

11/28/1
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
QUE PRESENTA EL M en IBB JAVIER R. AMBROSIO HERNANDEZ

IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
PARCIAL DE MIOSINA TIPO II
EN *Taenia solium*.

Ciudad Universitaria, México, DF. Noviembre del 2000

1



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.

A la Dra. Ana Flisser.

Gracias Ana, tu has sido la mas grande impulsora académica que he tenido en mi vida. Para mi eres un ejemplo a seguir por un ser humano, que a pesar de las circunstancias, no cede, es dinámico, se impulsa, se proyecta y se impone. Eres una mujer admirable. Gracias por haber confiado en mi, por permitirme ser libre en mis aspiraciones y por continuamente orientarme y darme tu experiencia. Estoy y estaré en deuda con tu persona que espero no liquidarla contigo, sino con todos aquellos que han estado y estarán dependiendo de mi formación académica. Gracias por ser mi amiga, mi tutora, mi jefa, gracias.

A los Dres J. Allan y P. Craig de la Universidad de Salford, Inglaterra.

Gracias a su empeño académico y calidad científica brindaron la posibilidad de interaccionar con nuestro grupo académico y través de quienes, se logró la obtención y producción de los anticuerpos monoclonales usados en los estudios.

A Mayra.

Gracias May. Junto contigo inicié este camino y gracias a tu apoyo lo he fructificado. Tengo la deuda contigo de que aspire y logres algo semejante y que yo sea quien te ayude a conseguirlo. Lo lograremos.

A Oli.

Gracias Oli. Tu calidad y tu capacidad han sido inigualables para apoyarme en la obtención de este grado. No dejaré de reconocerlo.

A mis alumnos:

Mayra Cruz, Laura González, Armando Martínez, Elizabeth Morán, Hugo Hernández, David Correa y Víctor Reyes. Ustedes han confiado en mi y juntos hemos avanzado en nuestros deseos académicos, les agradezco que hayan contribuido con su esfuerzo y que esto lo consideremos como un éxito de todos.

A los compañeros del laboratorio:

Dra Maria Teresa Rabiela, Biol. Laura Aguilar, QFB Pablo Maravilla, M en C Guillermina Avila, QFB Joel Martínez, Biol. Adriana Garza, Lic. Fela Menlovic, a quienes gracias a sus deseos de superación y conocimientos han permitido el desarrollo de un gran ambiente académico en el laboratorio.

A los integrantes de mi comité tutorial.

Dra Kaethe Willms, Dra. Guadalupe Ortega, Dra Ana Flisser. Gracias a su apoyo, continua crítica y estímulo se lograron los avances necesarios para la realización del trabajo experimental.

A mis sinodales para la obtención del grado.

Quienes gracias a su contribución crítica por su experiencia, el deseo de apoyo académico y sobre todo su tiempo, han permitido enriquecer el contenido y la presentación de este trabajo escrito. Gracias por brindarme su apoyo y amistad.

Agradecimientos:

- A la Comunidad Europea de Naciones (No. CII*-CT94-0081). De quien gracias a parte de su apoyo económico se lograron soportar las necesidades de la investigación requerida.
- A la DGAPA de la UNAM. Dependencia que a lo largo de 6 años (Proyectos IN209994 y IN200297) ha soportado económicamente el desarrollo del proyecto de investigación.
- Al PADEP de la UNAM. Dependencia que apoyó parcialmente el desarrollo experimental del proyecto.
- Al CONACYT, que con su cátedra de apoyo a doctorado ha permitido estabilizar económicamente al autor del presente trabajo para el mejor desempeño de las actividades de investigación.
- A la Facultad de Medicina de la UNAM. Dependencia en la cual, gracias a su apoyo de infraestructura y ambiente académico, se ha realizado toda la investigación científica respectiva.
- A las técnicas académicas; QFB Mayra Cruz y Biol Olivia Reynoso que con su capacidad, calidad y experiencia técnicas fueron sustento importante en el desarrollo experimental requerido en el presente trabajo de tesis doctoral.

RESUMEN

El sistema muscular de *Taenia solium*, como el de otros cestodos, es de tipo liso, de las proteínas que lo constituyen, únicamente se ha estudiado ampliamente a la paramiosina. En la presente tesis se realizó la caracterización bioquímica, inmunológica y ultraestructural parcial de una miosina tipo II. Esta proteína tiene peso molecular alto (400 kDa) y gran tamaño (140 nm), está constituida por dos cadenas pesadas homólogas y dissociables con urea 8M (200 kDa cada una) y tiene actividad de ATPasa frente a actina de cisticercos pero no con actina comercial. Las cadenas pesadas tienen una porción globular y una cola filamentosa larga. La reacción con un anticuerpo monoclonal anti-miosina mostró que las cadenas pesadas y la miosina nativa tienen epítomos semejantes. La proteína se localizó en fibras musculares de cisticercos y tenias y su distribución corresponde a sitios de alta demanda de actividad muscular como ventosas, rostelo y la superficie de los proglótidos. Además, la miosina se encontró libre en el sobrenadante de cultivo de parásitos y en materia fecal de hámsteres infectados, lo que sugiere su empleo para diagnóstico de *T. solium*. Los resultados obtenidos en este estudio corresponden a la primera descripción morfológica, bioquímica, inmunológica y funcional de una proteína del citoesqueleto de *T. solium* y abren un campo nuevo del conocimiento de este parásito, y con esto de la misma relación huésped-parásito.

ABSTRACT

Muscular system of *Taenia solium*, as in other cestodes, is of the smooth type and of the proteins that constitute muscle, only paramyosin has been extensively studied. In the present thesis, type II myosin was partially characterized by biochemical, immunochemical and ultrastructural methodologies. This protein has a high molecular weight (400 kDa) and size (140 nm), it is composed of two heavy chains that could be separated with 9M Urea (200 kDa each) and had ATPase activity in the presence of cysticercal actin but not commercial actin. Heavy chains contain a globular head and a long tail and contain similar epitopes as those of native myosin, as detected with an anti-myosin monoclonal antibody. The protein was located in muscle fibers of cysticercal and tapeworms and its distribution corresponds to sites with high muscular activity demand as suckers, rostellum and the surface of proglottids. Furthermore, myosin was found free in the supernatant of *in vitro* cultured parasites and in feces of infected hamsters suggesting its potential use for diagnosis of *T. solium*. The results obtained in the present study correspond to the first morphological, biochemical, immunochemical and functional description of a protein from *T. solium* cytoskeleton, and with this of the host-parasite relationship itself.

INDICE	Página
Indice de figuras.	i
I. INTRODUCCION	1
1. Aspectos generales.	
2. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	
3. Morfología.	3
3.1. Cisticercos.	
3.2. Tenias.	
4. Estructuración morfológica.	5
4.1. Cisticercos.	
4.1.1. Pared vesicular	
4.1.2. Escólex y cuello.	
4.2. Tenias	
5. Sistema muscular en céstodos.	10
5.1. Cisticercos.	
5.2. Tenias.	
6. Componentes del citoesqueleto.	14
6.1. Proteínas del citoesqueleto	
6.1.1. Ag B o Paramiosina.	
6.1.2. Actina.	
6.1.3. Miosina.	
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	18
III. MATERIALES Y METODOS.	
Diseño Experimental	19
1. Obtención de parásitos.	19
2. Aislamiento de miosina nativa.	20
3. Anticuerpos monoclonales anti-miosina.	20
4. Purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales.	21
5. Preparación y purificación de anticuerpos policlonales antimiosina.	22
6. Caracterización inmunoquímica de miosina.	23
6.1 Evaluación del reconocimiento de epítomos conformacionales o lineales.	
6.2 Evaluación de la especificidad del reconocimiento	

de los AcM hacia miosinas diferentes.	
7. Aislamiento y purificación de actina.	23
8. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina.	24
9. Detección de miosina liberada por cisticercos cultivados <i>in vitro</i> .	25
10. Detección de miosina en materia fecal recuperada de infecciones naturales y experimentales.	25
10.1. Captura de miosina por anticuerpos. Estandarización en muestras de materia fecal.	
10.2. Captura de miosina por anticuerpos. Análisis de muestras colectadas durante las infecciones.	
10.2.1. Animales infectados experimentalmente.	
10.2.2. Humano infectado.	
 IV. RESULTADOS	
1. Evaluación del reconocimiento inmunológico de los AcM a miosina y paramiosina.	27
2. Inferencia de la posible secuencia de aminoácidos que podrían estar involucrados en los epítopos de miosina.	28
3. Estandarización y medición de la actividad de ATPasa de miosina de <i>T. solium</i> .	29
4. Aislamiento, purificación y evaluación de actina de cisticercos.	31
5. Detección de miosina liberada de cisticercos en sobrenadantes de cultivo.	33
6. Evaluación de la inmunización y reconocimiento de los anticuerpos monoclonales y policlonales.	33
7. Captura de miosina en heces por anticuerpos policlonales.	34
 V. DISCUSION	38
 VI. REFERENCIAS	45

INDICE DE FIGURAS.

Figuras	Páginas
1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	2
2. Metacéstodos o cisticercos.	3
3. Diagrama del corte de un cisticerco.	4
4. Parásitos adultos o tenias.	6
5. Observación al microscopio electrónico de transmisión de un corte de cisticerco.	8
6. Arbol filogenético obtenido para la clasificación de miosinas tipo II.	17
7. Esquema de la comparación entre paramiosina y miosina tipo II.	18
8. Evaluación de la purificación de miosina de cisticercos y del reconocimiento inmunológico por AcM 4B3.	27
9. Evaluación por ELISA del reconocimiento de anticuerpos monoclonales antimiosina 4B3 hacia diferentes proteínas.	28
10. Evaluación por IET del reconocimiento de AcM antimiosina a fragmentos recombinantes de paramiosina de cisticercos y de paramiosina de <i>T. solium</i> .	29
11. Determinación colorimétrica del fósforo inorgánico liberado.	31
12. Determinación de la actividad enzimática de miosina comercial.	32
13. Determinación de la actividad enzimática de miosina comercial y de cisticercos.	32
14. Purificación de actina de metacéstodos de <i>Taenia solium</i> .	34
15. Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión.	35
16. Cinética de aparición de miosina en el sobrenadante de cultivo de cisticercos.	36
17. Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos antimiosina hacia diferentes miosinas.	36
18. Análisis de la miosina adicionada a heces.	37
19. Cinética de aparición de miosina durante la infección experimental.	38

20. Esquema de interacción entre actina, miosina y una molécula de AcM 4B3. 42

Tablas

1. Comparación de secuencias de aminoácidos de diferentes miosinas 30

I. INTRODUCCION

1. Aspectos generales.

T. solium es causante de dos parasitosis diferentes: la teniosis y la cisticercosis. Aunque ambas enfermedades son importantes para la salud pública de países en desarrollo como México, es la cisticercosis la que genera más daño en las personas que la padecen. La teniosis es una enfermedad benigna que únicamente se presenta cuando el parásito adulto (tenia (comúnmente conocida como solitaria) se aloja e infecta el intestino del ser humano, mientras que la cisticercosis se debe a la presencia e infección por las formas larvarias o cisticercos, los cuales pueden tener diferente localización. El cuadro clínico más grave por cisticercos se da cuando los parásitos se localizan en el sistema nervioso central en donde producen la enfermedad conocida como neurocisticercosis.

Los factores principales que favorecen estas parasitosis, según los resultados obtenidos en diferentes estudios epidemiológicos, son: el bajo nivel socioeconómico, la carencia de adecuadas condiciones higiénicas y sanitarias, el mal manejo del ganado porcino y el desconocimiento del ciclo de vida de este parásito (Flisser, 1994; Sarti et al, 1992; 1997).

2. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *T. solium* comprende tres etapas diferentes de desarrollo: El adulto de localización intestinal en los seres humanos; el metacéstodo que se encuentra principalmente en músculos, cerebro u ojos del ser humano o del cerdo; y el huevo que se encuentra dentro de los proglótidos grávidos de la tenia, en la materia fecal de portadores humanos y en el medio ambiente (Fig. 1).

Cuando un ser humano ingiere carne de cerdo infectada con cisticercos, una vez que éstos han alcanzado el intestino, se desarrollan hasta alcanzar la fase adulta (A de la Fig. 1). Para ello, el escólex del cisticerco evagina bajo las condiciones que le brindan el pH ácido y los componentes de la bilis y se adhiere al epitelio intestinal, lo que normalmente sucede dentro del primer tercio del intestino delgado (Smyth y McManus, 1989). Una de las incógnitas que aún se encuentra sin resolver, es el porqué a pesar de que existen las mismas condiciones para que todos ellos efectúen la evaginación, aparentemente una sola tenia logra su desarrollo y mantenimiento dentro del intestino. Estudios efectuados con modelos experimentales de teniosis tales como el hámster dorado, el gerbo y la chinchilla inmunosuprimidos, han demostrado que posterior a las infecciones es posible recuperar varias tenias de tamaños diferentes y con diferente grado de maduración dependiendo de la inmunosupresión y del tipo de huésped (Maravilla et al, 1998). El hecho de que una tenia se logre adaptar, establecer y reproducir en el intestino, a pesar de que éste le presente un medio biológicamente hostil es un claro indicativo que para ello los parásitos han conseguido desarrollar una variedad amplia de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Smyth y McManus, 1989).

El escólex, una vez liberado, se fija al intestino por medio de sus ventosas ubicadas en la porción cefálica del parásito que funcionan como órganos de fijación. Posiblemente, una de las maneras en que los parásitos podrían fijarse temporalmente al intestino, consistiría en que las ventosas absorbieran algunas de las microvellosidades del epitelio intestinal de manera semejante a lo visto en infecciones de corta duración con hámsteres infectados experimentalmente (Merchant et al, 1998). Luego, una vez encontrado el sitio ideal de anclaje de la tenia y a manera de fijación permanente, los gusanos

podrían establecerse en el intestino tal y como lo proponen Cañedo y cols (1982) es decir se adhieren al epitelio intestinal a través de sus ventosas

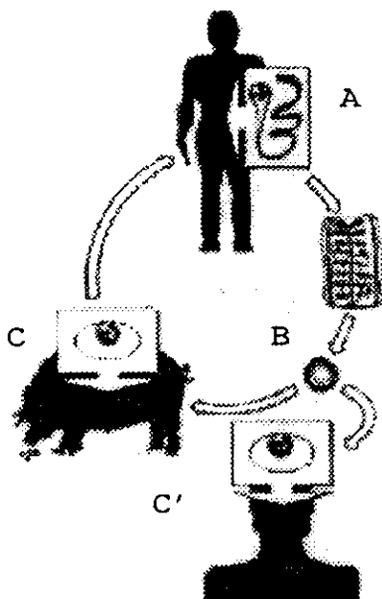


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Las letras indican el tipo de los estadios de desarrollo y sus hospederos, respectivamente: A. Parásito adulto (tenia) que se aloja en el intestino del ser humano. B. Huevos que se encuentran libremente en el medio ambiente e incluidos en los proglótidos grávidos de los que provienen. C. Cistiteros de localización muscular o cerebral en el cerdo (hospedero intermediario). C'. Cistiteros de localización cerebral en el ser humano (hospedero accidental o parásitos).

gracias a la fuerza que le podrían conferir los músculos situados bajo el cono rostellar. Luego, firmemente sujeto el parásito, de su porción cefálica correspondiente al cono rostellar emergería plegada la doble corona de ganchos la cual sería introducida directamente hacia la submucosa intestinal, sitio en donde la doble corona podría desplegarse y gracias a la forma invertida de los ganchos lograr que el parásito sufra un efectivo anclaje. Posteriormente, cuando la tenia ya está fijada de manera permanente al intestino, a partir de su cuello se irían desarrollando los proglótidos o segmentos hasta conformar toda la cadena estrobilar o estróbilo y hasta que este llegue a alcanzar de 2 a 7 m de largo y que sus proglótidos terminales se encuentren grávidos llenos de huevos.

En un estróbilo bien desarrollado se pueden distinguir diferentes tipos de proglótidos a partir del inicio del cuello de las tenias. Los proglótidos cercanos al cuello son inmaduros y no tienen desarrollados los órganos sexuales, mientras que los últimos segmentos son grávidos y materialmente están llenos de huevos. Entre ambos, se encuentran los maduros, en los cuales ya se han desarrollado los órganos sexuales. Como las tenias son hermafroditas, cada proglótido contiene órganos sexuales masculinos y femeninos. Después de aproximadamente 4 meses, desde la fijación de la tenia, los proglótidos alcanzan su desarrollo completo y los grávidos salen con las heces, se rompen y liberan los huevos al medio ambiente (Flisser, Madrazo y Delgado, 1997) (B de la Fig. 1).

Los huevos que son liberados al medio ambiente resisten condiciones relativamente desfavorables, gracias a las diferentes capas que los recubren: la más externa, denominada embrióforo, está formada por tabiques unidos por una proteína cementante (B de la Fig. 1). Esta proteína, una vez que el huevo se encuentra en el tracto digestivo del huésped, es degradada por enzimas y gracias a ello se logra la liberación del embrión (Laclette et al, 1982). Una vez que el

La oncosfera ha sido liberado, inicia movimientos de los ganchos, atraviesa el epitelio intestinal y llega, a través de la circulación sanguínea o linfática, a diversos tejidos del huésped en donde los parásitos se transforman en cisticercos (C y C' de la Fig. 1). De esta forma, una vez que los embriones se han desarrollado hasta cisticercos en los tejidos de los cerdos (Fig. 2A), el ciclo de *T. solium* se completa y vuelve a iniciar cuando un ser humano ingiere esta carne infectada (A de la Fig. 1).

