-PAGE.

Tinción con Azul de Coomassie.⁷⁶

Después de la Electroforesis , el gel PAGE-SDS es colocado en la solución de Tinción por un espacio de tiempo de dos horas o toda la noche.

Después del teñido del gel , se elimina el exceso de colorante mediante lavados con una solución de ácido acético al 10%. En el caso que se desee un desteñido más rápido se puede aplicar calor con una mezcla de metanol - ácido acético en una relación (5:1).

La solución de teñido esta constituida por:

Azul de Coomassie (R-250)	300 mg
Metanol al 30%	150 ml
Ac. Acético al 10%	50 ml
Agua bidestilada c.b.p.	500 ml

Tinción con plata.²⁵

1. Fijar el gel en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 30min.
2. Incubar el gel en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 1% durante 15 min.
3. Enjuagar en metanol al 50% (opcional).
4. Lavar con agua desionizada 3 veces, 5min.
5. Incubar durante 90s en una solución de tiosulfato de sodio 0.002% recién preparada.
6. Lavar con agua desionizada 3 veces, 30s.
7. Incubar en una solución de nitrato de plata 0.2% durante un mínimo de 25 min.
8. Lavar con agua desionizada 3 veces, 60s.
9. Revelar con una solución de carbonato de sodio 6%, formaldehido 0.0185% y tiosulfato de sodio 40g/ml.
10. Incubar hasta la aparición de bandas en el gel.
11. Detener la reacción con ácido acético al 6% .
12. Lavar con agua desionizada varias veces.
13. Conservar el gel en agua desionizada.

Tinción inversa con zinc-imidazol.³⁹

1. Inmediatamente después de la electroforesis, incubar el gel en una solución de imidazol 0.2M y dodecil sulfato de sodio al 0.1% durante 15 min. con agitación moderada.
2. Retirar la solución y enjuagar unos segundos con agua destilada.
3. Incubar el gel en sulfato de zinc 0.2M durante 30-45s.
4. Observar el gel contra un fondo obscuro para monitorear la aparición de bandas.
5. Descartar la solución y lavar abundantemente con agua para detener la reacción.
6. Conservar el gel en agua.
7. En caso de una tinción deficiente, desteñir el gel en una solución de EDTA 1M, lavar abundantemente con agua y repetir el protocolo de tinción.

Inmunolectrotransferencia. ¹¹¹

Este método combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia o ausencia de detergentes como dodecil sulfato de sodio (SDS), con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida.

Las proteínas separadas por electroforesis son electrotransferidas a membrana de Polivinil difluoruro (PVDF), en donde se unen a los grupos reactivos del papel, quedando así inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón obtenido en 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 con el reconocimiento con el anticuerpo (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 PVDF se hace reaccionar con los anticuerpos problema, los cuales se unen a los antígenos correspondientes que están inmovilizados en el papel. ¹⁴

Preparación de la cámara de electrotransferencia

1. En un recipiente con suficiente solución amortiguadora de transferencia se humedecen las fibras scotch y los papeles filtros (todos con las dimensiones suficientes para cubrir totalmente el gel).
2. Se corta la membrana de PVDF de acuerdo al tamaño del gel (utilizando guantes y manejando la membrana con pinzas).
3. Se coloca la membrana en otro recipiente en donde se incubaba con metanol absoluto por espacio de 15 seg., después de lo cual se lava con agua bidestilada por tres veces, es importante identificar la formación de un lado hidrofílico y otro hidrofóbico en la membrana.
4. En un "cassette" (Hoffer) de electrotransferencia se coloca primero una fibra y sobre la fibra se coloca un papel filtro teniendo cuidado de que no queden burbujas atrapadas, después se coloca el gel y sobre éste la membrana PVDF (con el lado hidrofílico hacia el gel), eliminando las burbujas.
5. Con un lápiz se marca el frente de comimiento del gel y señalando el carril número uno de acuerdo a la colocación de las muestras, se colocan nuevamente otro papel filtro sobre el papel PVDF y otra fibra. Se cierra el cassette y se inserta en el contenedor de la cámara de electrotransferencia (Hoffer), previamente lleno con amortiguador de transferencia.
6. Se somete a las condiciones de amperaje constante necesarias según el tipo de proteína manteniendo el sistema a una temperatura de 2°C usando para ello un intercambiador de calor.
7. Al término de la transferencia se toma la membrana de PVDF (con guantes) y se coloca en un recipiente con rojo de Ponceau, para detectar las proteínas transferidas, cuando se observan las bandas se retira el exceso del colorante con agua bidestilada.
8. La membrana PVDF se lava con agua bidestilada y se coloca en un recipiente que contenga leche Sveltes 5% en PBS-tween 20 y se deja incubando 2 h. a temperatura ambiente en agitación continua.
9. Pasado el período de incubación con el bloqueador se realizaron 2 lavados con PBS-Tween 5 min cada uno; los lavados así como todas las incubaciones se realizaron en agitación continua. Luego fueron adicionados los anticuerpos policlonales o monoclonales (dil:1:1000 o sobrenadante concentrado) (2 h a temperatura ambiente).
10. Después de la adición de estos anticuerpos, se adicionó un anticuerpo secundario el cual podría ser en el caso de policlonales de cabra (anticonejo o antihámster ambos conjugado a peroxidasa (SIGMA, dil:1:2000, 2h). Para el caso del AcM se empleo como anticuerpo