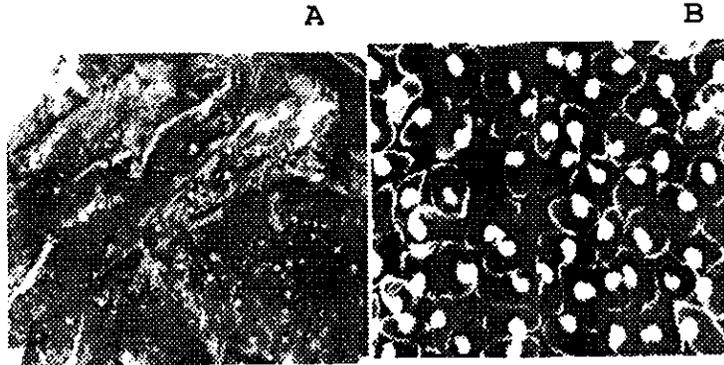


Figura 2. Metacístodos o cisticercos. A. Carne de cerdo infectada. B. Cisticercos aislados. En A, los metacístodos se observan como puntos blancos, los cuales corresponden a los escólices y a las vesículas, que adquieren una forma ovoide en B, se encuentran delimitadas por la pared vesicular y en el interior de la misma se encuentra contenido el fluido vesicular y el escólex, el cual es claramente visible.

3. Morfología.

3.1 Cisticercos.

El desarrollo de las formas larvarias a partir de los huevos en cerdos infectados experimentalmente, ha sido muy bien establecida por los estudios realizados por Yoshino (1933), luego de una auto infección que le permitió desarrollar una tenia en su intestino e infectar cerdos. Hacia los 6 días post infección es posible encontrar macroscópicamente a cisticercos en desarrollo de 0.3 mm de tamaño. A los 12 días, los cisticercos se encontraron a nivel de hígado, cerebro y músculo esquelético. Hacia los 60 o 70 días post infección, cuando los parásitos tienen de 6 a 9 mm, el escólex se encuentra completamente formado con su doble corona de ganchos y sus cuatro ventosas y además, ya es posible la observación del cuello dentro del receptáculo, que muestra en su superficie muchos dobleces como septos los cuales conforman el canal espiral. En el hombre se encuentran parásitos semejantes bien desarrollados, principalmente en el sistema nervioso central, el ojo, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo.

La observación a simple vista de cisticercos recién recuperados de los tejidos mencionados, muestra que presentan dos regiones dentro del mismo parásito: una, la vesícula o vejiga que contiene al fluido vesicular y la otra, un tejido blanquecino correspondiente al escólex y cuello adosado a la cara interna de la pared vesicular de la vejiga (Fig. 2B). Al observar a simple vista un cisticerco entero, la pared vesicular parece ser una membrana blanquecina, translúcida, homogénea e hinchada a través de la cual se puede observar el escólex invaginado. Cuando la vesícula es vista a través de un microscopio de disección, se presenta como una superficie llena de surcos finos y su apariencia parece finamente granular. En la región donde se invagina el escólex, vista con el mismo tipo de microscopio, se aprecia un pequeño orificio con plegamientos circulares (Cárdenas-Ramírez et al, 1982). Cuando se observó la vesícula por microscopía de luz usando cortes de los parásitos, se distingue una

pared vesicular continua que se interrumpe en el orificio o poro dentro del cual se encuentra el escólex invaginado (Fig. 3A).

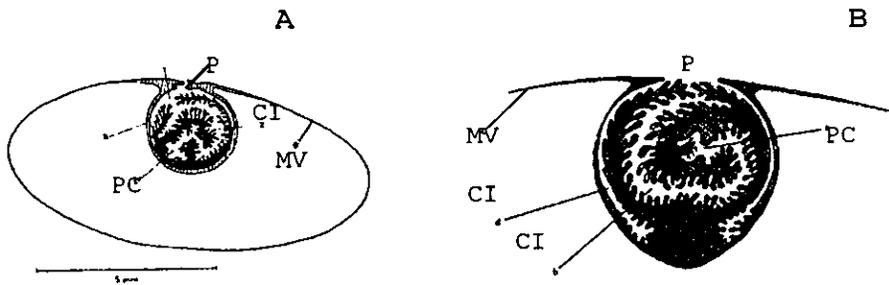


Figura 3. Diagrama del corte de un cisticerco. A. Cisticerco entero en el que se observa el escólex invaginado, la membrana vesicular (MV) y el poro (P). Dentro del escólex se aprecian el canal invaginado (CI) y la porción cefálica (PC). B. Acercamiento del escólex invaginado en donde se observan las miras regiones indicadas en A. A través del poro (P), el escólex saldrá después llad y dará origen a la tenia durante el fenómeno de evaginación (Tomado de Siles, 1974).

3.2 Tenias.

El gusano adulto se desarrolla una vez que el escólex ha evaginado del cisticerco en el interior del intestino (Fig. 4A), en el ser humano llega a alcanzar longitudes de hasta 6 metros luego de 4 meses de ocurrida la infección. La observación macroscópica de este parásito muestra que es semejante a una cinta o listón, en el que la porción mas delgada corresponde a la zona en que se encuentra el escólex dentro de la porción cefálica (Fig. 4B). Luego del escólex, se identifica el cuello a partir del cual se desarrolla el resto de la tenia denominado estróbilo y el cual aparentemente se encuentra segmentado a lo largo de él (Fig. 4C). Como ya fue indicado, a partir del cuello se lleva a cabo el crecimiento y diferenciación del estróbilo ya que en este sitio se encuentran concentradas las células embrionarias mitóticamente activas (Lumsden y Hildreth, 1983) y que en el caso de *T. solium*, se ha propuesto que podrían corresponder a células germinales de acuerdo al marcaje con timidina tritiada usando cisticercos recién evaginados con tripsina al 1% (Merchant, Corella y Willms, 1997). En la cadena estrobilar, los proglótidos a medida que se van alejando del cuello, constituyen un gradiente antero-posterior de organogénesis reproductora (Fig. 4C), por lo que los proglótidos terminales son grávidos (Lumsden y Hildreth, 1983). Estos mismos autores argumentan que aunque los proglótidos están divididos a la observación directa, ello es una impresión falsa porque realmente lo que existe es una constricción superficial que da origen a la segmentación y en el interior del tejido parasitario todo es continuidad (Fig. 4C). Cuando hay necesidad de que se separen los proglótidos terminales, lo cual es un aspecto aún desconocido, se generan planos de ruptura determinados por constricciones musculares localizadas entre los proglótidos; tales rupturas, argumentan, se presentan en segmentos totalmente diferenciados y grávidos y ello permite que sean expulsados junto con la materia fecal. Posiblemente, el hecho de que no exista una separación real entre cada proglótido, puede radicar en que el estróbilo requiere de una cierta fortaleza en la unión entre sus segmentos lo cual le impide fracturarse fácilmente y ello, además, le permite resistir las condiciones hostiles a los que se enfrenta a causa de los movimientos peristálticos intestinales. Luego, bajo la presión del aumento en la formación y desarrollo de otros proglótidos no maduros ni diferenciados, los proglótidos terminales tienden a separarse lo que asegura al gusano adulto mantener el ciclo de vida. Una explicación biológica al hermafroditismo de *T. solium* es facilitar que continuamente se estén reproduciendo (Lumsden y Hildreth, 1983) y por lo tanto asegurar el ciclo de vida.

4. Estructuración morfológica.

4.1 Cisticercos.

La citoarquitectura vista a nivel microscópico de todos los metacéstodos en general, incluyendo los de *T. solium*, no es muy completa, aunque puede presentar variaciones importantes ocasionadas por el tamaño y la forma de los parásitos (Lumsden et al, 1982). Para una mayor comprensión de cómo se encuentra configurada, se iniciará la descripción de lo concerniente a la vesícula y posteriormente al rosetelo invaginado.

4.1.1 Pared vesicular. La observación directa de los cisticercos vivos al microscopio invertido de luz, muestra que tienen movimiento continuo de toda su superficie irregular. Cuando se observan cortes de los parásitos con microscopía de luz, con aumentos mayores a 60 x y con tinciones específicas (Cárdenas-Ramírez et al, 1982), la pared vesicular muestra varias estructuras: la capa mas externa, a lo largo de la cual se observan numerosas protuberancias, muestra una superficie rugosa, bajo la cual se encuentra un tegumento sincicial, continuo y extendido en toda la longitud de la superficie externa de la pared. La observación con aumentos de 100x, de las bases de estas protuberancias, muestra que en ellas se encuentra una capa fina fibrilar de fibras musculares, la cual podría tener correspondencia con la musculatura circular dinámica descrita por Ramírez-Bon et al (1982). Este sincicio está limitado por dos membranas, una que da hacia el exterior y otra hacia el interior del parásito; por debajo de esta última, denominada también membrana basal, se encuentra una capa muscular definida en donde se localizan los citones o células subtegumentales, las células flama, los depósitos de glucógeno y de lípidos. Por debajo de esta región celular, el tejido se vuelve mas laxo y ahí contiene canales, ductos, elementos musculares y células de distribución irregular. Esta porción de tejido laxo de los parásitos es la que posiblemente entra en contacto directo con el fluido vesicular.

A nivel de microscopía de barrido, cuando se observan porciones fijadas de la pared vesicular de cisticercos y a bajo aumento, la superficie presenta innumerables protuberancias que están formadas por musculatura circular en contracción que se localiza en la base de ellas. Estas protuberancias pueden ser mas o menos prominentes debido a los movimientos musculares continuos que se dan en esos sitios y que en su conjunto generan el movimiento de la superficie de los parásitos que se mencionó anteriormente. Cada una de las protuberancias, en su superficie externa está totalmente cubierta por microvellosidades, mientras que la superficie interna es irregular y en ella se observan a los elementos celulares (células subtegumentarias, etc.) y extracelulares como las fibras de colágena (Ramírez-Bon et al, 1982).

La observación por microscopía electrónica de transmisión de cortes de los parásitos muestra que la porción externa del tegumento corresponde a una membrana plasmática típica, plegada en microvellosidades, lo cual le otorga una semejanza con la porción luminal del intestino (porción superior de la Fig. 5A). En apoyo a esta semejanza, según lo observado y propuesto por Lumsden y cols (1982) para metacéstodos de otros céstodos y por Ramírez-Bon y cols (1986) para los de *T. solium*, la composición interna de las microvellosidades es muy parecida a la que se encuentra en las del epitelio intestinal; en las porciones internas centrales de estas microvellosidades se encuentran centros cilíndricos de ramilletes de microfilamentos distribuidos longitudinalmente, los que presumiblemente están compuestos de actina y lo cual permitiría la motilidad del epitelio vesicular a través de complejos de actina-miosina. En relación a la membrana basal, también se ha demostrado que dicha membrana sufre procesos de interdigitación hacia la región celular por lo que se establecen puentes citoplasmáticos que comunican al tegumento con las células subtegumentales, y por ello, a través de los mismos se realizan los fenómenos internos de

transporte de microvesículas. En la región tegumental que se encuentra entre el espacio que brindan las membranas plasmática y basal, hay gran cantidad de microvesículas y mitocondrias (Fig. 5A). Por abajo del tegumento, se han

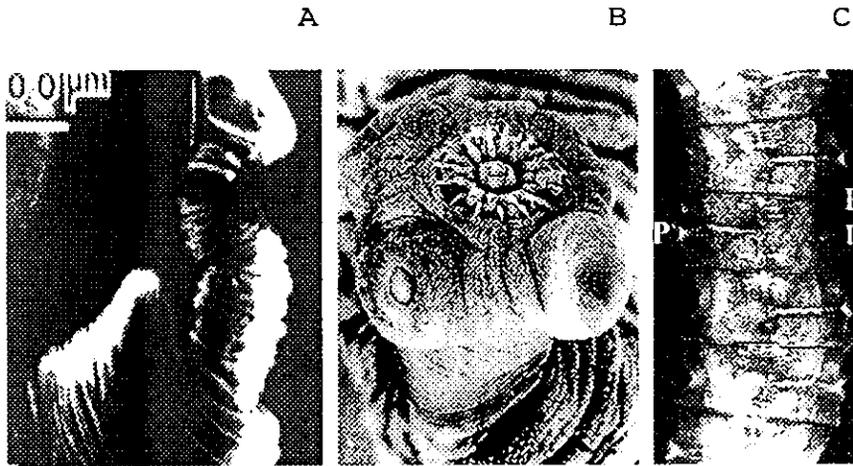


Figura 4. Parásitos adultos o tenias. A. Estilex recién formado de un cestodo visto por microscopía electrónica de barrido (tomado de Cárdena et al, 1982). En la extremidad inferior izquierdo se observa la pared vesicular del cisticerco. B. Porción anterior de un estilex de un cestodo de una tenia visto por microscopía electrónica de barrido. Se observan los cuernos de la corona de ganchos (aún con restos de tejido del intestino del huésped), tres o cuatro ventosas y el cuello se observa en la parte inferior de la imagen. (Tomado de Cárdena et al, 1982). C. Porción del estróbilo de una tenia, en donde se observan los poros genitales (P) de una prográvida de un ejemplar adulto recuperado de un quito de *Illeceparex* (interior) (tomado de Maravilla et al, 1998) y en donde se observan los poros genitales (P), las ramas uterinas (R) y el ovario (O).

identificado seis sistemas celulares diferentes (Ramírez-Bon et al, 1982), todas las células tienen componentes semejantes tales como ribosomas libres, un aparato de Golgi, mitocondrias, microtúbulos y microvesículas: 1) Las células subtegumentarias que contienen núcleos esféricos u ovoides con cromatina granular fina, de las cuales nacen extensiones de citoplasma que unen al tegumento con ellas (puentes citoplasmáticos) y que son las encargadas de elaborar los componentes que permiten la constitución de las membranas y el tegumento. 2) Las células de almacenaje que contienen grandes cantidades de glucógeno alfa y gotas de lípidos y su citoplasma están en contacto con las membranas plasmáticas de otros tipos celulares. 3) Las células flama, así como las ducto o protonefridiales, forman al sistema excretor, las primeras tienen un número variable de cilios acomodados en forma hexagonal y libres en la luz de los ductos colectores. Los cilios están formados por filamentos constituidos por microtúbulos (9 + 2). 4) Las células ducto se encuentran unidas entre sí formando un sincicio y cada una de estas se encuentra conectada a ductos colectores diferentes. Los ductos, a los cuales se unen las células ducto y en donde las células flama presentan sus cilios, son túbulos largos y distribuidos en la superficie externa e interna de la pared vesicular (Ramírez-Bon et al, 1982) y la cual forman un entretejido tridimensional que ha podido ser visualizado luego del tratamiento del tejido de la vesícula con tripsina (Cárdenas-Ramírez et al, 1982). 5) Los miocitones son células musculares productoras de fibras, cada una de ellas se une a través de puentes citoplasmáticos a los grupos de miofibrillas que corren entre la membrana basal del tegumento, los citones tegumentarios y las células de almacenamiento (Fig. 5B). 6) Las células nerviosas, no se han localizado a nivel de pared vesicular, aunque el sistema nervioso se identifica por los axones nerviosos. A parte de

los elementos celulares descritos, se han demostrado que existen otros extracelulares como las fibras de colágena, que se encuentran estrechamente asociadas con las capas de fibras musculares y posiblemente, el tejido conectivo que rodea al músculo actúa como un punto de unión de grupos particulares de miofibrillas. En suma, la pared vesicular de los cisticercos es un órgano complejo diseñado para la protección y el mantenimiento del parásito invaginado. Esta estructura es la que directamente interactúa con el huésped, y realiza la mayor parte de funciones de la larva que están relacionadas con su ambiente tales como la alimentación, la excreción y la defensa contra el sistema inmune del huésped (Ramirez-Bon, 1982).

4.1.2. Escólex y cuello. Como en el caso de la pared vesicular, en estas regiones también se distingue tanto al tegumento como las células que componen el parénquima. Sin embargo, presentan características propias. La observación del escólex y cuello a nivel de microscopía de luz, muestran que se encuentran invaginados dando forma a un canal espiral, al final del cual se encuentran tanto las ventosas como el rostelo constituido por el cono rostelar y su doble corona de ganchos característica (Figs. 3A, 3B y 4B). Observaciones a aumentos mayores de 40x y usando tinciones específicas del cono rostelar, muestran que en esta región hay gran cantidad de material fibrilar y en microscopía electrónica de transmisión aparecen ductos excretores a los cuales se encuentran unidas densas redes de células flama, fibras musculares gruesas, multitud de redes de elementos nerviosos y células de almacenamiento (Cárdenas-Ramírez et al, 1982).

Según lo descrito por Slais (1970) el sistema excretor, representado por las células flama y los ductos mencionados y el cual por ser muy primitivo se le considera protonefridial, nace en el escólex y cuando el parásito aún no ha evaginado, se mantiene empacado dentro de la capa fibrosa del canal espiral junto a los corpúsculos calcáreos. En este sentido, según este mismo autor, existen dos tipos de canales laterales que se originan desde la superficie de la pared vesicular y se dirigen en forma de zigzag hacia el rostelo pero se desconoce cual es su funcionalidad. Por otra parte, cuando las ventosas y el cono rostelar se observan en cortes tangenciales, en su base se encuentra una malla densa de fibras gruesas que están asociadas a células musculares (Cárdenas-Ramírez et al, 1982).

El tegumento del parásito invaginado en la región más enrollada del canal espiral, es muy grueso en comparación con el de la pared vesicular, está comprimido, tiene un alto contenido fibroso y en sus dobleces contiene gran cantidad de corpúsculos calcáreos y una gran cantidad de fibrillas. La conformación de ramilletes de las fibrillas da origen a una red fina que les permite adquirir una disposición análoga a la de las fibras musculares que se observan en regiones diferentes de los cisticercos (Fig. 5B). El tejido fibroso tiene una distribución diferente dependiendo de si el parásito se encuentra evaginado o sin evaginar: en el primero de los casos, las fibras están distribuidas paralelamente al eje del escólex, mientras que en el segundo caso, las fibras cubren la porción del escólex que está en contacto con la cavidad vesicular. Tanto la distribución, como la presentación de los tejidos de los parásitos invaginados, podrían estar relacionados con las acciones de contracción que se requieren para su desenrollamiento durante el fenómeno de evaginación (Slais, 1970).

En lo relacionado con el contenido celular de la superficie del canal espiral, éste es muy similar al de la vesícula; sin embargo, en esta última, hay una mayor cantidad de células subtegumentales y las fibras musculares corren en dos direcciones en ángulos rectos, una con respecto a la otra, formando una red continua densa.

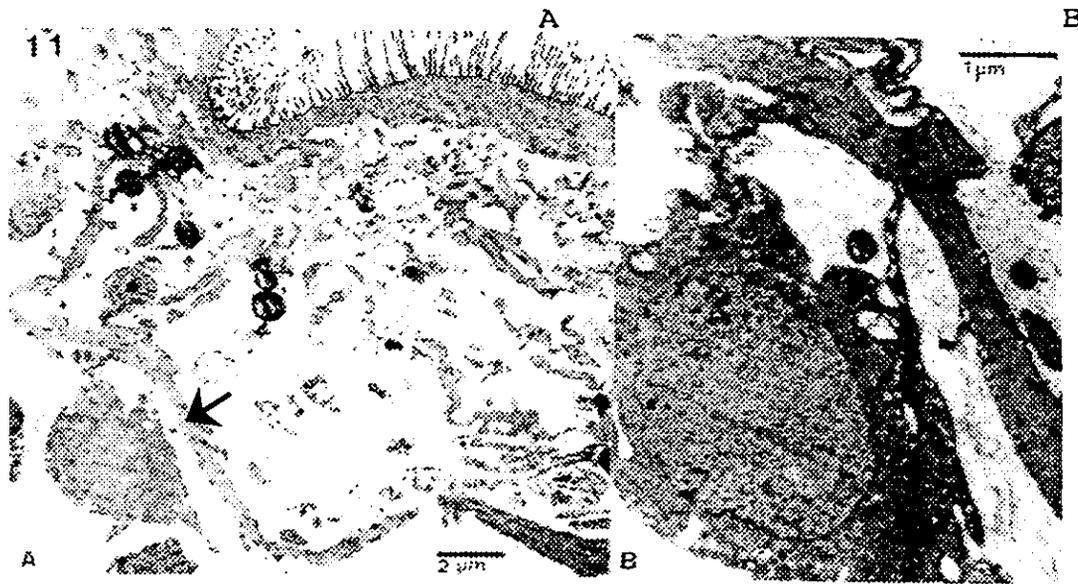


Figura 5. Observación al microscopio electrónico de transmisión de un corte de cisticerco. A. De la parte superior a la inferior se observan a la membrana vesicular en la que destacan las microvellosidades como ribetes de cepillo, el tegumento, la zona de tejido laxo, una fibra muscular que cruza la imagen y en a la cual se encuentra unido el miocitón tegumentario. B. Amplificación de la imagen A en la cual se observa el miocitón unido a través de un puente a la fibra muscular y en el que destacan el gran núcleo. Dentro de la fibra muscular se encuentran las miofibrillas en forma de ramilletes acomodados en forma paralela (Tomado de Ramírez-Bon et al, 1982). Las flechas indican las fibras musculares dentro de las cuales se encuentran las miofibrillas.

4.2 Tenias.

La composición del tegumento del escólex y proglótido de las tenias es muy semejante al de los cisticercos y por ello, es posible que muchos eventos fisiológicos de ambos parásitos sean semejantes y se relacionan con la alimentación, así como funciones protectoras contra enzimas o anticuerpos del huésped (Ubelaker, 1983). Sin embargo, a pesar del parecido, la localización de los parásitos podría involucrar mecanismos diferentes para favorecer su infección.

A través del escólex las tenias logran sujetarse eficientemente al epitelio intestinal de su huésped, ya que su composición del mismo (cono rostellar, ganchos y ventosas) (Fig. 4B) favorece que se mantengan ante el ambiente difícil que podrían producir tanto los movimientos peristálticos intestinales como el paso de alimentos parcialmente digeridos a través de la luz intestinal. Por lo tanto, esta región de los parásitos juega un papel importante en su sobrevivencia, aunque también podría participar en otros fenómenos como la absorción y secreción de sustancias gracias a su fuerte interacción con el tejido intestinal del huésped. Las observaciones realizadas durante infecciones experimentales apoyan la posibilidad de que a través del tegumento del escólex ocurra la absorción directa de nutrientes o de que, se efectúe la secreción de sustancias del parásito ya que se ha visto que las tenias se sujetan al intestino de hámster (Merchant et al, 1997; 1998). El escólex de las tenias de *T. solium*, como el de toda la familia *Taeniidae* es acetabulado y de tipo penetrativo, lo cual es una característica que les permite a las tenias la capacidad de penetrar la mucosa intestinal, fijarse a las microvellosidades por medio de sus ventosas, llegar hasta las criptas de Lieberkühn y anclarse en estos sitios mediante sus ganchos como lo muestran las observaciones

obtenidas de infecciones experimentales en hámster (Merchant et al, 1998). Así como la posibilidad de que la fijación y daño que las tenias generan en la mucosa intestinal les permite adquirir suficientes cantidades de nutrientes provenientes de los recambios y destrucciones celulares. Estos nutrientes podrían satisfacer los requerimientos nutricionales que las tenias recién evaginadas tienen para su desarrollo. La secreción o eliminación de sustancias, podría tener sustento en la demostración de que en el escólex de los parásitos invaginados se encuentra la desembocadura de los canales protonefridiales (Cárdenas-Ramírez et al, 1982; Slais, 1970), que constituyen el sistema de excreción (Ramírez-Bon et al, 1982). Asociado a la función excretora de los canales protonefridiales, también según Slais (1970), en esta zona se encuentran la mayor parte de glándulas por lo que ahí podrían darse diferentes tipos de secreciones, que podrían tener algún papel importante en la relación huésped-parásito, como la destrucción del tejido intestinal durante la fijación de las tenias en el hámster infectado experimentalmente (Merchant et al, 1998). La excreción de sustancias por las tenias, no sólo podría estar ejemplificada por las sustancias de acción necrosante discutidas, sino que debido al contacto directo con el huésped y asociado al daño generado, otras sustancias de origen parasitario podrían alcanzar la circulación del huésped, lo que explicaría porque se detectan antígenos de tenias en el suero y las heces de animales y humanos infectados (Ambrosio et al, 1997; Correa et al, 1999; Martínez-Guarneros, 1998; Wilkins et al, 1999).

La otra parte de las tenias, importante por su tamaño y su contenido, es el estróbilo (Fig. 4C). Como ya se había comentado, esta parte de las tenias está formada por una cadena larga de segmentos o proglótidos que se generan a partir del cuello del parásito y que se diferencian y maduran conforme más se alejan de él, en los proglótidos maduros y grávidos, al microscopio de luz, se identifican los órganos sexuales completos y los huevos. No existe, hasta el momento, evidencia alguna de los factores que determinan que los proglótidos se generen, maduren y se diferencien. Sin embargo, a partir de estudios hechos con tenias recién evaginadas, se ha propuesto que el origen de las componentes celulares de los proglótidos provienen de la diferenciación de células germinales localizadas en la zona parenquimatosa medular del cuello situada por debajo de las ventosas (Merchant et al, 1997). Según lo propuesto en estos estudios, las células germinales una vez que se diferencian se colocan por debajo de la membrana tegumentaria.

En lo relacionado con la nutrición de las tenias, aunque no existe estudio alguno al respecto, se ha propuesto que durante los primeros momentos de su fijación al intestino del huésped, ellas adquieran sus nutrientes a través del tegumento localizado en el escólex; aunque, una vez que el estróbilo se encuentra formado, es posible que la adquisición de nutrientes se realice principalmente a través del tegumento de los proglótidos en donde es posible que los almacenen. Los eventos metabólicos y la contracción muscular también se realizan en el estróbilo que está estructurado de tal manera que permite satisfacer todas las demandas termodinámicas requeridas en la extraordinaria producción de biomasa que se necesita para el crecimiento exponencial de cada uno de sus componentes. La composición del parénquima, el cual rodea a los órganos reproductores, se especializa en el almacenamiento de carbohidratos y lípidos y a su vez, todo el parénquima se encuentra rodeado de un tegumento especializado en la absorción y que se presenta a lo largo de las tenias porque el tejido somático es sincicial y en donde la regionalización específica es mínima ya que existe un grado alto de conservación relativa a la composición celular. Todo el tejido somático (tegumento, fibras musculares, ductos excretorios y conglomerados nerviosos), como ya fue indicado, tiene una distribución continua a lo largo y ancho de los gusanos. Bajo estos términos, la forma más simple de ver la organización fisiológica y estructural del estróbilo, es como si pareciera un intestino vuelto al revés, en el cual se encierran y adaptan los órganos reproductores, además de que ello no genera energía para

alimentación o protección y sólo se dedica a reproducirse (Lumsden y Hildreth, 1983). La composición del interior de los céstodos adultos permite que no tengan sistemas circulatorios o digestivos y los productos de desecho sean canalizados a través de los canales excretores por medio de los cilios de las células flama al exterior de forma semejante como sucede en los cisticercos (Lumsden y Hildreth, 1983; Smyth y McManus, 1989).

5. Sistema muscular en céstodos.

Los invertebrados están constituidos por un sistema de musculatura lisa, en el que sus fibras musculares (también denominadas células musculares) contienen miofilamentos o miofibrillas (Lowy y Hanson, 1962). Estos miofilamentos, que son gruesos y delgados, tienen una estructura altamente ordenada la cual es semejante a la encontrada en los vertebrados, aunque en lo referente a las fibras musculares de los parásitos, éstas no llegan a ser exactamente iguales a las de los seres humanos (Fig. 5B).

Debido a que los céstodos tienen un sistema muscular de tipo liso y al hecho de que en *T. solium*, las tenias se alojan en el intestino de sus hospederos, se considera conveniente el conocer cual es la semejanza que guarda el músculo liso de los seres humanos con el que pudieran tener los parásitos. En el ser humano, el intestino, el estómago, el útero y los uréteres tienen musculatura lisa, cada una de las células que compone dicho músculo es larga y delgada (longitud de 50-400 μm y 2-10 μm de ancho) y los desmosomas favorecen la unión entre ellas. Todas las células en su conjunto, forman una red que descansa sobre fibras finas de colágena con las cuales se encuentran intermezcladas. Estas células, por no tener una distribución regular, pierden el acomodo típico estriado de las fibras musculares cardiacas y esqueléticas y su conformación en el músculo liso genera que se desplazan unas sobre otras mucho más lentamente (100 a 1000 veces) que como lo hacen las de músculo estriado. Por estas causas, los músculos lisos son adecuados para mantener una contracción prolongada, sin que haya fatiga y que utiliza el mínimo de energía. Además, los músculos lisos presentan plasticidad en sus movimientos, comparados con la rigidez de otros tipos de músculo, al grado de que pueden encontrarse relajados completamente aún en estados en los que se acortan o se adelgazan (Rüeg, 1989).

Según los análisis de los patrones de difracción de rayos X de los músculos intactos de moluscos como *Mytilus*, los miofilamentos gruesos tienen un diámetro variable (130- 1500 Å), están constituidos de paramiosina y presentan semejanza estructural con los del músculo psoas de conejo que contienen principalmente miosina, ya que en ambos extremos de los miofilamentos hay adelgazamientos clásicos que determinan su principio y su fin. Los miofilamentos delgados tienen un diámetro de 50 Å y están constituidos por actina polimerizada o F como también lo están los del músculo psoas. Estudios con miofibras aisladas de diferentes tipos de músculo de otros moluscos mostraron que los miofilamentos gruesos están constituidos por un centro bipolar de paramiosina y una capa superficial compuesta de miosina, mientras que los miofilamentos delgados están constituidos por actina. Esta composición de los miofilamentos gruesos permite que los organismos invertebrados logren desarrollar fuerzas musculares de alta tensión, las cuales pueden ser sostenidas por periodos prolongados de tiempo y que utilizan poco consumo energético, como sucede en el caso de las almejas cuando estas mantienen algún contenido en su interior (Szent-Györkyi, Cohen and Kendrick-Jones, 1971). Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti-miosina se ha demostrado que en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en un mismo miofilamento grueso, pueden existir dos diferentes tipos de miosina dependiendo de la región de miofilamento observado (Epstein et al, 1985) lo que puede determinar la forma en que se agregan y ensamblen los miofilamentos gruesos dentro de una miofibra y posiblemente repercute en el tipo de movimiento muscular de estos organismos.

Existen diferencias entre el sistema muscular de invertebrados y los músculos de vertebrados; por ejemplo, en los primeros el sistema muscular es liso, no estriado y el alineamiento lateral de las miofibras del aparato contráctil es menos regular que el de los músculos estriados de los segundos. Esta sola diferencia podría ser la causante de que los deslizamientos de los miofilamentos durante los mecanismos contractiles sea diferente lo cual podría estar directamente relacionado con la alta cantidad de paramiosina contenida en los miofilamentos gruesos de los invertebrados (Lowy y Hanson, 1962). No se descarta que existan semejanzas entre las fibras musculares de los invertebrados y los vertebrados y que algunos aspectos funcionales de estos últimos estuvieran presentes en los elementos contractiles de los invertebrados (Lumsden y Byram III, 1967).

El conocimiento de la distribución completa del sistema muscular en invertebrados, específicamente en parásitos helmintos se ha fortalecido y ampliado con el uso de la microscopía de fluorescencia combinada. Por ejemplo, con la microscopía confocal con marcaje de faloidina-rodamina, que interacciona específicamente con la actina F o polimerizada, ha permitido establecer la distribución de los diferentes sistemas musculares activos y gracias a ello se ha establecido en céstodos adultos la existencia de dos tipos diferentes de sistemas musculares: el somático y el no somático (Mair et al, 1998).

Sistema muscular somático. A este sistema se debe la forma y la locomoción de los parásitos. Las fibras musculares de este sistema se encuentran en mayor cantidad y presentan una localización tisular profunda, hay fibras de diferentes tipos, entre las que destacan las circulares externas y las longitudinales internas, las cuales en conjunto debido a su interacción parecen conformar una red tridimensional. En los céstodos, las fibras musculares se encuentran en capas internas en donde predominan las de tipo longitudinal que a su vez presentan una estratificación en capas externas corticales y medulares internas, junto con otras transversales y dorsoventrales.

Sistema muscular no somático. Lo constituyen las fibras musculares contenidas en órganos de adhesión, en el sistema digestivo de aquellos parásitos que lo contengan y en los tractos reproductores. Dentro de esta clasificación pueden haber las fibras de tipo estriado, así como las que contienen paramiosina. En las ventosas, las fibras musculares presentan una constitución compleja que podría correlacionar a su función, la contracción de las fibras musculares orientadas de forma meridional, causan la apertura de los bordes de las ventosas, mientras que la contracción de las fibras musculares orientadas de forma ecuatorial, en conjunto con las radiales, las cuales se encuentran por dentro y por fuera de los bordes de las ventosas, permiten que la ventosa adquiera la forma de una copa de succión, con lo que se favorece su adhesión al tejido del huésped. Este fenómeno ha sido demostrado en parásitos monogéneos que parasitan peces (Halton et al, 1998). Este tipo de organización muscular podría explicar la contracción de las ventosas y el movimiento de los ganchos en *T. solium* (Fig. 4B) cuando las tenias se adhieren al epitelio intestinal de los huéspedes infectados experimentalmente (Merchant et al, 1998) y se apoya en la distribución de fibras musculares que contienen paramiosina (Laclette et al, 1995) y la gran cantidad de miosinas que se encuentra en estas zonas (Ambrosio et al, 1997).

En lo que se refiere al rosetelo armado con ganchos de los céstodos que lo contienen, se sabe que en céstodos diferentes a *T. solium* en cada par de ganchos hay tres sistemas musculares asociados: Un sistema que permite que los ganchos se extiendan y que se denomina protractor, otro sistema que permite que los ganchos se encuentren juntos y el cual se denomina abductor y finalmente, un sistema que permite el empuje de los ganchos hacia el tejido del huésped y el

cual se ha denominado retractor. Sin embargo, a pesar de que se sabe que tales sistemas de musculatura existen en los parásitos, no existe conocimiento alguno de cómo se presenta la coordinación del sistema muscular (Smyth y McManus, 1989). De hecho, a pesar de que se considera que los ganchos son importantes para la penetración en la pared intestinal, no se conoce su papel exacto en ninguno de los estadios parasitarios en los que se encuentran. Se ha propuesto, en el caso de las oncosferas que los ganchos les podrían servir para sujetar a la larva que emerge al intestino y con ello permite la penetración de esta última hacia el interior del intestino.