- secundario un anticuerpo de cabra anti ratón conjugado a peroxidasa de (SIGMA. dil:1:1000, 2h); para el revelado de la peroxidasa se empleó DAB 500µg/ml en PBS y 6µl de H₂O₂);
11. Finalmente, se revela la reacción de la solución sustrato, siendo evidentes las bandas separadas electroforéticamente. La reacción se detiene con Agua bidestilada. Para lograr visualizar miosina proveniente de cultivo parasitario el sustrato empleado fue Diaminobencidina (DAB) 0.6% , sulfato de amonio Níquel 0.93% , peróxido de hidrógeno 0.001% disueltos en PBS , esta fórmula genera bandas de color gris a negro con la finalidad de lograr una mayor sensibilidad en la detección de bandas.

ELISA .³⁴

El ensayo inmunoenzimático conocido como ELISA es uno de los métodos inmunoenzimáticos en fase sólida más empleados debido a su alta sensibilidad, especificidad (dependiendo especificidad de los anticuerpos empleados) y que presenta la posibilidad de examinar un gran número de muestras de una manera relativamente sencilla

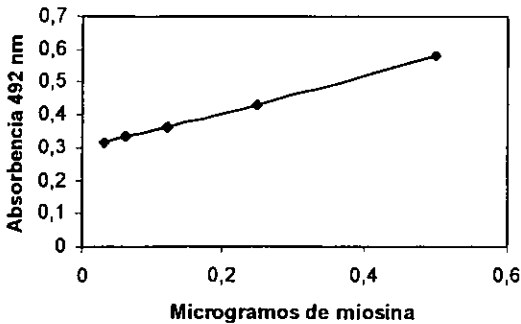
Procedimiento para la técnica de ELISA .

1. El antígeno se coloca en el pozo de la placa (Maxisorb NUNC).
2. Se le adiciona amortiguador de carbonatos (pH 9.6) ,el volumen necesario para completar 100 µl .
3. Se deja incubar por espacio de 2 h a 37°C .
4. Se lava la placa con PBS - tween 20 al 0.3% por 5 min. tres veces .
5. Se bloquea la placa con 150 µl de PBS - tween 20 al 0.3% con 5% de leche por espacio de 2 h a 37°C .
6. Lavar la placa como se indica en el paso 4 .
7. Añadir 100 µl / pozo de anticuerpo primario e incubar 2 h a 37°C .
8. Lavar la placa como se indica en el paso 4 .
9. Añadir 100 µl / pozo de anticuerpo secundario e incubar 2 h a 37°C .
10. Lavar la placa como se indica en el paso 4 .
11. Añadir 100 µl / pozo de sustrato y esperar el desarrollo de color en un lugar obscuro .
12. La reacción se detiene añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 2N .
13. Se determina la absorbancia empleando un lector de placas de ELISA con una longitud de onda de 492 nm .
14. Se grafican los resultados restando los valores del blanco .

Curva de calibración para la determinación de la cantidad de miosina nativa por técnica de ELISA .

Las alícuotas del estándar de miosina de cisticercos de *T. solium* ($1.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) de la curva de calibración con la concentración establecida (de $0.013 \mu\text{g}$ a $1 \mu\text{g}$ de proteína total), fueron colocados en los pozos de la placa de ELISA y posteriormente se sometió al tratamiento de detección por la técnica de ELISA . Con los valores de Absorbancia que se obtuvieron con la proteína estándar, se realizó una regresión lineal y con ella se interpolaron, los valores de absorbancia presentados por las muestras para poder obtener su concentración final.

Curva de calibración de Miosina



Gráfica 2 . Muestra el comportamiento lineal de la curva de calibración para determinar la cantidad de miosina en sobrenadantes de cultivo ($r = 0.99$)

Inmunopunto . 77

Debido a la alta sensibilidad, especificidad y fácil manejo de la técnica de ELISA, se han implementado diversas variantes. Una de las más populares es la del inmunopunto, también conocido como Dot-blot o como dot-ELISA en el que se emplea una membrana como soporte para el acoplamiento del antígeno o el anticuerpo. La ventaja de su uso es que no se requiere de equipo de detección alguno, ya que la reactividad es evaluada visualmente.

Procedimiento.

1. La membrana de PVDF (previamente activada 15 seg. en metanol) se monta en el aparato de inmunopunto (bio-dot) .
2. Se colocan 10 μ l de antígeno y se deja secar bajo vacío a temperatura ambiente por espacio de 20 min. .
3. Se lava la membrana con PBS - tween 20 al 0.3% por 5 min. tres veces .
4. Se bloquea la placa con 150 μ l de PBS - tween 20 al 0.3% con 5% de leche por espacio de 2 h a temperatura ambiente .
5. Lavar la membrana como se indica en el paso 3.
6. Añadir el anticuerpo primario e incubar 2 h a temperatura ambiente
7. Lavar la membrana como se indica en el paso 3.
8. Añadir el anticuerpo secundario e incubar 2 h a temperatura ambiente.
9. Lavar la membrana como se indica en el paso 3.
10. Añadir el sustrato y esperar el desarrollo de color en un lugar protegido de la luz.
11. La reacción se detiene lavando con agua bidestilada.

Purificación de miosina circulante en fluidos biológicos de hospedero infestado utilizando captura con anticuerpo 4B3 .

Debido a la necesidad de implementar una técnica para visualizar la miosina liberada por los parásitos se buscaron múltiples técnicas, pero no reunían las características necesarias de pureza y tenían el inconveniente de que para poder ser usadas se requería una cantidad considerable de proteína de interés para poder visualizar la cadena pesada de miosina en un gel. Mediante una modificación de la técnica de ELISA de captura, utilizando anticuerpos monoclonales.

Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con anticuerpos monoclonales murinos 4B3 que reconocen únicamente miosinas de ténidos y luego el suero de cerdos inyectados con cisticercos a los cuales se les habían detectado miosina circulante se coloca en los pozos. Finalmente con ácido tricloroacético se rompen los complejos inmunes, se recupera la solución de los pozos y esta contiene el antígeno que fue reconocido por el anticuerpo (en este caso miosina de cisticercos). Finalmente la solución de purificado de antígeno circulante se neutraliza y está lista para ser sometida al proceso de electroforesis. Esta técnica tiene la limitante de la cantidad de proteína que puede ser purificada.

Procedimiento de purificación con 4B3.

1. Del anticuerpo monoclonal se colocan 50 μ l en el pozo de la placa (Maxisorb NUNC).
2. Se le adicionan 50 μ l de amortiguador de carbonatos (pH 9.6) . Se deja incubar por espacio de 2 h a 37°C .
3. Se lava la placa con PBS - tween 20 al 0.3% por 5 min. tres veces .Si el título de anticuerpo es bajo se repite desde el paso número 1.
4. Se bloque la placa con 150 μ l de PBS - tween 20 al 0.3% con 5% de leche por espacio de 2 h a 37°C .(se puede omitir este paso)
5. Lavar la placa como se indica en el paso 4.
6. Añadir 100 μ l / pozo de fluido biológico problema e incubar 2 h a 37°C .
7. Lavar la placa como se indica en el paso 4.
8. Añadir de 10 a 20 ml de ácido tricloroacético (TCA) 2% y dejar reposar a 4°C por espacio de 20 min.
9. Recolectar el TCA y adicionarle en proporción 1:1 Amortiguador de fosfatos 0.1M con KCl 0.6M
10. Esta muestra o purificado de miosina puede ser sometida a electroforesis.

REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRAFICAS.