En lo que se refiere al tracto alimenticio y reproductor, se ha visto que existen sistemas musculares con mayor preponderancia de fibras musculares de tipo circular y pocas longitudinales internas. La función de estas fibras musculares podría tener que ver con la regulación de la apertura y cerrado de esfínteres, mientras que en la faringe, el cirro y el pene se encuentran otros de tipo fibras musculares radiales bien desarrolladas (Halton et al, 1998). En *Diclidophora merlangi* (Halton et al, 1998), se ha puesto en evidencia la manera como los sistemas musculares actúan en el parásito completo; cada una de las fibras musculares que interviene actúa de manera antagonista, cuando las circulares se contraen, las longitudinales se relajan y por ello los gusanos se vuelvan delgados y alargados. En acción contraria, los gusanos se vuelven más cortos y gruesos. Cuando los músculos dorsoventrales se contraen, aparentemente los parásitos se vuelven más lisos, mientras que si son las fibras musculares diagonales las involucradas, los parásitos presentan movimientos ondulatorios del cuerpo. Posiblemente, en el caso de *T. solium*, cuyo estado adulto es largo y ancho, exista un sistema muscular semejante que le permita extenderse y relajarse continuamente frente a los movimientos intestinales de su huésped, como lo sugiere la distribución de miosina en proglótidos (Ambrosio et al, 1997).

Es posible que algo semejante a lo descrito para las fibras musculares contenidas en otros gusanos planos, puedan ser encontradas en tenias de *T. solium*: Por ejemplo, se ha visto que la mayor parte de las fibras musculares contenidas en los tractos reproductores son circulares y algunas pocas internas son longitudinales. Se ha visto que los esfínteres están formados de concentraciones de fibras musculares circulares y que en el caso del cirro se encuentran fibras musculares radiales bien desarrolladas (Mair, Maule, Shaw y Halton, 1998).

Debido a que los helmintos, son organismos invertebrados, en ellos podrían encontrarse aspectos semejantes que se relacionan con su composición y funcionalidad muscular y posiblemente, dado que los céstodos tienen un sistema muscular de tipo no estriado, podrían presentar una distribución y ordenamiento diferente de las fibras musculares que estaría asociada al estadio de desarrollo de los parásitos.

5.1 Cisticercos.

En los metacéstodos, según las observaciones que se han hecho utilizando tinciones de hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (Slais, 1970), las células musculares son simples, alargadas, curvas y cortas. Pueden encontrarse entrelazadas formando mallas musculares a nivel del tegumento del escólex invaginado o en forma de ramilletes distribuidos debajo de las membranas basales y los citones subtegumentarios a nivel de la pared vesicular. Las fibras curvas, que en algunos casos se denominan circulares, se encuentran uniendo las bases de las protuberancias descritas anteriormente. En algunos casos, las fibras musculares de la pared vesicular parecen enlazarse a un sistema muscular transverso. A nivel ultraestructural, cada uno de los mioцитones contiene varios ramilletes de miofibrillas en su sarcoplasma, las que se distribuyen de manera paralela. El núcleo de las células generalmente se encuentra en un espacio que sobresale del sarcoplasma e incluso se separa alguna distancia de la porción

sarcoplasmática que contiene a las miofibrillas y su unión se establece a través de un puente citoplasmático (Fig. 5B) (Ramírez-Bon et al, 1982).

En el interior del sarcoplasma, además de miofibrillas gruesas y delgadas, se encuentran microtúbulos de aspecto semejante a los túbulos T encontrados en las fibras musculares de músculo estriado de los céstodos y de los que se desconoce su función, gránulos de β -glucógeno y mitocondrias (Lumsden y Byram III, 1967). Estos dos últimos componentes se encuentran principalmente distribuidos en la periferia del sarcoplasma. Por el exterior de la fibra muscular, que corresponde al espacio extracelular, se encuentra tejido conectivo intersticial de aspecto finamente filamentososo y según las observaciones a nivel ultraestructural de cortes de cisticercos de *T. solium*, algunos de esos filamentos finos podrían unirse a ciertas miofibrillas de los miocitones (Ramírez-Bon et al, 1982). Cuando se observan cortes transversales de miofilamentos gruesos, estos parecen ser circulares con diámetros que van de 180 a 540 Å , lo cual depende del plano en que hayan sido cortados. Se ha descrito que la estructura fina de las fibras musculares de los céstodos es semejante a la de otros platihelminths, ya que en sus sistemas musculares también se encuentran fibras musculares constituidas de miofilamentos gruesos y delgados semejantes. Cuando los miofilamentos gruesos se observan en cortes tangenciales, están rodeados de miofilamentos delgados, en apariencia ambos tipos se encuentran unidos por extensiones que van de uno a otro miofilamento. En cortes longitudinales, los miofilamentos se acomodan en líneas paralelas y en las zonas donde aparentemente se dan las uniones, se encuentran cuerpos densos fusiformes asociados a los sarcolemas o citoplasmas de las células musculares (Lumsden y Byram III, 1967).

A nivel de escólex invaginado, el sistema muscular está constituido de un sinfín de miofibras entretrejidas las cuales parecen formar una malla que se sitúa en medio de la pared vesicular que da hacia el exterior del parásito y el canal espiral. Mientras que en la zona en donde se encuentra el escólex y la que está en contacto con el resto de la vesícula, la distribución muscular es menos organizada y pierde la apariencia descrita.

Cuando se observan a nivel ultraestructural cada una de las fibras musculares situadas por debajo de la membrana basal, en su interior se distinguen distribuidas longitudinalmente a todo lo largo de ellas una gran cantidad de miofibrillas, en algunas regiones del sarcolema, en el que están inmersas las miofibrillas, se presentan extensiones de las membranas que forman los puentes citoplasmáticos y los cuales se enlazan a los miocitones formando un sincicio continuo (Ramírez-Bon et al, 1982). Esto se ha descrito para los céstodos en general (Lumsden y Byram III, 1967) (Fig. 5B). En el caso de los miocitones se observa que cada uno contiene un núcleo grande y que en su citoplasma se pueden encontrar mitocondrias y glucógeno.

Las miofibrillas que se pueden observar en los cisticercos no sólo están contenidas dentro de las fibras musculares, ya que se presentan en otros sitios tales como las microvellosidades que conforman la superficie de los cisticercos y a nivel de la luz de los canales que se encuentran asociados a las células flama. En las microvellosidades, las miofibrillas están distribuidas longitudinalmente y son delgadas por lo cual presumiblemente están constituidas de actina. A nivel de células flama, sobre todo en la región de los cilios que se encuentran en la luz de los canales protonefridiales, se observa están constituidos internamente de miofibrillas de distribución longitudinal, las cuales presentan un patrón de acomodo característico (Ramírez-Bon et al, 1982). A mayor aumento, algunas de las miofibrillas de las fibras musculares contenidas en la pared vesicular parecen unirse a fibras de colágena delgadas, finas y extracelulares que en su conjunto forman el tejido conectivo que rodea a las fibras musculares (Ramírez-Bon et al, 1982).

5.2. Tenias.

En relación a los parásitos adultos, la distribución muscular es diferente dependiendo de la región de observación: en la porción cefálica la distribución y composición de las fibras son muy semejantes a lo que se ha descrito en el escólex invaginado dentro de los cisticercos. Sin embargo, a nivel de la cadena estrobilar, la composición y distribución de las fibras musculares deben ser totalmente diferente. Según Lumsden y Hildreth (1983) en la porción medular de los proglótidos se encuentran fibras distribuidas de forma longitudinal, otras en forma transversal en las regiones corticales del estróbilo y otras circulares que principalmente están situadas en las uniones aparentes de los proglótidos.

En relación a las fibras musculares que se encuentran en las estructuras del sistema reproductor (cirro, ductos genitales, etc.), también Lumsden y Hildreth (1983) mencionan que hay una distribución diferente de fibras musculares que deben estar asociadas a los órganos, pero no existe hasta el momento evidencia de tal asociación.

A pesar de lo poco que se conoce con relación a la distribución de las fibras musculares en tenias, es posible que ésta se relacione con el funcionamiento de las mismas; Lumsden y Hildreth (1983) mencionan que las fibras somáticas principales de los céstodos adultos deben tener una actividad lenta para favorecer que existan fuerzas contráctiles ligeramente extendidas, lo cual a su vez permite que los parásitos se sostengan de manera firme frente a los movimientos peristálticos de su huésped ya que de otra manera estos movimientos podrían ser suficientes para provocar su expulsión. En este sentido, cabría la posibilidad de que la distribución de las fibras musculares en las tenias tenga algo de parecido al tejido muscular liso del intestino de los seres humanos (Kimber, 1960; Smyth y McManus, 1989) ya que este tipo de músculo se contrae lentamente, posee mayor extensibilidad y sostiene un estado permanente de contracción o tono aún cuando se corten todas sus conexiones nerviosas como sucede durante la peristalsis del tubo digestivo (Kimber, 1960).

Es posible como lo mencionan Lumsden y Hildreth (1983) que la constitución de las fibras musculares de los proglótidos determine que se separen o no de la cadena estrobilar. Las fuerzas musculares que ahí se encuentran uniendo cada proglótido pueden llegar a favorecer que estas regiones interproglótido se constriñan y permitan que los proglótidos se separen y con ello se provoque su expulsión del intestino.

Aparentemente, los músculos de los céstodos adultos no se encuentran muy conectados con terminales nerviosas, aunque en el caso de escólex se ha observado que existe asociación de estructuras nerviosas y musculares (Cárdenas-Ramírez et al, 1982) y esto hace pensar que sus movimientos son de tipo más miogénico y que la transmisión de estímulos excitatorios entre las mismas células musculares es frecuente gracias a sus conexiones de tipo sincicial.

6. Componentes del citoesqueleto.

Son escasos los estudios relacionados con la caracterización molecular de los componentes del citoesqueleto de *T. solium* e incluso, esto sucede también con los gusanos planos en general (Mair et al, 1998; Halton et al, 1998). El antígeno B o paramiosina (AgB) es el más estudiado, se tiene un amplio conocimiento bioquímico (Guerra et al, 1982), inmunológico (Laclette et al, 1989; 1992), celular (Laclette et al, 1987; 1995) y molecular (Laclette et al, 1991). Sólo existe un reporte para la caracterización de dos genes de actina (Campos et al, 1990) y recientemente se ha iniciado la caracterización inmunológica y bioquímica de las miosinas tipo II (Ambrosio et al, 1997).

6.1. Proteínas del citoesqueleto

El citoesqueleto de cualquier organismo está organizado por una red de fibras constituidas por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos

intermedios y gracias a esta composición se logra mantener la estructura y organización de las células, se realizan movimientos de ajuste y de transporte intra y extracelular de acuerdo a las necesidades morfofisiológicas y se efectúan movimientos de desplazamiento a través de sus substratos. Estos filamentos, de forma individual o en conjunto, tienen la capacidad de polimerización y despolimerización en tiempos determinados y en lugares específicos de la célula y le permiten efectuar todas las funciones de transporte y desplazamiento mencionadas. Las proteínas estructurales del citoesqueleto a pesar de ser componentes importantes de las células y de que representan blancos potenciales para quimioterapia (McManus y Bryant, 1995), han sido poco estudiados en céstodos.

6.1.1. AgB o Paramiosina. Como ya se mencionó anteriormente, las paramiosinas forman parte del citoesqueleto de animales invertebrados e invertebrados menores como los parásitos y se han estudiado principalmente en moluscos y anélidos (Dowben, 1969). Su papel biológico en los moluscos está asociado al mantenimiento de la contracción muscular con la menor cantidad de energía dependiente del ATP y lo que favorece una prolongada tensión muscular y se debe a la interacción con filamentos de actina, de miosina y paramiosina (Cohen, 1982). La caracterización inicial del AgB en cisticercos, mostró que es una proteína inmunodominante localizada en células tegumentarias y en el lumen del canal espiral (Laclette, Merchant y Willms, 1987), aunque posteriormente, mediante localización inmunohistoquímica con anticuerpos anti-paramiosina, se redefinió que la proteína se encuentra principalmente en las fibras musculares situadas en pared vesicular y que en las tenias presenta una distribución acorde con la composición de fibras musculares circulares y longitudinales (Laclette et al, 1995). Una vez que se hizo la determinación de la composición de aminoácidos del AgB, se encontró que tenía una alta homología con paramiosinas de otros parásitos, por lo que desde ese momento se le denominó paramiosina de *T. solium* (Laclette et al, 1991). Según las observaciones de la distribución de esta paramiosina, así como lo que se sabe de otros organismos invertebrados, es posible que la proteína interactúe con miosina (Laclette et al, 1995) y lo cual también es apoyado por la localización en fibras musculares semejantes de la miosina tipo II (Ambrosio et al, 1997).

Aparentemente el AgB tiene un papel importante en la relación huésped-parásito (Laclette et al, 1989; 1992), ya que se ha visto que es capaz de activar al C1q del Complemento a través de su porción amino terminal, pero por otro lado, su región carboxilo terminal tiene la capacidad de inducir a la producción de anticuerpos. Aún no existe explicación de porque la proteína, a pesar de ser estructural, se secreta por los parásitos y porque no presenta región líder que determine esta propiedad.

6.1.2. Actina. Las actinas son proteínas estructurales muy conservadas y están presentes en todos los organismos. Por lo general, son proteínas codificadas por varios genes que se pueden originar luego de haber sido modificadas postransduccionalmente. Esto explica porqué existen isoformas con propiedades físicas y químicas semejantes las cuales se han conservado a lo largo de la evolución, lo que permite su interacción específica con otras proteínas que se asocian a ellas y lo que les permite a las actinas mantener el sitio de unión específico con el ATP. Independientemente de las isoformas, las actinas se encuentran en forma polimerizada denominada actin F que participa en las actividades biológicas relacionadas con los movimientos musculares y la forma monomérica o actina G, la cual no tienen participación en dichos movimientos (Bray, 1992).

A pesar de que las actinas son constituyentes importantes para el citoesqueleto y que han sido muy estudiadas, en los céstodos ténidos no se ha hecho una caracterización molecular a fondo, de ahí que la única información en

T. solium esté relacionada con la caracterización de dos genes uno denominado pAT5 y otro pAT6, el pAT6 se expresa en cisticercos y aunque se ha logrado aislar el ARN mensajero correspondiente, aun se desconoce cual es su distribución topográfica en los tejidos de los parásitos (Campos y col, 1990). En estudios que se han hecho con *Diphyllobothrium dendriticum*, un cestodo no tenido y que infecta gaviotas, se han aislado y secuenciado seis genes de actina, de los cuales dos presentan una secuencia homóloga a pAT5 y pAT6 (Wahlberg y Johnson, 1997) y que han sido localizados en estos parásitos mediante experimentos de hibridación *in situ* (Wahlberg, 1997) e incluso se ha intentado determinar por histoquímica la localización de las actinas en los tejidos de los parásitos mediante el empleo de faloidina conjugada a rodamina (Wahlberg, 1998). Los resultados que se han obtenido de la caracterización en otros helmintos como *Echinococcus granulosus*, muestran evidencias de que las actinas de estos parásitos tienen características diferentes cuando se les compara con las de mamíferos; se ha encontrado que el ARN mensajero es más pequeño, se produce una sola clase de actina y es posible que existan mas de dos genes que codifiquen para la proteína (McManus and Bryant, 1995).

La presencia de genes de actina diferentes, indica que existen modificaciones postraduccionales durante su expresión, lo que sugiere que no solamente existen 3 diferentes tipos de actina (alfa, beta y gamma), sino también diferentes isoformas de las mismas, las cuales podrían diferenciarse principalmente por la composición de sus aminoácidos en las regiones amino terminales (Herman, 1993). En los cestodos, podría haber la expresión de diferentes isoformas de actina en un mismo momento como lo sugieren los resultados de hibridación *in situ* en parásitos de *D. dendriticum* (Wahlberg, 1997), lo cual muy posiblemente pueda darse en cisticercos y tenias de *T. solium* (Reynoso-Ducoing et al, 2000). Algunos resultados recientes de localización de actina, análisis por geles uni y bidimensionales de actina purificada de cisticercos, cisticercos en evaginación y tenias, sugieren la presencia de diferentes isoformas en cada estadio de desarrollo y de isoformas comunes entre ambos estadios de desarrollo (Ambrosio et al, datos no publicados).

6.1.3. Miosina. Las miosinas, al igual que las actinas, son proteínas muy conservadas entre las especies, aunque en la actualidad se han descrito hasta 15 familias diferentes, las miosinas tipo II o convencionales han sido las mas estudiadas. La construcción de un árbol filogenético de miosinas tipo II muestra que existen grupos de miosinas que corresponden a diferentes organismos, por ejemplo las miosinas de nemátodos y tremátodos están muy cercanas (Sellers, Goodson and Wang, 1996) pero aún se desconoce si las que pudieran ser encontradas en cestodos podrían ser ubicadas en la parte en la que se encuentran agrupadas las de los helmintos dentro de dicho árbol filogenético (Fig. 6).

La cadena pesada de miosina (peso molecular aproximado de 200 kDa) presenta una región globular o cabeza, un cuello y una porción filamentosa larga (Lodish et al, 1999) (MY de la Fig. 7). En la cabeza se encuentran los sitios de interacción con actina y el sitio de actividad de ATPasa. En el cuello se encuentran las cadenas ligeras o regulatorias de dicha actividad, y en el filamento se encuentran principalmente las zonas que determinan la variabilidad de estas proteínas. Casi toda la miosina es helicoidal y sólo una pequeña parte no presenta tal característica y es la zona que interacciona con otras proteínas como la paramiosina (Cohen y Parry, 1998). La interacción de dos cadenas pesadas de miosina genera un dímero denominado también miosina nativa (peso molecular aproximado de 500 kDa) y gracias a esta conformación, una sola de las cabezas de la miosina nativa interacciona con un solo monómero de actina en la actina F y con ello desarrolla su actividad de ATPasa importante para producir desplazamiento de los filamentos gruesos que contienen miosina, sobre los

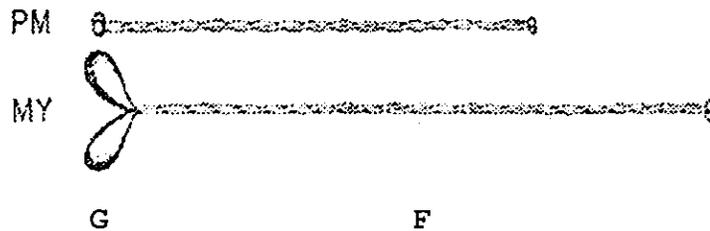


Figura 7. Esquema de la comparación entre paramiosina y miosina tipo II. Como se observa ambas proteínas están formadas por homodímeros. A diferencia de la miosina (MY), la paramiosina (PM) no contiene región globular (G) en la porción amino terminal y su región filamentososa (F) es menor en dimensiones que la de la miosina. Ambas proteínas presentan una región de α -hélice en sus extremos carboxilo terminal (Tomada de Cohen and Parry, 1990).