1. AGUILAR L. Estudios morfológico y morfométrico de parásitos adultos recuperados en el modelo experimental de hámster dorado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 1995.
2. AVILA RG. Detección de antígenos de *Taenia solium* en heces por un método inmunoenzimático. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1992.
3. ALLAN J C, AVILA G, GARCIA-NOVAL J, FLISSER A y CRAIG P S. Immunodiagnosis of Teniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. 1990, 101: 473-477.
4. ALUJA A, ESCOBAR A, ESCOBEDO F, FLISSER A, LACLETTE J P, LARRALDE C, MADRAZO Y, VELAZQUEZ V y WILLMS K. Cisticercosis: Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Biblioteca de la Salud. Inst. Nac. de Salud Pública. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 1987.
5. AMBROSIO J, ABRAHAN LANDA, MT MERCHANT, LACLETTE J P. Protein uptake by Cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research*. 1994, 25 (3): 325-330.
6. AMBROSIO J, CRUZ-RIVERA M, ALLAN J C, MORAN E, ERSFELD K y FLISSER A. Identification and partial characterisation of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*. 1997, 144: 545-553.
7. BARYLKO B, TOOTH P y KENDRICK-JONES J. Proteolytic fragmentation of brain myosin and localisation of the heavy-chain phosphorylation site. *European Journal of Biochemistry*. 1986, 158: 271-282.
8. BEAVER C P, JUNJY CR y LUPP WE. Pasitología clínica, 2a. ed. Edit. Salvat. México. 1992. 435-438.
9. BIO-RAD. Protein Assay. Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories USA. 1981.
10. BLUM H, BETER H, GROSS HJ Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels *Electrophoresis*. 1987, 8(2): 93-99.
11. BRADFORD M M. A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgran quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.
12. BRAY D. Cell movements. Surface Contractions and Myosin. Garland Publishing, Inc. New York, USA. 1992, 8: 107-122.
13. BROWN H W. Basic clinical Parasitology. Appleton - Century -Crofts. New York. 4a.ed. 1975, 172-177.
14. BURNETTE W N. Western blotting: Electroforetic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodina-led protein A. *Analytical Biochemistry*. 1981, 112: 185-203.
15. CAMPOS A, BERNARD P, FAUCONNIER A, LANDA A, GOMEZ E, HERNANDEZ R, WILLMS K, LACLETTE JP. Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. (1990) 40: 87-94.
16. CARBONI J M, CONZELMAN K A, ADAMS R A, KAISER D A, POLLARD T D y MOOSEKER M S. Structural and immunological characterization of the myosin-like 110-kD Subunit of the intestinal microvillar 110 K-Calmodulin complex: Evidence for discrete myosin head and calmodulin binding domains. *The Journal of Cell Biology*. 1988, 107: 1749-1757.
17. CAÑEDO L, LACLETTE J P y MORALES E. Evagination of metacestode of *Taenia solium*. 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. 1982, 363-374.
18. CHAICUMPA W, YUWAPORN R, BURI D, CHONGSUA M y ECHEVERRIA P. Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella typhi* antigen in urine. *The Journal of Clinical Microbiology*. 1992, 30: 2513-2515.
19. CHENEY R E, RILEY M A y MOOSEKER M S. Phylogenetic Analysis of the Myosin Superfamily. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1993, 24: 215-223.
20. CHO SEUNG-YULL, KIM SUK-IL, KANG SHIN-YONG, CHOI DUCK YOUNG, SUK SIK JONG, CHOI SOO KIL, HA SOO YOUNG, CHUNG SANG CHIN y MYUNG HOJIN. Evaluation of Enzyme-Linked Immunorbent Assay in Serological Diagnosis of human Neurocisticercosis using paired samples of serum and cerebrospinal fluid. *The Korean Journal of Parasitology*. 1986, 24 (1): 25-41.
21. COHEN C. Matching molecules in the catch mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982, 79: 3176-3178.
22. CORREA M D, PLANCARTE A, SANDOVAL M A, RODRÍGUEZ E, DEL ROSAL A, MEZA- LUCAS & FLISSER A. Immuno diagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite product. *Acta Leidensia* 1989, 57: (2): 93-92.
23. CRARY P S, MACPHENSON Y MENSON G S. The identificación of eggs Echinococcus by immunofluorescence using and oncospherical monoclonal antibody. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*. 1986, 35: 152-158.
24. CROW T, MICHAEL y STOCKDALE E FRANK. The developmental program of fast myosin heavy chain expression in avian skeletal muscles. *Developmental Biology*. 1986, 118: 333-342.
25. CRUZ-RIVERA M. Caracterización de Anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos del estadio adulto de *T. Solium*. Tesis Licenciatura. FESC. UNAM. México. 1995.
26. D'ALBIS ANNE, PANTALONI COLETTE y BECHET JEAN-JAQUES. An electrophoretic study of native myosin isozyme and of their subunit content. *European Journal of Biochemistry*. 1979, 99: 261-272.