Por lo anteriormente mencionado, en la presente tesis se presentan los estudios relacionados con la caracterización bioquímica, inmunoquímica y morfológica de la miosina tipo II de *T. solium*, así como se presentan propuestas de la importancia que la proteína podría tener en la relación huésped-parásito.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis:

Es posible identificar, localizar y caracterizar parcialmente a la miosina tipo II de *Taenia solium*, así como determinar su semejanza con lo reportado para este tipo de proteínas.

Objetivo General:

Identificar, aislar, caracterizar bioquímica e inmunoquímicamente, así como determinar su localización en los tejidos de los parásitos, de la miosina tipo II de *T. solium*.

Objetivos Particulares:

1. Identificar y aislar miosina tipo II de cisticercos y tenias.
2. Efectuar una caracterización inmunoquímica parcial de la miosina mediante anticuerpos monoclonales anti-miosina de *T. solium*.
3. Determinar mediante inmunolocalización con los anticuerpos monoclonales anti-miosina, la distribución de miosina en cisticercos y tenias recuperadas de hámsteres infectados experimentalmente.
4. Determinar bioquímicamente, mediante la determinación de la actividad biológica de ATPasa en presencia de actina, de la miosina aislada de parásitos.
5. Determinar la posible función biológica de la miosina de los parásitos y establecer la importancia de su presencia en la fisiología de los parásitos, así como dentro de la relación huésped-parásito.

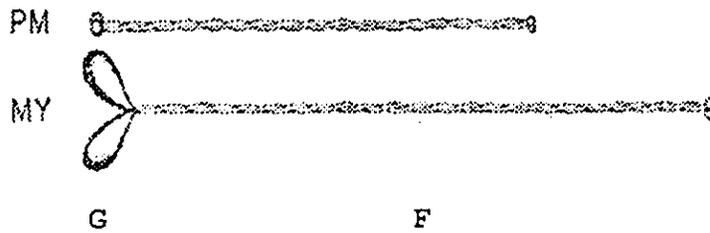


Figura 7. Esquema de la comparación entre paramiosina y miosina tipo II. Como se observa ambas proteínas están formadas por homodímeros. A diferencia de la miosina (MY), la paramiosina (PM) no contiene región globular (G) en la porción amino terminal y su región filamentosa (F) es menor en dimensiones que la de la miosina. Ambas proteínas presentan una región no α -hélice en sus extremos carboxilo terminal (Tomada de Cohen and Parry, 1990).

Por lo anteriormente mencionado, en la presente tesis se presentan los estudios relacionados con la caracterización bioquímica, inmunológica y morfológica de la miosina tipo II de *T. solium*, así como se presentan propuestas de la importancia que la proteína podría tener en la relación huésped-parásito.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis:

Es posible identificar, localizar y caracterizar parcialmente a la miosina tipo II de *Taenia solium*, así como determinar su semejanza con lo reportado para este tipo de proteínas.

Objetivo General:

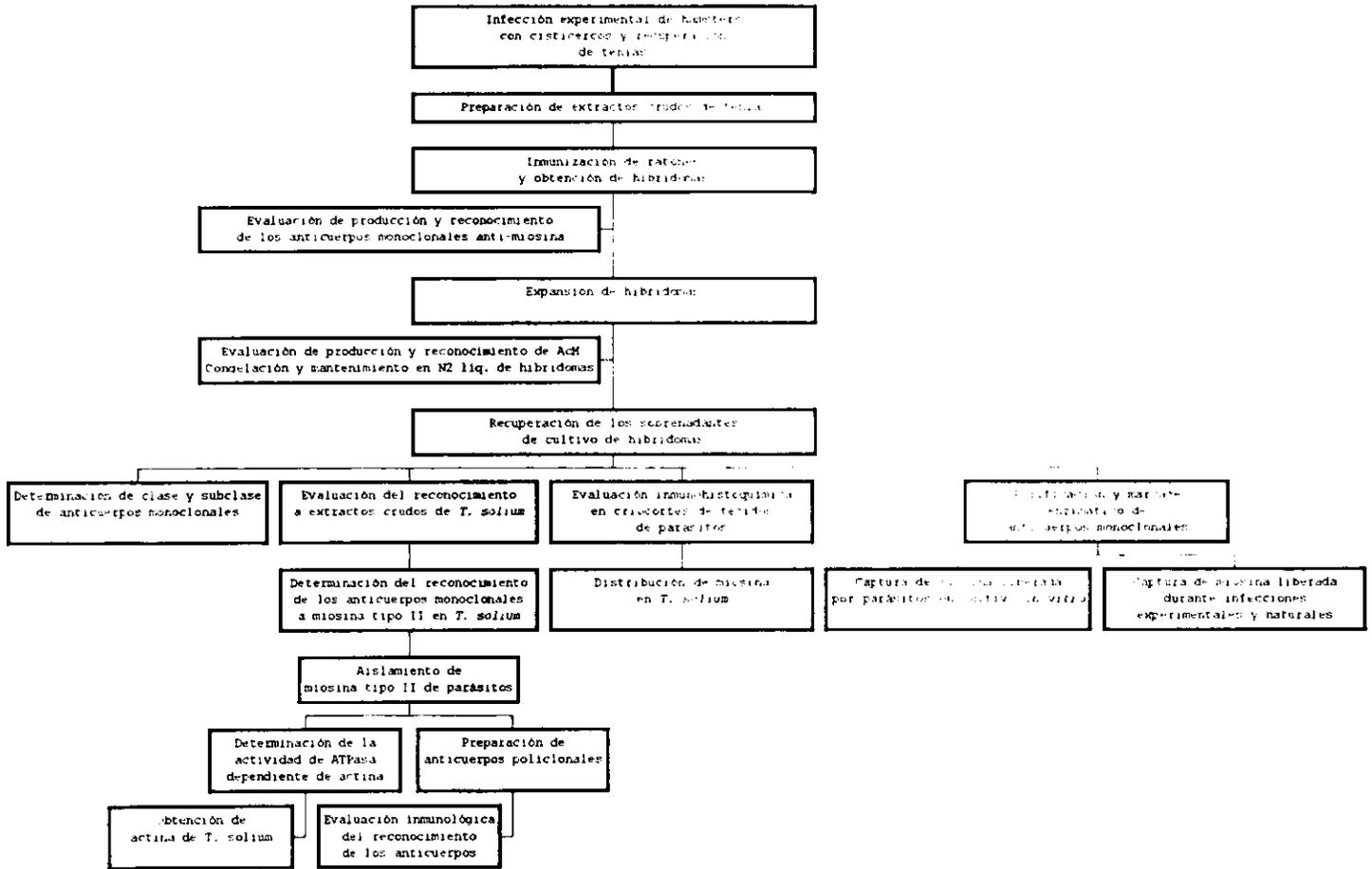
Identificar, aislar, caracterizar bioquímica e inmunológicamente, así como determinar su localización en los tejidos de los parásitos, de la miosina tipo II de *T. solium*.

Objetivos Particulares:

1. Identificar y aislar miosina tipo II de cisticercos y tenias.
2. Efectuar una caracterización inmunológica parcial de la miosina mediante anticuerpos monoclonales anti-miosina de *T. solium*.
3. Determinar mediante inmunolocalización con los anticuerpos monoclonales anti-miosina, la distribución de miosina en cisticercos y tenias recuperadas de hámsteres infectados experimentalmente.
4. Determinar bioquímicamente, mediante la determinación de la actividad biológica de ATPasa en presencia de actina, de la miosina aislada de parásitos.
5. Determinar la posible función biológica de la miosina de los parásitos y establecer la importancia de su presencia en la fisiología de los parásitos, así como dentro de la relación huésped-parásito.

III. MATERIALES Y METODOS.

Diseño Experimental



1. **Obtención de parásitos y de extractos crudos de tenias. Cisticercos.** Los parásitos se recuperaron de carne de cerdo infectado naturalmente, inmediatamente después de su sacrificio. Una vez obtenidos los parásitos se lavaron exhaustivamente con una solución amortiguada de fosfatos salina pH 7.2. Los parásitos, dependiendo de la finalidad de su uso, se dividieron para obtener de ellos la actina y la miosina, para mantenerlos en cultivo *in vitro* en RPMI 1640 complementado con solución de HEPES al 0.2%, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y bicarbonato de sodio 0.007% (condiciones de cultivo: 37°C, CO₂ al 5% y humedad relativa del 95%) o se les sumergió en una solución de inclusión (Tissue-Tek. Miles Scientific Laboratories), la cual se sometió inmediatamente a congelación en nitrógeno líquido y así, los cisticercos incluidos y congelados se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento para la obtención de cortes en un crióstato (American Optical Corporation) a -20°C. **Tenias.** Estos parásitos se obtuvieron luego de la infección experimental de hámsteres dorados inmunosuprimidos. Grupos de hámsteres (*Mesocricetus auratus*) de 10 semanas de edad, de ambos sexos, se desparasitaron una semana previa a la infección experimental con 30 mg/Kg de praziquantel (Cysticid, Merck) y se infectaron por administración oral con 5 cisticercos recién recuperados de la carne infectada de cerdo. Para mantener la infección, los hámsteres fueron inmunosuprimidos con 2 mg de metil-prednisolona (Depomedrol, UpJohn) administrada por vía subcutánea a intervalos de 15 días posteriores de la infección. Luego de 30

días postinfección, los animales se sacrificaron con éter y de sus intestinos se hizo la recuperación de las tenias. Estos parásitos, inmediatamente después de su recuperación, al igual que con los cisticercos, se dividieron dependiendo de su uso futuro. En el caso de su congelación en la solución de inclusión, los parásitos se fraccionaron para su mejor manejo en la porción cefálica, región del cuello y proglótidos. En el caso de extractos crudos de tenias, los cuales fueron utilizados para las inmunizaciones de los ratones y la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, una vez que los parásitos se recuperaron, se lavaron hasta por 5 ocasiones con solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.2 (SSAF) y posteriormente se hicieron homogenizaciones en un polytrón en presencia de KCl 3M bajo baño de hielo. Posteriormente, se procedió a la extracción de 24 h a 4°C por agitación continua y suave de la suspensión, la cual se clarificó posteriormente por centrifugación (2000 g, 30 min., 4°C). El sobrenadante obtenido se dializó contra SSAF y se centrifugó nuevamente (24000 g, 60 min., 4°C) hasta recuperar el sobrenadante respectivo el cual se filtró a través de una membrana con poros de 0.22 µm de diámetro y se concentró bajo presión positiva con nitrógeno (Allan et al, 1990). Posteriormente se hizo determinación de la concentración de proteína de los extractos obtenidos.

2. Aislamiento de miosina nativa. La proteína se preparó a partir de tejidos de cisticercos a través de extracciones salinas (Dowben, 1969), para lo cual los parásitos se homogenizaron durante 20 min. en presencia de un baño de hielo en presencia de una solución de NaCl 0.2 M amortiguada a pH 6.5 con KH₂PO₄ e inhibidores de proteasas [fenilmetilsulfonilfluoruro 3.4 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2.5 mM (EDTA)]. Luego la suspensión resultante se centrifugó (12000 g, 30 min., 4°C) y el precipitado obtenido se resuspendió en KCl 0.6 M. La solución resultante, rica en componentes del citoesqueleto, con la finalidad de hacer una recuperación mejor de la miosina, se sometió a dilución de la concentración del KCl mediante la adición gota a gota de agua destilada suficiente para alcanzar una concentración del KCl de 0.04 M y con ello se logró la precipitación de la miosina nativa. Luego, para estimación de la concentración de la proteína se utilizó un kit comercial basado en la reacción con azul de Coomassie. Posteriormente la evaluación de la pureza de la proteína se hizo mediante su análisis por geles de poliacrilamida al 6%, bajo condiciones reductoras y en presencia de Urea 12M (Harlow y Lane, 1988).

3. Anticuerpos monoclonales anti-tenia. Los anticuerpos fueron preparados de acuerdo a lo propuesto por Goding (1983), Harlow y Lane (1988) y Craig, MacPherson y Nelson (1986) con modificaciones menores. Para ello, ratones Balb/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 0.2 mg de un extracto de parásitos adultos recuperados de hámsteres infectados experimentalmente con cisticercos de *T. solium*, este extracto se mezcló tanto con Adyuvante completo de Freund como con incompleto para las inmunizaciones. Sólo durante una ocasión se hizo la inmunización de los ratones con la mezcla del extracto y del adyuvante completo, mientras que con la mezcla en la que estaba presente el adyuvante incompleto se utilizó para dos inmunizaciones mas. Una inmunización final se aplicó por vía intravenosa únicamente empleando el extracto de los parásitos. Luego de 4 inmunizaciones (en intervalos de 10 a 14 días) se sacrificaron a los ratones y se les retiró su bazo del cual se hicieron las recuperaciones de las células B. Las células recuperadas se fusionaron con células de mieloma murino (X63/Ag8.653) en presencia de polietilenglicol 4000. Luego, las células se mantuvieron en un medio de cultivo Optimem I complementado con suero bovino fetal inactivado al 5%, al cual se le adicionó una mezcla de antibióticos (estreptomina / penicilina en cantidades de 1000000 Unidades Internacionales), L-glutamina 2mM, azaserina 0.0045M e hipoxantina 0.075mM (medio HAT). Luego de 3 semanas de cultivo de las células sobrevivientes bajo condiciones definidas (37°C, humedad relativa del 95% y CO₂ al 7%), las células se cultivaron por dos semanas mas en presencia del mismo medio de cultivo sólo que en ausencia de la azaserina. Transcurrido el tiempo de cultivo, los sobrenadantes de cultivo se recuperaron y se evaluaron por ELISA como se describe posteriormente. Una vez que

se identificaron los pozos en los cuales se encontraban las células productoras de anticuerpos anti-tenia, se clonaron por dilución limitante y se mantuvieron en medio Optimem complementado con suero fetal bovino al 5% y antibióticos al 1%. Una vez que las células se expandieron y se confirmó que continuaban manteniendo la producción de anticuerpos monoclonales anti-tenia en los sobrenadantes de cultivo, se congelaron en N₂ líquido o bien se utilizaron para inocular ratones Balb/c para inyectarles a la producción de líquido de ascitis como se indica posteriormente.

4. Purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales. Con la finalidad de realizar la captura de miosina de los parásitos se llevó a cabo la purificación y el marcaje enzimático de los AcM 4B3. Para la obtención de suficiente cantidad de anticuerpos, se administraron alicuotas de hibridomas productores de AcM 4B3 bajo el esquema de inoculación recomendado por Harlow y Lane (1988). Después de 15 días de la administración de 0.5 ml de pristán las células se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones y transcurridas dos semanas de la inoculación, se colectó el líquido de ascitis por punción de la cavidad peritoneal, se aclaró por centrifugación (3000g, 10 min.) y el sobrenadante se utilizó como fuente de AcM 4B3. Como primer paso de purificación (Harlow y Lane, 1988) se hicieron tres ciclos de precipitaciones del líquido de ascitis con (NH₄)₂SO₄ saturado al 33% ajustado a pH 7.8. El precipitado se resuspendió en solución salina fisiológica pH 7.2 (SSAF), se dializó exhaustivamente y la solución obtenida fue sometida a filtración en columna de cromatografía de afinidad Affi Gel-protein A-MAPS II (BioRad). El proceso de elusión y obtención de las fracciones se hizo con pocas modificaciones de acuerdo a lo recomendado por el fabricante; a la solución que contenía los anticuerpos se le dejó en interacción con el gel contenido en la columna durante 2 horas a temperatura ambiente ó bien, en algunos casos, durante toda la noche a 4°C. Las fracciones (1 ml) recuperadas durante la elusión, fueron colectadas en 100 µl de SSAF 10X e inmediatamente se les hizo una estimación de su contenido de proteína por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC 21D). Todas las fracciones con proteína se mezclaron y dializaron como se indicó anteriormente y luego la solución resultante se evaluó para la determinación de su contenido de proteína usando un micrométodo comercial (Bradford, BioRad) utilizando inmunoglobulinas G de conejo como proteínas estándar. Se evaluó la pureza de los anticuerpos obtenidos a través de su análisis por SDS-PAGE al 12.5 % bajo condiciones reductoras con β-mercaptoetanol (Towbin et al, 1979). Los anticuerpos así obtenidos fueron evaluados en cuanto a su reconocimiento a miosina por inmunopunto. Una vez que se consideró que los anticuerpos cubrían los requisitos de pureza, se les sometió a conjugación con fosfatasa alcalina comercial (FA, Boehringer Mannheim) de acuerdo al método de dos tiempos utilizando glutaraldehído (Avrameas et al, 1989): se diluyeron 6 mg de FA solubilizados en 60 µl de glutaraldehído al 1% (PolySciences Inc) en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.8 para su activación. Luego de 18 h de activación a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de glutaraldehído mediante filtración a través de una columna (0.9 x 50 cm) de Sephadex G25 equilibrado con NaCl 0.15 M, se le determinó el contenido de proteína a cada fracción (1 ml) de la misma manera que se hizo en la purificación de los anticuerpos monoclonales, se mezclaron las fracciones seleccionadas y se les concentró por presión positiva con N₂ hasta 1 mg/ml. Los anticuerpos fueron dializados exhaustivamente en presencia de NaCl 0.15 M y mezclados en proporción de 3 mg de anticuerpos por 60 µl de la solución de enzima activada y en presencia de una solución reguladora de carbonato/bicarbonato 1 M pH 9.5. Transcurrido el tiempo de la reacción anticuerpo-enzima (18 h, 4°C), los sitios libres activos se bloquearon con 100 µl de lisina 1 M (12 h, 4°C), de tal manera que el volumen final de la solución total permitiera que la lisina alcanzara una concentración de 0.1 M. Después de bloquear, la solución se sometió a diálisis exhaustiva con SSAF ajustado a pH 8 con la finalidad de eliminar el exceso de lisina y de equilibrar la solución. El exceso de enzima se eliminó mediante filtración en cromatografía en columna de sepharosa G-25 y se usó SSAF como eluyente. A las fracciones recuperadas (1 ml) se les determinó actividad enzimática por adición del sustrato 4-Nitrofenil fosfato

(4NFF). Este sustrato había sido preparado con 20 mg de 4NFF solubilizado en 15 ml de solución amortiguadora de dietanolamina 1.0 M pH 9.8 y 5 ml de agua destilada. Para la determinación de la actividad enzimática de FA en las placas, se adicionaron 100 μ l de la solución amortiguadora-sustrato a cada pozo y se dejó que se llevara a cabo la reacción enzimática (1 h, 37°C) y luego del desarrollo del color, se hicieron las mediciones de absorbancia con un filtro de $\lambda=405\text{nm}$ en un elisómetro (BioRad 2550). De igual manera, para pozos duplicados, se hizo la detección de proteína por su absorbancia a 280 nm y una vez que se seleccionaron las fracciones que tenían actividad enzimática y proteína, fueron mezcladas y concentradas a 1 mg/ml mediante presión positiva. Finalmente, para comprobar que los AcM 4B3-FA mantenían su reconocimiento a las miosinas, se hicieron evaluaciones mediante ELISA e inmunopunto. Con la finalidad de tener una estimación cuantitativa de los anticuerpos marcados, fueron titulados por su reactividad en ELISA de la siguiente manera: A 100 μ l de miosina de cisticercos (25 μ g/ml) previamente adsorbida a micropozos, se les adicionó 100 μ l de AcM 4B3-FA previamente diluidos en diluciones seriadas (1:20 a 1:5120). Una vez que los anticuerpos fueron titulados, la solución con glicerol (1:1) y se le fraccionó en alicuotas, las cuales fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

5. Preparación y purificación de anticuerpos policlonales anti-miosina. Se sometió la miosina solubilizada en KCl 0.6M, a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE) empleando un gel preparativo al que se aplicó una carga de 600 μ g de proteína. El gel fue tratado con una solución de acetato de sodio 4M (Harlow y Lane, 1989; Higgins y Dahmus, 1979) se visualizaron las bandas del gel, se cortaron y separaron la fracción correspondiente a la miosina nativa (> 200 kDa), que se homogenizó 1:1 con adyuvante completo de Freund (ACF, Sigma) y la suspensión resultante se administró, por vía subcutánea en el lomo de un conejo Nueva Zelanda de acuerdo a lo propuesto por Harlow y Lane (1989). Cada 15 días se repitió la inmunización pero con adyuvante incompleto de Freund (AIF, GIBCO BRL). Se calcularon los títulos de anticuerpos anti-miosina producidos en ELISA con miosina semipurificada como antígeno (25 μ g/ml) previamente diluida en una solución amortiguadora de carbonatos a pH 9.6. Después de alcanzar títulos de anticuerpos de 1:3200 se obtuvo la sangre por punción cardiaca, se separó el suero, se fraccionó en alicuotas y congelaron a -20°C hasta su uso.

Los anticuerpos se purificaron por precipitación con sulfato de amonio saturado al 40% y filtración en columna de afinidad de proteína A-Sepharosa (Sigma). La columna se equilibró con 3 volúmenes de SSAF 0.1 M pH 8.0 y se incubaron los anticuerpos en la columna durante 2 h o toda la noche a 4°C. Para eluir las proteínas no adsorbidas al gel, la columna se lavó 5 veces con SSAF. Para la elusión de las inmunoglobulinas G adsorbidas al gel se aplicó una solución de ácido acético 0.1 M diluido en NaCl 0.15 M. Cada una de las fracciones obtenidas (1-1.5 ml) se recuperó en 100 μ l de SSAF 0.5 M pH 8.0 e inmediatamente después se les midió la absorbancia a 280 nm. Las fracciones seleccionadas se mezclaron, dializaron exhaustivamente contra SSAF a 4°C y finalmente se concentraron por presión positiva con N₂. Posterior a la determinación de su contenido proteico por Bradford comercial, la solución se fraccionó en alicuotas, las cuales se congelaron a -20 °C hasta su uso. De igual manera que con los AcM, en la IgG purificada, se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE con geles al 12.5 % bajo las condiciones ya descritas anteriormente. También, para la evaluación de su reconocimiento al antígeno, se llevó a cabo un ensayo de inmunopunto con 10 μ l de miosina (10 μ g/ml) adsorbida a membrana de nitrocelulosa bloqueada con albúmina sérica bovina al 5% y luego se adicionaron los anticuerpos policlonales (dil. 1:1000), anti-IgG de conejo en chivo (Zymed Laboratories) conjugados a peroxidasa (dil. 1:1000) y se reveló la reacción enzimática con 5-5 diaminobenzidina (DAB), 500 μ g/ml de SSAF y 6 μ l de H₂O₂) y una vez desarrollado el color, la reacción enzimática fue detenida con agua destilada.

6. Caracterización inmunoquímica de miosina.

6.1. Evaluación del reconocimiento de epítopos conformacionales o lineales.

Se colocaron gotas de 100 μ l de miosina de cisticercos solubilizada en KCl 0.6M (1 μ g/ μ l) que había sido previamente sometida a diferentes tratamientos de desnaturalización en PVDF (Millipore), se agregaron 100 μ l de sobrenadante con AcM 4B3 y se procesaron de manera similar a lo descrito antes.

Los tratamientos de desnaturalización a los que fue sometida la miosina fueron: ebullición en baño María durante 10 min. o adición de Urea 12 M o β -mercaptoetanol (cóctel de electroforesis) en proporción 9:1 (agente químico: miosina).

6.2. Evaluación de la especificidad del reconocimiento de los AcM hacia miosinas diferentes. Se analizó el reconocimiento de diferentes concentraciones de sobrenadantes de cultivo de hibridoma que contenía a los AcM 4B3 frente a miosinas de *T. solium*, de músculo de cerdo y miosina comercial de manera semejante a lo descrito por Murakami y Elzinga (1992). Las dos primeras miosinas mencionadas se aislaron de *T. solium*, usando bajas y altas concentraciones de KCl. Las miosinas (10 μ g) se adsorbieron a los micropozos e incubaron con diferentes diluciones de sobrenadantes que contenían AcM 4B3. Previamente, estos sobrenadantes con AcM 4B3 habían sido evaluados sin dilución alguna en su reactividad hacia las miosinas y se les determinó una absorbancia promedio de 2.0 a $\lambda=492$ nm. También, previamente se evaluó la reactividad de los anticuerpos comerciales anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa de rábano y las diluciones que se emplearon fueron de 1:1000. Como sustrato se empleó OPD 0.4 mg/ml y H₂O₂ al 30' (v/v), la reacción enzimática se paró con la adición de ácido sulfúrico 2M luego de 5 min. de reacción y se midió el color por espectrofotometría a 492 nm.

7. Aislamiento y purificación de actina.

Una vez que los cisticercos fueron homogenizados en el NaCl 0.2M y centrifugados para la obtención del botón del cual se hizo el aislamiento de miosina, el sobrenadante se recuperó y se dializó exhaustivamente (12 h, 4°C, en agitación continua) en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0 y EDTA 1 mM, se centrifugó (1000g, 5 min., temp. amb.) y el sobrenadante se dializó frente a una solución disociante compuesta de KCl 100 mM, MgCl₂ 1mM, ATP 5 mM, Na₂HPO₄ 16 mM y Na₂HPO₄ 16 mM, pH 7.3 durante 24 h a 4°C. Luego, para la recuperación de los filamentos de actina, la suspensión obtenida durante la diálisis se centrifugó (40000g, 30 min., 4°C) y el paquete que se formó se le consideró como un enriquecido de miofilamentos de actina polimerizada semipurificada (Heidcamp, 1996). Para su conservación, una vez que el paquete se resuspendió en la solución disociante, se hizo una dilución de la solución resultante con glicerol al 50% (1:1) y la actina así obtenida se preservó en congelación a -20°C hasta su uso. Debido a que los análisis por inmunopunto (IMP) de los filamentos de actina mostraban contaminación con miosina, los filamentos se sometieron a una nueva purificación mediante cromatografía de filtración a través de gel de Sepharosa-CL 4B de acuerdo a lo descrito para la purificación de actina no muscular de eritrocitos (Pinder et al, 1995). Para esto se diluyeron las muestras de miofilamentos (8 mg) 1:1 con una solución de Tris-HCl 1M, ATP 0.2 mM, MgCl₂ 0.1mM, DTT 0.2 mM, pH 7.0 (solución polimerizante) y la mezcla resultante se incubó 15 min. a 30°C y se agregó a la columna. Previamente la columna (2.5 x 60 cm) se equilibró con Tris-HCl 1M y una vez aplicada la muestra se realizó el fraccionamiento (120 ml/h) a temperatura ambiente usando solución de TRIS-HCl 1M como eluyente. Para la calibración y la determinación del volumen de exclusión, se corrieron varios marcadores de peso molecular para columna de filtración tales como: azul dextrán (2000 kDa), apoferritina (443 kDa), albúmina bovina (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). El volumen de exclusión se consideró el volumen de la primera fracción en que apareció el color (en el caso del azul dextrán) o en el que se hubiera obtenido el mayor valor de absorbancia a 280 nm del marcador respectivo. Una vez que se hizo la calibración de la columna, se fraccionaron las muestras que contenían a la actina y se determinó la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas (1.5 ml), luego se seleccionaron

las fracciones con mayor absorbancia y se determinó su concentración mediante el micrométodo comercial de Bradford. En cada una de las fracciones resultantes del fraccionamiento se buscó la presencia de actina y/o miosina mediante IMP para lo cual se utilizaron anticuerpos policlonales comerciales específicos hacia cada proteína (Zymed Laboratories) (1:1000). De la misma manera, la miosina fue identificada con los AcM 4B3. En paralelo a la detección inmunológica, a cada una de las fracciones se le determinó actividad de ATPasa, para lo cual se adicionó miosina de cisticercos solubilizada en KCl 0.6M (18 µg/ml) (ver sección 5).

La selección de las fracciones que contenían únicamente actina se hizo con base al reconocimiento de los anticuerpos, la actividad enzimática presentada por la adición de miosina y de acuerdo al volumen de exclusión medido para el azul dextrán. Una vez que se identificaron las fracciones de actina se obtuvieron alícuotas de cada pozo y se prepararon para su observación al microscopio electrónico de transmisión (con aumentos de 20,000x a 50,000x a 60 kV tal y como se llevó a cabo para la observación de la miosina (Ambrosio et al, 1997). El pH de la mezcla de las fracciones seleccionadas fue de aproximadamente 5.4, lo cual es un indicativo de que hay una proteína ácida que predomina en la solución que es una característica de la actina.

8. Determinación de la actividad de ATPasa de la miosina.

Se intentó medir la actividad enzimática con base al método descrito por Kodama, Fukui y Kometani (1986), que se basa en la evaluación colorimétrica del fósforo inorgánico liberado (Pi) que hubiera reaccionado con el verde de malaquita. Sin embargo, la estandarización no fue exitosa por lo que se tuvo que recurrir a la implementación de la combinación de dos técnicas diferentes con lo que se logró la determinación cuantitativa del Pi (Hightower y McCarty, 1996) y la evaluación de la actividad de la ATPasa de miosina bajo condiciones definidas (Perry, 1955). Esta combinación de métodos permitió medir las ATPasas de miosinas de cisticercos y tenias frente a actinas obtenidas de cisticercos y actina comercial.

Para la estandarización inicial de la determinación de ATPasa de miosina se utilizó a miosina comercial (Sigma) en consideración a las actinas mencionadas en el párrafo anterior, se incubaron 5 µg de miosina con 0.25 µg de actina utilizando como medio de reacción una solución compuesta de 100 µl de Tris-base 100 M pH 9.5, 20 µl de CaCl₂ 100 mM, 30 µl de ATP 50 mM y 30 µl de agua desionizada y bidestilada. La solución final se ajustó a pH 9.0 y se incubó en un baño de agua a 25°C. La medición de la actividad enzimática se llevó a cabo desde el momento en que se adicionó actina, se hicieron determinaciones en intervalos de 1 a 2 min. durante 10 minutos. Una vez que transcurrieron los tiempos establecidos, a cada una de las muestras se le adicionó 100 µl de ácido tricloroacético al 15% y se les dejó en reposo (4°C, 1 h) con la finalidad de lograr la estabilización de los productos de reacción. Luego, se centrifugaron las muestras en una microfuga Eppendorf (3400 g, 5 min.) y se agregaron 400µl de agua desionizada y bidestilada a 100 µl de cada uno de los sobrenadantes obtenidos. Finalmente, se incubaron estos sobrenadantes con 500 µl de una solución fresca de verde de malaquita (VM) preparada de una proporción 1:1 de la mezcla de soluciones A y B y complementada con sulfato de para metilaminofenol (4 mg/ml). La solución A contenía colorante verde de malaquita al 0.055% (p/v) en alcohol polivinílico (ALDRICH). Este alcohol previamente se disolvió en agua bidestilada y desionizada caliente a 80°C. La solución B contenía molibdato de amonio tetrahidrato (Sigma) al 2.5 % (p/v) disuelto en HCl 4N (Merck).

Para la determinación del Pi liberado, inmediatamente después de que se adicionó la solución VM a cada uno de los sobrenadantes, se incubó durante 2 min., se detuvo la reacción colorimétrica con 500 µl de ácido cítrico 0.47 M (Baker). Se midió la absorbancia a 600 nm 30 min. después de haber detenido la reacción colorimétrica en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21D. Todas las mediciones obtenidas se compararon con la testigo, las cuales contenían todos los reactivos

mencionados excepto ATP y las mediciones para las mismas se hicieron previo a que se hubiera adicionado el ácido tricloroacético.

La cuantificación exacta de *Fi* liberada, con los valores de absorbancia obtenidos, se preparó de acuerdo a Kodama *et al* (1986) de la forma siguiente: se mezclaron 500 µl del reactivo de reacción con 5 a 50 ng de fosfato de potasio monobásico 1 mM y luego, a cada uno de los tubos se le adicionó la solución VM. Luego, a los 2 minutos exactos, la reacción colorimétrica se detuvo mediante la adición del ácido cítrico y una vez que transcurrieron 30 min. a temperatura ambiente, en cada uno de los tubos se determinó la absorbancia a 600 nm. Cada una de las lecturas realizadas fue comparada con la lectura obtenida de tubos considerados blancos de reacción ya que a ellos no se les adicionó el fosfato de potasio monobásico.

Una vez que se logró la estandarización y la medición de actividad enzimática de ATPasa con miosina comercial frente a su actina homóloga, se hicieron mediciones enzimáticas de miosinas obtenidas de *T. solium*, de fracciones de actina purificada por filtración en columna a las cuales se les adicionó miosina exógena, de sobrenadantes de cultivo de cisticercos y a de suero de animales infectados.

9. Detección de miosina liberada por cisticercos cultivados *in vitro*.

Se recuperó el sobrenadante de cultivo de cisticercos. Estos parásitos fueron mantenidos en medio RPMI 1640 complementado con dextrosa al 0.4% en presencia de antibióticos (anfotericina 0.1 µg/ml, estreptomycin 40 µg/ml y penicilina G 10,000 U/ml) bajo condiciones definidas (37°C, CO₂ al 5% y humedad relativa del 98%). Posteriormente a intervalos de tiempo definidos (de 2 a 24 horas), se determinó la concentración de proteínas, se detectó miosina por medio de los AcM 4B3 y se determinó la actividad de ATPasa frente a actina purificada de cisticercos.

10. Detección de miosina en materia fecal recuperada de infecciones naturales y experimentales.

Con la finalidad de lograr la detección de miosina liberada de los parásitos en materia fecal recuperada de los animales infectados experimentalmente con tenias, se determinó por ELISA usando los AcM 4B3, pero como se encontró fondo alto de reacción, se decidió estandarizar un sistema de captura de miosina similar al de captura de coproantígenos de tenia (Allan *et al*, 1990;), usando a los AcM 4B3 para la captura. Sin embargo, los resultados no fueron reproducibles, por lo que se decidió emplear para la captura a anticuerpos policlonales anti-miosina previamente purificados (sección 2) y para el revelado, a los AcM 4B3 purificados y marcados con una enzima. Inicialmente el revelado se hizo con la peroxidasa de rábano, pero por el fondo se cambió a fosfatasa alcalina.