27. DANIEL J y SELLERS J. Purification and characterization of platelet myosin. *Methods in Enzymology*. 1992 , 215 : 78-88.
28. DARNELL J , LODISH H y BALTIMORE D . *Molecular Cell Biology*. 2da ed. Scientific American Books. New York. 1990 .
29. DEUTSCH V R , BIADSI S, ELDOR A , MUHLRAD A y KAHANE Y . 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*. 1990 ,1038 : 286-290.
30. DIAZ JOSE F , VERASTEGUI MANULA , ROBERT H , GILMAN W C ,TSANG VICTOR , PILCHER JOY B GALLO CARLA , GARCÍA H HECTOR , TORRES PATRICIA , MONTENEGRO TERESA y MIRANDA ELBA . . Immunodiagnosis of Human cysticercosis (*Taenia solium*): A field comparison of an antibody- enzymed-Linked immunosorbent Assay (ELISA) an antigen -ELISA , and an Enzymed- Linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) Assay in Perú. *American Journal of Tropical Medical and Hygiene*. 1992,46(5): 610-615 .
31. DOWBEN R M . General Physiology . A molecular approach. Ed. Harper International . New York. Chapter 9: Contractility .1969 :499-504 .
32. DRUECKES P , SCHINZEL R y PALM D . Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphates. *Analytical Biochemistry*. 1995 , 230: 173-177.
33. DUMBAR BONNIE S . Two Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques .Plenum Press,New York . 1987 : 17-20 .
34. ENGVALL E y PERLMAN P. Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA).Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* . 1971 , 8 :871-879 .
35. ERIC R ,BLOUGH , ERIK R RENNIE ,FANJIE ZHANG , y REISER J PETER . Enhanced Electrophoretic Separation and Resolution of Myosin Heavy Chain in Mammalian and Avian Skeletal Muscles .*Analytical Biochemistry* . 1996 ,233 : 31-35 .
36. ESPREAFICO E , CHENEY R, MATTEOLI M, NASCIMENTO A, DE CAMILI P, LARSON R y MOOSEKER M. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p169), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *The Journal of Cell Biology*. 1992 ,119 (6) : 1541-1557.
37. FAN P C , MA X Y , KOUH H C y CHUNG W C . Survival of *Taenia solium* Cysticerci in Carcasses of Pigs Kept at 4°C. *Journal of Parasitology* . 1998 ,84(1):174-177 .
38. FAUST E, RUSELL PF, JUNG RC CRAIG AND FAUST'S clinical parasitology. 8a. ed. London Lea and Febiger Philadelphia. 1974 , 529-539.
39. FERNANDEZ-PATRON C, HARDY E , SOSA A , SEOANE J , CASTELLANOS L. Double staining of Coomassie Blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of Coomassie Blue- undetected proteins. *Analytical Biochemistry*. 1995,224:263-269.
40. FLISSER A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In *Progress in Clinical Parasitology*. (ed. Sun, T.) CRC Press, Inc. USA .1994 : 77-116 .
41. FLISSER A. *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. In Enteric infection 2. Intestinal Helminths. Ed. M.J..G. Farthing, G.T. Keusch and D. Wakelin. Chapman & Hall Medical. London.. Capitulo 13. 1995 : 173-184.
42. FLISSER A, TARRAB R, WILLMS K y LARRALDE C. Inmunoelctroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Arch. Invest. Mcd. (Méx)* 1975 ,6 :1-12.
43. GARCÍA-DOMÍNGUEZ C ,CORREA D ,RABIELA M T y FLISSER A.Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis .*Parasitology Research* . 1991,77: 691-696 .
44. GEMMELL M, MATYAS Z, PAWLOWSKY Z, SOULSBY E, LARRALDE C, NELSON GS & ROSICKI Z . Guidelines for surveillance, prevention and control of teniosis/cysticercosis. VPH/83.49. World healthy Organization Geneva. 1983 :1-207.
45. GIESE A C. Cell physiology 4a. e. W.B. Sanders company Phipadelphia. 1973 .
46. GODING W J. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, Inc. Orlando Florida. 1983 .
47. GUERRA G, FLISSER A, CAÑEDO L y LACLETTE J P. Biochemical and immunological characterisation of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. (ed. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE J P, LARRALDE C, RIDAURA C & BELTRAN F) . Academic Press. New York. 1982 : 437-451.
48. GUZMAN J , SCHOEDON G y BLAU N. In vitro immunization with antigen directly blotted from SDS-polyacrylamide gels to polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Immunological Methods*. 1993,158 : 37-47.
49. HAMES B D y RICKWOOD D. Gel Electrophoresis of proteins. IRL Press. England Oxford. 1981 .
50. HARLOW E y LANE D. *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. (CSH). USA . 1988 .
51. HEIDCAMP W H . *Cell Biology Laboratory Manual. Tubules and Filaments*. Gustavus Adolphus College, Saint Peter, Minnesota, USA. <http://www.gac.edu/cgi-bin/user/~cellab/php?index-1.html> .1996 .
52. HERMANSON J , LAFRAMBOISE W y DAOOD M. Uniform myosin isoforms in the flight muscles of little brown bats, *Myotis lucifugus*. *The Journal of Experimental Zoology*. 1991, 259: 174-180.