Además con la finalidad de disminuir al máximo las reacciones cruzadas posibles, todos los anticuerpos se absorbieron con material fecal de animales o humanos no infectados. Para ello, 200 µl de sobrenadantes de materia fecal se adsorbieron a los micropozos de manera semejante a lo descrito para la sensibilización de placas para ELISA y posteriormente se adicionaron volúmenes equivalentes de los anticuerpos, nuevamente se permitió la reacción de estos con sus antígenos y pasado el tiempo de incubación, se retiró de cada pozo cada una de las soluciones. Este proceso se repitió en tres ocasiones para garantizar al máximo la eliminación de reacciones no específicas entre los anticuerpos y las muestras.

10.1. Captura de miosina por anticuerpos. Estandarización en muestras de materia fecal.

A los sobrenadantes de heces de hámsteres y humanos no infectados se les adicionaron diferentes concentraciones de miosina purificada de cisticercos (8, 80, 800 ng/ml) y se determinó si con el ELISA descrito en el párrafo anterior había la posibilidad de estandarizar la detección de miosina en estas muestras en presencia de concentraciones conocidas de miosina.

10.2. Captura de miosina por anticuerpos. Análisis de muestras colectadas durante las infecciones.

10.2.1. **Animales infectados experimentalmente.** Se evaluó la presencia de miosina de parásitos en sobrenadantes obtenidos de manera similar a lo descrito en la sección 7.1.1, mediante su captura con anticuerpos policlonales. Los sobrenadantes utilizados en estos ensayos fueron recuperados de muestras de materia fecal colectadas a intervalos de tiempo diferentes durante infecciones experimentales de teniosis (Ambrosio et al, 1997). Se absorbieron 100 μ l de anticuerpos (10 μ g/ml) de captura a los micropozos y bloqueados, para evitar reactividad inespecífica, con Albúmina sérica bovina al 5%. Se adicionaron 100 μ l de sobrenadantes de materia fecal y posteriormente se agregaron 100 μ l de AcM 4B3-FA (10 μ g/ml). Todas las incubaciones fueron de 2h a 37°C. Para el revelado de la reacción enzimática se utilizaron 20 mg de 4-Nitrofenilfosfato solubilizado en 15 ml de una solución amortiguadora de dietanolamina 1.0 M pH 9.8 y 5 ml de agua destilada como sustrato. Luego, una vez que se desarrolló la reacción colorida a los 5 min. de incubación, se hicieron las mediciones de absorbancia a 405 nm.

10.2.2. **Humano infectado.** De igual manera a lo descrito para la captura de miosina por anticuerpos policlonales y su revelado con los AcM 4B3 y anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa, se analizaron muestras de materia fecal de personas infectadas con tenias de centros hospitalarios para evaluar su contenido de miosina de parásitos adultos. Estos pacientes previamente fueron evaluados clínicamente y su estado de infección fue asegurado por análisis coproparasitológicos específicos.

IV. RESULTADOS.

La evaluación del reconocimiento de los AcM 4B3 por ELISA mostró que ellos reaccionaron específicamente hacia los extractos crudos de *T. solium*, tanto a cisticercos como a las tenias, así como a sobrenadantes de cultivo de éstas últimas y parásitos como *T. taeniaeformis* y *T. saginata*. No hubo reactividad de los anticuerpos hacia los extractos de nemátodos, tremátodos y protozoarios. Con el análisis por IET de *T. solium*, tanto de extractos crudos como de sobrenadantes de cultivo de tenias, se encontró que los AcM 4B3 reaccionaron con una fracción específica de alto peso molecular (400 kDa), en los extractos de cisticercos se encontró que los anticuerpos también reaccionaron con una fracción de menor peso molecular (100 kDa). En los análisis por inmunopunto, de sobrenadantes de cultivo de tenias y de heces recuperadas a diferentes tiempos de infección de los hámsteres, se encontró reactividad positiva por los anticuerpos monoclonales hacia antígenos contenidos en estas muestras. El análisis inmunohistoquímico en tejidos de cisticercos mostró que los AcM 4B3 reaccionaron con las fibras musculares situadas tanto a nivel de pared vesicular, como en el canal espiral invaginado. La distribución de la marca fluorescente, correspondiente a la reactividad de los AcM 4B3 con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón-fluoresceína, se encontró que era diferente dependiendo de la zona observada de los tejidos de los parásitos: Mientras que a nivel de pared vesicular, por debajo de la membrana basal, se observaron fibras musculares largas con distribución longitudinal y otras cortas de distribución azarosa a nivel de tegumento, en el canal espiral se observó que las fibras musculares presentaron una distribución semejante a redes de fibras que se distribuyen a lo largo de la pared interna del parásito invaginado. La distribución de la marca fluorescente se presentó diferente a nivel de las tenias: A nivel de porción cefálica, en las ventosas, la marca se presentó intensa y aglomerada a nivel de las ventosas. En el cuello de los parásitos se observaron largas fibras, mientras que en los proglótidos se observó que la fluorescencia se distribuyó principalmente en los bordes de los mismos y poca fluorescencia se presentó en la región parenquimatosa. El análisis de reactividad por ELISA de los AcM 4B3 hacia miosinas de los parásitos, extraídas en KCl 0.6M, mostró que estos anticuerpos reaccionaron con todas ellas, así como con miosinas comerciales. La reactividad de los AcM 4B3 hacia las miosinas de *T. solium* fue mucho más cuantitativa que hacia

10.2. Captura de miosina por anticuerpos. Análisis de muestras colectadas durante las infecciones.

10.2.1. **Animales infectados experimentalmente.** Se evaluó la presencia de miosina de parásitos en sobrenadantes obtenidos de manera similar a lo descrito en la sección 7.1.1, mediante su captura con anticuerpos policlonales. Los sobrenadantes utilizados en estos ensayos fueron recuperados de muestras de materia fecal colectadas a intervalos de tiempo diferentes durante infecciones experimentales de teniosis (Ambrosio et al, 1997). Se absorbieron 100 μ l anticuerpos (10 μ g/ml) de captura a los micropozos y bloqueados, para evitar reactividad inespecífica, con Albúmina sérica bovina al 5%. Se adicionaron 100 μ l de sobrenadantes de materia fecal y posteriormente se agregaron 100 μ l de AcM 4B3-FA (10 μ g/ml). Todas las incubaciones fueron de 2h a 37°C. Para el revelado de la reacción enzimática se utilizaron 20 mg de 4-Nitrofenilfosfato solubilizado en 15 ml de una solución amortiguadora de dietanolamina 1.0 M pH 9.8 y 5 ml de agua destilada como sustrato. Luego, una vez que se desarrolló la reacción colorida a los 60 min. de incubación, se hicieron las mediciones de absorbancia a 405 nm.

10.2.2. **Humano infectado.** De igual manera a lo descrito para la captura de miosina por anticuerpos policlonales y su revelado con los AcM 4B3 y anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa, se analizaron muestras de materia fecal de personas infectadas con tenias de centros hospitalarios para evaluar su contenido de miosina de parásitos adultos. Estos pacientes previamente fueron evaluados clínicamente y su estado de infección fue asegurado por análisis coproparasitológicos específicos.

IV. RESULTADOS.

La evaluación del reconocimiento de los AcM 4B3 por ELISA mostró que ellos reaccionaron específicamente hacia los extractos crudos de *T. solium*, tanto a cisticercos como a las tenias, así como a sobrenadantes de cultivo de éstas últimas y parásitos como *T. taeniaeformis* y *T. saginata*. No hubo reactividad de los anticuerpos hacia los extractos de nemátodos, tremátodos y protozoarios. Con el análisis por IET de *T. solium*, tanto de extractos crudos como de sobrenadantes de cultivo de tenias, se encontró que los AcM 4B3 reaccionaron con una fracción específica de alto peso molecular (400 kDa), en los extractos de cisticercos se encontró que los anticuerpos también reaccionaron con una fracción de menor peso molecular (100 kDa). En los análisis por inmunopunto, de sobrenadantes de cultivo de tenias y de heces recuperadas a diferentes tiempos de infección de los hámsteres, se encontró reactividad positiva por los anticuerpos monoclonales hacia antígenos contenidos en estas muestras. El análisis inmunohistoquímico en tejidos de cisticercos mostró que los AcM 4B3 reaccionaron con las fibras musculares situadas tanto a nivel de pared vesicular, como en el canal espiral invaginado. La distribución de la marca fluorescente, correspondiente a la reactividad de los AcM 4B3 con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón-fluoresceína, se encontró que era diferente dependiendo de la zona observada de los tejidos de los parásitos: Mientras que a nivel de pared vesicular, por debajo de la membrana basal, se observaron fibras musculares largas con distribución longitudinal y otras cortas de distribución azarosa a nivel de tegumento, en el canal espiral se observó que las fibras musculares presentaron una distribución semejante a redes de fibras que se distribuyen a lo largo de la pared interna del parásito invaginado. La distribución de la marca fluorescente se presentó diferente a nivel de las tenias: A nivel de porción cefálica, en las ventosas, la marca se presentó intensa y aglomerada a nivel de las ventosas. En el cuello de los parásitos se observaron largas fibras, mientras que en los proglótidos se observó que la fluorescencia se distribuyó principalmente en los bordes de los mismos y poca fluorescencia se presentó en la región parenquimatosa. El análisis de reactividad por ELISA de los AcM 4B3 hacia miosinas de los parásitos, extraídas en KCl 0.6M, mostró que estos anticuerpos reaccionaron con todas ellas, así como con miosinas comerciales. La reactividad de los AcM 4B3 hacia las miosinas de *T. solium* fue mucho más cuantitativa que hacia

las comerciales. La evaluación del reconocimiento de anticuerpos anti-paramiosina mostró que ellos reconocieron también a las miosinas de cisticercos, pero no al sobrenadante de cultivo de tenias. La purificación de miosina de estos sobrenadantes y su observación al microscopio electrónico de transmisión, mostró que se trataban de miosinas tipo II convencionales porque presentaron una morfología clásica de estas proteínas: Dos porciones globulares unidas a través de una larga cola filamentosa de tamaño aproximado a los 140 nm. Según análisis por IET, bajo condiciones reductoras a la que se sometió a la miosina purificada, cada una de las porciones globulares correspondió a las cadenas pesadas de aproximadamente 200 kDa, las cuales reaccionaron con los AcM 4B3 (Ambrosio et al, 1997).

1. Evaluación del reconocimiento inmunológico de los AcM a miosina y paramiosina.

Como la cantidad de miosina obtenida de los parásitos no permitía continuar con su caracterización bioquímica, se consideró pertinente intentar su aislamiento con KCl 0.6M como se ha indicado para el aislamiento de estas miosinas en general (Dowben, 1969; Giese, 1973; Barylko et al, 1992), a partir de cisticercos. En la figura 8, carril 5, se muestra el patrón electroforético de la miosina aislada con KCl 0.6M, quien debido a que no presentó la pureza necesaria se le precipitó por disminución de la concentración del KCl 0.6M a 0.04M con lo que se logró una mejor purificación (Fig. 8, carril 4). No fue posible bajo esta estrategia eliminar por completo otras fracciones proteicas de 97 y 43 kDa aproximadamente. El problema de copurificación se repite siempre que se intenta purificar a la miosina bajo esta misma estrategia metodológica. Además, como se podrá ver en la figura 8 (carril 2B) que hay reconocimiento de paramiosina.

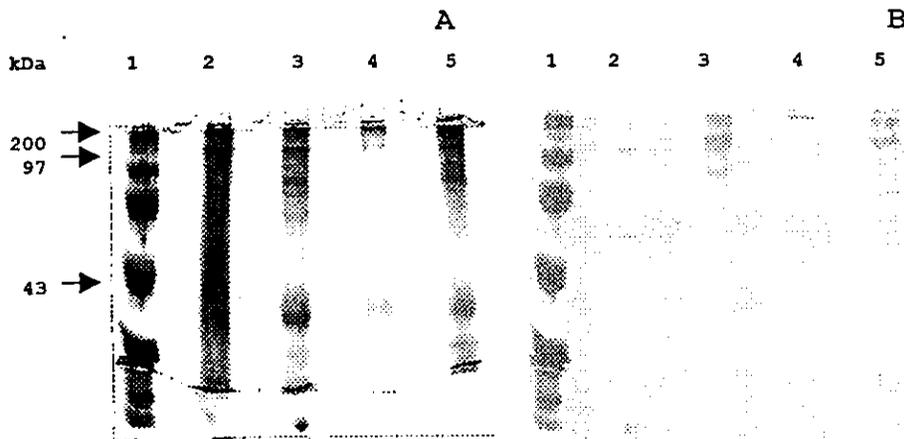


Figura 8. Evaluación de la purificación de miosina de cisticercos y del reconocimiento inmunológico por AcM 4B3. A. Separación electroforética de proteínas (35 µg/pozo) en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras y a 100v, 1h, 4°C). El revelado de las proteínas se hizo por tinción con azul de Coomassie brillante, el exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 10%. B. IET (23 v, 12 h, T. A.) en membrana de PVDF de las proteínas separadas en A. El revelado con anticuerpos se hizo con sobrenadantes de cultivo de hibridoma productor de AcM 4B3, anti-IgG de ratón, 1:1000, DAB y H₂O₂. 1: Pesos moleculares comerciales preteñidos de amplio intervalo, de los cuales sólo se indican a la cadena pesada de miosina (200 kDa), la fosforilasa B (97 kDa) y la ovalbúmina (43 kDa). 2: Extracto crudo total de cisticercos. 3: Extracción de componentes del citoesqueleto con NaCl 0.2M. 4: miosina purificada por su precipitación en KCl 0.04M y 5: miosina extraída en KCl 0.6M. La muestra colocada en el carril 5 es un paso anterior a la mostrada en el carril 4 (Tomado de Reyes, 2000)

Con el propósito de determinar la especificidad del reconocimiento de los AcM 4B3 hacia miosinas purificadas de parásitos, paramiosinas de cisticercos y

miosina comercial de cerdo, se realizó un ELISA (Fig. 9). La paramiosina utilizada en éste y otros estudios fueron proteínas recombinantes (gentilmente donadas por el Dr. J.P. Lacleste, Inst. de Invest. Biomedicas, UNAM). Se utilizó la molécula completa (PM) y la región amino terminal de la misma (PMN). De igual manera, la miosina extraída por KI de amibas fue gentilmente donada por la Dra. Isaura Meza (CINVESTAV, IPN). Como control negativo de ACM se utilizó sobrenadante de cultivo de mieloma Aq8x63 (AG8), con el cual se hizo la fusión para la obtención de los hibridomas. Los resultados mostraron que los anticuerpos reaccionaron con las diferentes miosinas, siendo mayor la reactividad con la miosina obtenida de los cisticercos. Según estos resultados, no hubo reconocimiento cualitativo hacia la miosina comercial y las muestras de paramiosina y en para la miosina de amibas.

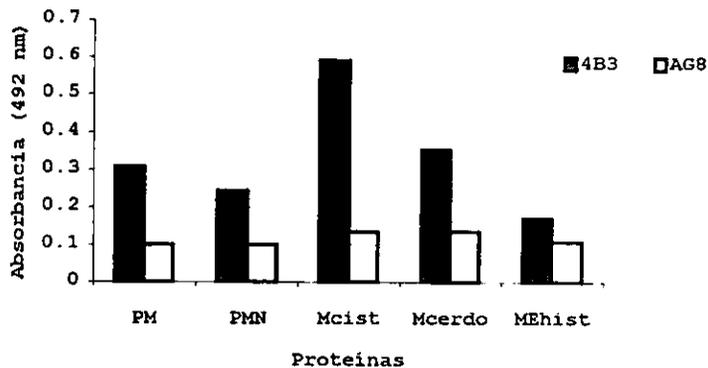


Figura 9. Evaluación por ELISA del reconocimiento de anticuerpos monoclonales anti-miosina 4B3 hacia diferentes proteínas. Sobrenadantes de hibridomas que contienen AcM 4B3 se hicieron reaccionar con paramiosina recombinante (PM), fragmento amino terminal de paramiosina recombinante (PMN), miosina extraída por KCl de cisticercos (Mcist), miosina comercial de cerdo (Mcerdo) y miosina extraída de amibas (MEhist). Concentraciones de los antígenos fueron de 1µg/100µl. Como controles negativos de los ensayos fueron utilizados los sobrenadantes de cultivo de los mielomas (AG8). Todas las reacciones fueron analizadas mediante ELISA, usando anticuerpos anti-IgG de ratón conjugadas a peroxidasa (Tomado de González L, 1998).

Al evaluar por IET el reconocimiento de los AcM 4B3 hacia los tres fragmentos recombinantes de la paramiosina (Fig. 10C), se encontró que ellos reaccionaron débilmente con las porciones amino y carboxilo terminales (Fig. 10C. 1a y 3er tiras de NC de izquierda a derecha). Este débil reconocimiento es semejante al obtenido para las paramiosinas recombinantes (Fig. 9) y los extractos crudos de cisticercos (Ambrosio et al, 1997).