53. HIGHTOWER K E y McCarty R E. Structural stability of chloroplast coupling factor 1 as determined by differential scanning calorimetry and cold inactivation. *Biochemistry*. 1996, 35: 4852-4857.
54. JONGE DE N, FILLIE Y E y DEELER A M. A simple and rapid treatment (trichloroacetic acid precipitation) of serum samples to prevent non-specific reactions in the immunoassay of a proteoglycan. *Journal of Immunological Methods*. 1987, 99 : 195-197 .
55. KATOH H, SUZUKI T, YOKOMORI K, SUZUKI S, OHTAJI E, WATANABE M, YAZAKI Y y NAGAI R . A novel immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain in serum. *Journal of Immunological Methods*. 1995, 185 : 57-63.
56. KATOH H, SUZUKI T, HIROI Y, OHTAKI E, SUZUKI S, YAZAKI Y y NAGAI R. Diagnosis of aortic dissection by immunoassay for circulating smooth muscle myosin. *The Lancet* .1995 ,345 : 191-192.
57. KIMURA A, TSUJI T, MATOBA R, FUJITANI N, OHMORI K, y MATSUMURA S. Tissue-specific and non-tissue-specific heavy-chain isoforms of myosin in the brain as revealed by monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991 , 1118 : 59-69 .
58. KIMURA A, IKEDA H, YASUDA S, YAMAGUCHI K y TSUJI T. Brain tissue identification based on myosin heavy chain isoforms. *International Journal of Legal Medicine (Germany)*. 1995 ,107 (4): 193-196.
59. KO R C y NG T F . Evaluation of excretory / secretory products of larval *Taenia solium* as diagnostic antigens for porcine and human cysticercosis. *Journal of Helminthology* . 1998 ,72 : 147-154 .
60. KODAMA T, FUKUI K, y KOMETANI K . The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate. *Journal of Biochemistry* . 1986, 99 : 1465-1472.
61. LACLETTE J P, ALAGON A, WILLMS K y TORRE-BLANCO A . Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *T. solium* . *Journal of parasitology* .1990 ,73 : 121-129.
62. LACLETTE J P, LANDA A, ARCOS L y WILLMS K. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda) *Molecular and Biochemical Parasitology* .1991, 44 : 287-296.
63. LACLETTE J P, SHOEMAKER CH B, RICHTER D, ARCOS L, PANTE N, COHEN C, BING D y NICHOLSON-WELLER A. Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Parasitology*. 1992, 148: 124-128.
64. LACLETTE J P, RODRIGUEZ M, LANDA A, ARCOS L, DE ALBA P y MANCILLA R. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig role of the antigen B . *Acta Leidensia* . 1989 ,57(2) : 115-122.
65. LACLETTE J P, SKELLY P, MERCHANT M y WILLMS K .Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium* . *Journal of Parasitology* . 1987: 121-127 .
66. LACLETTE J P, SKELLY P, MERCHANT M y SHOEMAKER CH. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in plathelminth parasites. *Experimental Parasitology*. 1995 ,81:40-143.
67. LEHNINGER A. *Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function* . 2ª ed. New York . 1981.
68. LESZEK CHOROMANSKI, ESTRADA J JOHN y KUHN E RAYMOND. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA . *Journal of Parasitology* . 1990 , 76(1) : 69-73 .
69. LEWIS S A y STRAND M . Characterization of proteins and immunogens released by adult *Schistosoma mansoni* . 1991 ,77(2) :263-271 .
70. LIND A y KERNELL D. Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: A "two dimensional" quantitative approach. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991 . 39 (5) 589-597.
71. LOWEY SUSAN, WALLER S GUILLERMINA y BANDMAN EVERETT. Neonatal and adult myosin chains form homodimers during avian skeletal muscles development . *The journal of cell Biology*. 1991,113(2) :303-310 .
72. LUMSDEN RD, VOGEL M Y SOGANDARES - BERNAL. The metacestode tegument: fine structure development, topochemistry and interaction with the host. In: FLISSER A; WILLMS K; LACLETTE JP; RIDAURA C; BELTRÁN F (Eds) *cisticercosis; present states knowledge and perspectives*. Academic Press. NY. USA. . 1982:307-361.
73. MAIZELS R M, BLAXTER M L, ROBERTSON B D y SELKIRK M E. Parasite antigens, parasite genes. *A laboratory manual for molecular parasitology*. Ed. Cambridge University Press. UK. 1991.
74. MARAVILLA PABLO, AVILA GUILLERMINA, CABRERA VINICIO, AGUILAR LAURA y FLISSER ANA. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *Journal of Parasitology* .1998 ,84 (5) :882-886 .
75. MARTÍNEZ GUARNEROS J A . Detección de miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en fluidos biológicos recuperados de infecciones experimentales. Tesis de Licenciatura FESC México. 1998 .
76. MEYER T S y LAMBERTS B L. Use of Coomassie Brilliant blue R-250 for electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips *Biophysical Acta* . 1965,107: 144-145 .
77. MILLIPORE Co.. Direct protein microsequencing from the Immobilon-P transfer membrane. *Immobilon Tech Protocol. TP017*. 1996 .

78. MOORE L,ARRIZUBIETA M TIDYMAN W , HERMAN L Y BANDMAN . Analysis of the chicken fast myosin heavy chain family .Localization as Isoforms-specific antibody epitopes and regions of divergence . *Journal a molecular Biology*. 1992,225 : 1143-1151.
79. MURAKAMI N, MEHTA P y ELZINGA M. Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform specific synthetic peptides. *FEBS* . 1991 , 278 (1): 23-25.
80. MURAKAMI N y ELZINGA M. Immunohistochemical studies on the distribution of cellular myosin II isoforms in brain and aorta. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1992, 22: 281-295.
81. NASCIMENTO A A C , CHENEY R E , TAUHATA S B F , LARSON R E y MOOSEKER, M S. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996 ,271 (29): 17561-17569.
82. NEWPORT G R , HARRISON R A , MCKERROW J , TARR P, KALLESTAD J y AGABIAN N. Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. *Molecular and Biochemical Parasitology* .1987,26: 29-38.
83. NIETO D . Opening address historical notes an cisticercosis , present states of knowlege and perspectives, Academic Press, New York. 1982 : 4-7
84. PEARSE V, PEARSE J, BOCHSHAUM M y BUSCHSHAM R . LIVING INVERTEBRATES . California , Blackwen Scientific. Publ, The Boxwood. 1987 :243-246
85. PELEG Y , KAHANE Y, ELDOR A , GROSCHEL-STEWART U , LEVY-TOLEDANO S y MUHLRAD A. Structural and immunological proprieties of myosin from human platelet external and internal membranes. *Trombosis Research* . 1989, 56: 1-12.
86. PEREZ-CARCELES M D , OSUNA E, VIEIRA D N y LUNA A. Usefulness of myosin in the postmortem diagnosis of myocardial damage. *International Journal of Legal Medicine (Germany)*. 1995, 108 (1): 14-18.
87. PERRY S V. Myosin Adenosinetriphosphatase. *Methods in Enzymology*. 1955 , 2: 582-598.
88. PINDER J , SLEEP J, BENNETT P y GRATZER W. Concentrated tris solutions for the preparation, -depolymerization, an assay of actin: Application to erythroid actin. *Analytical Biochemistry* .1995,225: 2291-295.
89. POLLARD T, DOBERSTEIN S y ZOT H. MYOSIN-I. *Annual Review of Physiology*. 1991,53: 653-681.
90. PRESTON T M , KING C A y HYAMS J S. The molecular components of the cytoskeleton. Chapter II *In The cytoskeleton and cell motility*. Edit. Chapman and Hall. New York, USA . 1990 : 6-37.
91. RAGHAVAN N , MAINA C V, FITZGERALD P C , TUAN R S , SLATKO B E , OTTESEN E A y NUTMAN T B. Characterization of a muscle-associated antigen from *Wuchereria bancrofti*. *Experimental Parasitology* .1992,75: 379-389.
92. RAMMOUD MACHOVICH , KATALIN AJTAI , KRASIMIR KOLEV y WHYTE G . Myosin as cofactor and substrate in fibrinolysis . *FEBS Letters* . 1997 ,407: 93-96 .
93. RAYMENT L, SMITH C y YOUNGT R. The active site of myosin. *American Rev*. 1996 .
94. RIDAURA C . Cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México. FLISSER A & MALAGON F. Eds. Limusa-Noriega. México .1989 : 125-127 .
95. RODRÍGUEZ DEL ROSAL E, CORREA D and FLISSER A. Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Vet. Record* 1989 ,124:488.
96. RUPPEL K M y SPUDICH J A. Myosin motor function: structural and mutagenic approaches. *Current Opinions in Cellular Biology. Cytoskeleton*. 1995 : 89-93.
97. SARTI E. La teniosis y la cisticercosis por *T. sciurum*. *Salud pública de México*. 1997,39(3) : 22b-231.
98. SCHANTZ P M , MORRE A , MUÑOZ J L , HARTMAN B , SCHAEFER J , ARON A , PERSAUD D , SARTI E , WILSON M y FLISSER A. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *New England Journal of Medicine*. 1992, 327: 692-695.
99. SELLERS J R , GOODSON H V y WANG F. A myosin family reunion. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1996,17: 7-22.
100. SHAPIRO A., VIÑUELA E y MAIZEL J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS- polyacrilamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* .1967,28: 815-820.
101. SCHOLEY J M , SMITH R C , DRENCKHAHN D , GROSCHEL-STEWART U y KEN-DRICK-JONES J . Thymus myosin. Isolation and characterization of myosin from calf thymus and thymic lymphocytes, and studies on the effect of phosphorylation of its Mr=20,000 light chain. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982 ,257: 7737-7745.
102. SLAIS J . Morphology of the scolex of cisticercus cellulosae in brain cysticercosis. Flisser A. et.al. (1982). Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press. N Y.. 235-260(1982)
103. SMYTH J D y MCMANUS D P. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press. Melbourne, Australia. 1989: 257-282.
104. SOENO Y , SHIMADA Y , OBINATA T . BDM (2,3-butanediona monoxima) an inhibitor of myosin-actin interaction supress myofibrilogenesis in skeletal muscle cells in culture. *Cell Tissue Research* . 1999 . 295(2) : 307-16 .
105. SOULSBY E J L. Parasitic zoonoses. Clinical and experimental studies. *Academic press*. N.Y.1974: 199-
106. SPUDICH J y WATT S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *The Journal of Biological Chemistry* .1971,246 (15) : 4866-4871.

-
107. STINBERG G, MEITOSH Jr. Effects of the myosin inhibitor 2,3 butanedione monoxime on the physiology of fission yeast . *European Cell Biology*. 1998 ,77(4):284-93.
 108. STEPHEN J y SPUDICH J. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proceedings of Natural Academy of Science. USA*. 1986,83: 6272-6276.
 109. STEVEN S ROSENFELD , XING JUN , CHEUNG HEBERT C , BROWN FRED , KAR SAMBIT y SWEENEY . Structural and kinetics studies of phosphorylation - dependent regulation in smooth muscle myosin . *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273(44):28682-28690 .
 110. TOYOSHIMA Y Y , KRON S J , McNALLY E M , NIEBLING K R , TOYOSHIMA CH y SPUDICH J A. Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature*. 1987, 328: 536-539.
 111. TOWBIN H , STAHELIN T y GORDON J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* .1979,76: 4350-4354.
 112. WADA MASANOBU OKUMOTO TADASHI . KYOKO TORO . MASUDA KAZUMI , FUKUBAYASHI , KIKUCHI KUNIO , NIIHATA SHIGEMITSU y KATSUTA . .Expression of hybrid isomyosins in human skeletal muscle . *American Journal of Physiology* . 1996,271: C1250-C1255
 113. VELDHOVEN P P V y MANNAERTS G P. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Analytical Biochemistry*. 1987,161: 45-48.
 114. WHITE A C , MOLINARY J L , PHAI A V REJE A A . Detection and preliminar characterization of taenia solium metacystode proteasas . *Journal of Parasitology*. 1992 78(2): 281-287.
 115. WHITTAKER M , WILSON-KUBALEK E M , SMITH J E , FAUST L , MILLIGAN R A y SWEENEY H L. A 35-A movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature*. 1995 , 378:748-751.
 116. WRIGHT A F y JACKSON Y. Myosin diversity and disease. *Trends in Genetics* 1996,12 (6): 206-209.
 117. YOSHINO K . Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part III on the development of cysticercus cellulosa within the definite intermediate host. *Journal of Medicine Assn Formosa*. 1993, 32:166-169.
 118. XIAO SHU-HUA , FRIEDMAN PAUL , CATTO BRIAN y WEBSTER jr T. Praziquantel-Induced vesicle formation in the tegument of male *Schistosoma mansoni* is calcium dependent . *Journal of Parasitology*. 1984 70(1) : 177-179 .