2. Inferencia de la posible secuencia de aminoácidos que podrían estar involucrados en los epítomos de miosina. Debido a que por IP se observó que los AcM 4B3 mantenían el reconocimiento de las miosinas obtenidas de cisticercos (Fig. 8), así como de las sometidas a condiciones desnaturalizantes de proteínas (reducción, urea 8M y calor) (datos no mostrados) y a que, aunque débilmente, los AcM 4B3 reconocían a los fragmentos amino y carboxilo terminal de las paramiosinas recombinantes (de los cuales se conoce su composición exacta de aminoácidos) se hicieron comparaciones de secuencias basadas en lo reportado en los bancos de datos tanto para miosinas como para paramiosina de *T. solium*. Los resultados obtenidos mostraron que existen dentro de las secuencias de los fragmentos de paramiosina varias secuencias homólogas de 4 y 5 aminoácidos (Tabla I) en las

cuales los péptidos son ricos en ácido glutámico. Con el mismo criterio usado para la comparación de las secuencias, se analizaron varias secuencias homó-

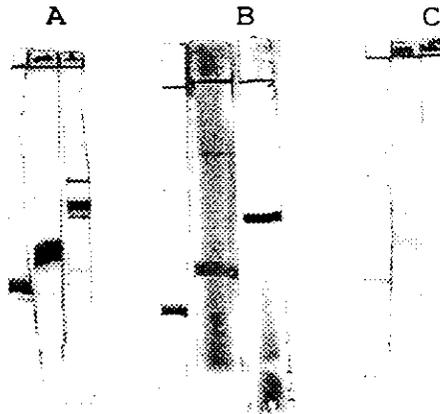


Figura 10. Evaluación por IET del reconocimiento de AcM anti-miosina a fragmentos recombinantes de paramiosina de cisticercos. Una vez producidos los fragmentos recombinantes, estos fueron separados electroforéticamente y transferidos a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con anticuerpos respectivos. Como anticuerpos secundarios se utilizó el anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa y la reacción enzimática se visualizó usando DAB-H₂O₂ como sustrato. **A.** Reacción con sueros hiperinmunes producidos en ratón en contra de este fragmento recombinante. **B.** Reacción con sobrenadantes de un hibridoma productor del AcM 4B3 en reacción inespecífica a miosinas y paramiosina y **C.** Reacción con AcM 4B3. Cada una de las tiras corresponden (de izquierda a derecha), en cada caso, a la porción amino terminal, medi y carboxilo terminal respectivamente (Tomado de González, 1998).

logas que pudieran estar incluidas en miosinas de parásitos y vertebrados. Se encontraron al menos, dos péptidos (EEAEA y RSQLE) homólogos en los fragmentos recombinantes de paramiosina que no presentan homología alguna con todas las miosinas estudiadas lo cual sucedió también con composición de péptidos de 4 aminoácidos (ADMA, DMAE, LEAD, LQTQ). Debido a que no es una miosina, el análisis de la secuencia de la paramiosina de *T. solium* mostró que no contiene regiones relacionadas con la porción globular de la miosina (TXXXFIRCIXPN, LEAFGNAKT, GESGAKT). En la Fig. 6 se comparan los dímeros de miosina y de paramiosina y se puede mostrar que la semejanza entre ambas proteínas se encuentra a nivel de la región filamentosa de las miosinas.

3. Estandarización y medición de la actividad de ATPasa de miosina de *T. solium*. El método de Kodama *et al* (1986) no permitió medir por colorimetría directa la actividad de ATPasa. Por lo tanto se estandarizó un método de 2 pasos: primero, se midió el Pi liberado en un intervalo de 1 a 60 ng como producto liberado de la activación de la ATPasa de miosina y segundo, se estimuló la actividad de ATPasa de las miosinas (comercial y purificada de cisticercos) en presencia de actina. Con esta estrategia se logró reproducibilidad, confiabilidad y estabilidad de los análisis colorimétricos requeridos para los ensayos y además de la sensibilidad del sistema, éste no se vio afectado por el medio de reacción en el que se hicieron los ensayos de ATPasa de miosina (Fig. 12). Cabe mencionar que la decisión de emplear 18 µg de actina comercial para inducir a la actividad enzimática de la miosina, se basó en las indicaciones del fabricante, según el cual se podrían producir 5.4 ng de Pi. Esto se pudo comprobar cuando se hizo la medición con las condiciones de la Fig. 11 en donde se midió exactamente el Pi liberado en el intervalo de 5 a 50 ng gracias al comportamiento lineal y la correlación de los datos obtenidos.

Tabla 1. Comparación de secuencias de aminoácidos de diferentes miosinas y de paramiosina de *T. solium*. Se comparan las secuencias de diferentes miosinas de aminoácidos correspondientes a los genes de las miosinas de los parásitos helmintos principalmente. Las secuencias fueron obtenidas de Perry (1955) y de NFEI, p. 17, que se indican los números de acceso entre paréntesis y el número de repeticiones de la secuencia de la proteína. Se comparan diferentes secuencias de aminoácidos de miosinas ya descritas en el texto y se indica su número de repetición de aminoácidos (Perry, 1955).

Aminoácidos	PM <i>T. sol</i> (L13723) 863 aa	<i>E. hystol</i> (L03534) 2137 aa	<i>S. sucrofa</i> (Z35331) 1254 aa	<i>S. mansoni</i> * (L01634) 1939 aa	<i>C. elegans</i> * (P02566) 1966 aa	<i>O. volvulus</i> * (M74066) 1957 aa	<i>B. malayi</i> * (M7400) 1957 aa
TX ₁ X ₂ X ₃ F IRCIX ₄ P N	----	----	----	----	1	1	1
LEAFGNA KT	----	1	1	1**	1	1	1
GESGAKT	----	1	1	1	1	1	1
EEAEA	2	----	----	----	----	----	----
RSQLE	2	----	----	----	----	----	----
AALE	2	----	----	1	1	----	1
ADMA	2	----	----	----	----	----	----
DMAE	2	----	----	----	----	----	----
EEAE	2	1	1	1	1	2	1
LEAD	2	----	----	----	----	----	----
LSIQ	2	----	----	----	----	----	----
LEVE	2	1	----	----	----	----	----
LEET	2	----	----	----	1	----	----

* Miosinas no analizadas experimentalmente.

** Secuencia de aminoácidos con inserciones diferentes (LEAYGNAKT)⁶⁹

TX₁X₂X₃FIRCIX₄PN: sitio de unión a la actina; en donde X₁:H,N,G,S; X₂:P,A; X₃: H,S; X₄:I,L,F,V.

LEAFGNAKT: péptido conservado entre miosinas y útil para la síntesis de oligonucleótidos.

GESGAKT: sitio catalítico de actividad de ATPasa.

Cuando se evaluó la actividad de ATPasa de miosina comercial, bajo condiciones descritas por Perry (1955), se encontró que conforme transcurría el tiempo de la reacción enzimática, el Pi aumentaba y su liberación máxima se obtuvo hacia los 7 minutos (Fig. 12A) tal y como había sido reportado para la medición de actividad de miosina muscular (Perry, 1955). Luego, cuando se consideró que este tiempo de reactividad era el adecuado para detener la reacción enzimática por adición de ácido tricloroacético, se hicieron mediciones de la actividad de ATPasa en presencia de actina comercial, la cual tuvo que ser previamente estabilizada con falacidina para que se mantuviera como actina F durante el estudio (Fig. 12B).

Según los resultados obtenidos se encontró que la ATPasa de miosina frente a su actina homóloga incrementaba hasta 50 veces su actividad dependiendo de la concentración de actina utilizada (Fig. 12B) con un patrón semejante a una cinética enzimática clásica en la que la posible saturación se alcanzaba hacia los 30 µg de actina. Cuando se hizo la medición de dicha actividad enzimática en presencia de actina purificada de cisticercos (Fig. 13), se encontró que se requería menor cantidad de este tipo de actina (aproximadamente 3µg) para alcanzar tal saturación. Esto indica que la mejor estimulación de la miosina se presenta frente a su actina homóloga ya que requiere menor concentración de la actina para estimular eficientemente a la miosina.

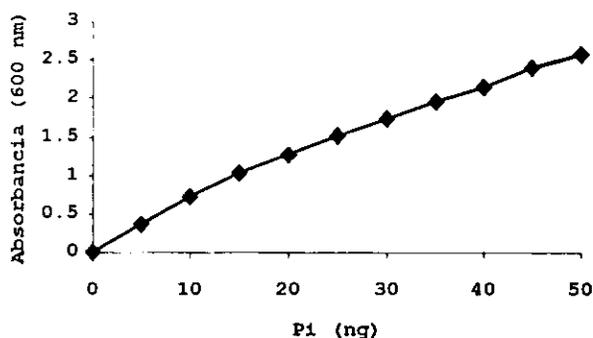


Figura 11. Determinación colorimétrica del fósforo inorgánico liberado. Se preparan curvas de calibración semejantes a la de la gráfica para la evaluación del Pi liberado, para lo cual se incubó el fosfato de potasio monobásico 1 mM en diferentes concentraciones (de 5 a 50 ng) en un verde de salicilato y se detuvo la reacción colorimétrica a los dos minutos con ácido cítrico.

En lo que se refiere a la activación de miosina de cisticercos se encontró que a diferencia de la comercial, tuvo su actividad enzimática entre los 2 y 5 minutos. La determinación de su actividad enzimática a los 5 minutos, en presencia de actina, mostró un patrón de cinética enzimática cuya saturación se alcanzó con 1µg, dos unidades menos que en la miosina comercial y con menor cantidad de Pi producido según estos resultados (Fig. 13B).

En resumen, como lo muestran los resultados, la miosina de cisticercos con su actina homóloga se activa aparentemente más rápido que como lo hace la comercial con su respectiva actina, además de que menores cantidades de actina de cisticercos logran estimular a la miosina comercial. No se logró activar a la miosina de los parásitos cuando se empleó la actina comercial estabilizada por faloidina y como se puede observar en las Figs. 12B, 13A y 13B, la presencia de actina incrementa la actividad enzimática de las miosinas hasta dos órdenes de magnitud mas, que es posible medir con las condiciones de los ensayos.

4. Aislamiento, purificación y evaluación de actina de cisticercos. Según los resultados de evaluación, a través de IP, en relación con la purificación de actina por su extracción salina, se encontró que el empleo de los anticuerpos policlonales anti-actina es eficiente para monitorear todo el proceso de purificación (Datos no mostrados). En estos ensayos también se estableció que los anticuerpos anti-actina podían reconocer por igual a actina comercial y a la purificada de parásitos. Sin embargo, por la reactividad que se encontró para los AcM 4B3 hacia la actina enriquecida, se estimó que había copurificación de miosina durante el proceso y por ello se decidió optimizar la purificación de actina a través de un sistema de filtración en una columna que contenía a Sephadex CL-4B (Fig. 14).

El fraccionamiento inicial con una columna pequeña (1 x 50 cm) demostró que era posible la separación de grupos de fracciones con valores de absorbanza altos a 280 nm y los cuales, según el IP, en alguna de las fracciones había actina libre de miosina. El análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) y tinción negativa de alícuotas obtenidas de las fracciones, mostró que en las fracciones analizadas aparentemente sólo había actina ya que se observaron filamentos largos y delgados y los cuales presumiblemente podrían corresponder a los miofilamentos delgados que contienen a la actina polimerizada (Fig. 15A). Otras observaciones, también por MET, de alícuotas de fracciones positivas tanto a anticuerpos anti-actina

como anti-miosina, mostraron que en estas fracciones se encontraban estructuras filamentosas gruesas de características semejantes a los miofilamentos gruesos que contienen miosina y paramiosina (Fig. 15B). Los miofilamentos gruesos observados muestran disposiciones similares a lo reportado como paracristales de paramiosina (Figs. 15B y C).

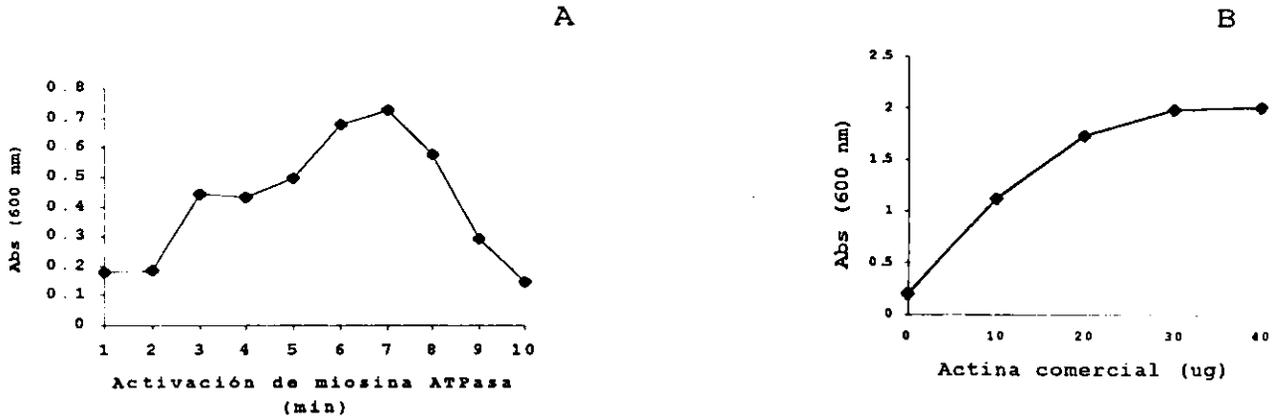


Figura 12. Determinación de la actividad enzimática de miosina comercial. A. A 18 µg de miosina comercial de músculo de cerdo previamente disuelta en solución amortiguadora, se le determinó la cantidad de Pi liberado por la acción enzimática en presencia de ATP y en ausencia de actina. B. Una vez fijados los 7 minutos de máxima reactividad enzimática, se evaluó la actividad de la miosina comercial frente a diferentes concentraciones de su actina homóloga. La cuantificación de Pi para estos estudios se hizo mediante su determinación colorimétrica con el verde de malaquita y de acuerdo con una curva de calibración preparada como en la figura 11. El punto 0 corresponde a la medición de la actividad enzimática en ausencia de actina.

Con la actina identificada y considerando que la proteína ya se encontraba polimerizada, se le utilizó para la estandarización de la medición de actividad de ATPasa de miosinas (ver mas adelante los resultados de la estandarización). De la misma manera, a cada una de las fracciones resultantes de la cromatografía en columna (Fig. 12), empleando a su vez

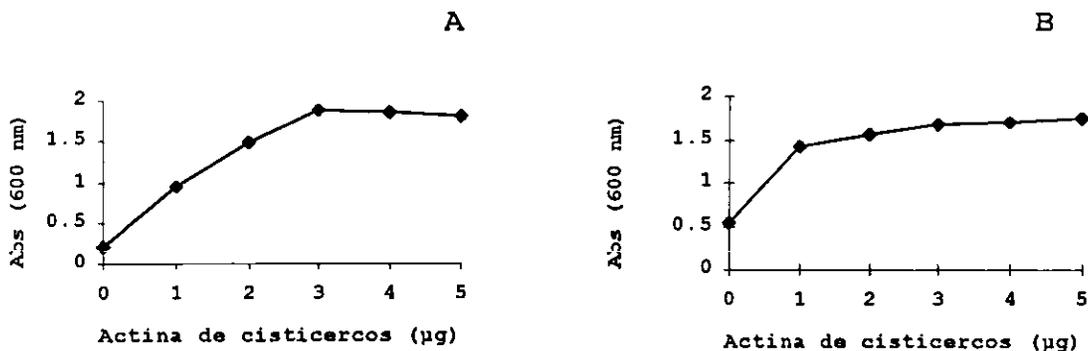


Figura 13. Determinación de la actividad enzimática de miosina comercial y de cisticercos. Se muestran los resultados de las determinaciones de ATPasa de miosina en presencia de actina purificada de cisticercos. A. Miosina comercial y B. Miosina purificada de cisticercos por precipitación en KCl 0.04M evaluada a los 5 minutos de reacción (Fig. 7).

miosina obtenida de parásitos (Fig. 8) y adicionada exógenamente, se le hicieron determinaciones de la actividad de ATPasa. Los resultados obtenidos

mostraron que varias fracciones presentaban actividad enzimática, principalmente aquéllas en las que se había determinado la presencia de actina únicamente (fracciones 13-17). De acuerdo con los criterios de positividad a actina por IET, observación por MET y actividad de ATPasa, se consideró que en las fracciones con estas características se encontraba actina altamente enriquecida y útil para ensayos de caracterización enzimática de la miosina tipo II en estudio.

Como los requerimientos de actina purificada de los parásitos no eran satisfechos con la columna cromatográfica descrita, se buscó obtener mayor rendimiento de la purificación empleando una columna de mayores dimensiones (2.5 x 60cm) ya que se pudo colocar mayor cantidad de muestra para separación (Fig. 15). Los resultados, semejantes a los obtenidos con la columna pequeña, basados en previa calibración de la columna, mostraron que aquellas fracciones próximas al volumen de exclusión del azul dextrán (2000 kDa) eran ricas en actina (70-80 ml), mientras que con los volúmenes de exclusión de los otros marcadores utilizados, se encontró que en ellos no había actina polimerizada ni miosina: Apoferritina (167 ml), Albúmina (192 ml) y Anhidrasa Carbónica (207 ml), según lo que se obtuvo por la evaluación con IP. A pesar de que la actina monomérica (43 kDa) pudo haber sido reconocida por los anticuerpos anti-actina empleados, no hubo positividad de la misma en la región comprendida entre volumen de exclusión de estos dos últimos marcadores (66 y 24 kDa) tal y como se observó para aquellas fracciones situadas en el volumen de exclusión del azul dextrán y ello es un indicativo de que el método de aislamiento de actina en su conjunto favorece el enriquecimiento de la actina polimerizada.

5. Detección de miosina liberada por cisticercos en sobrenadantes de cultivo.

Al igual que los sobrenadantes de cultivo de tenias (Ambrosio et al, 1997), en los de cisticercos mantenidos en cultivo también fue posible la detección de miosina liberada (Fig. 16). Los resultados mostraron que conforme transcurre el tiempo de cultivo, se libera miosina al medio, la cual se incrementa de manera gradual y directamente proporcional al tiempo durante las dos primeras horas y luego se mantiene constante, al menos hasta las 24 horas. La determinación de la actividad de ATPasa, en presencia de actina, y medida en los sobrenadantes de cultivo, se hizo aparente después de una hora de cultivo y alcanzó su máximo hacia las 18 horas. No hubo detección de ATPasa de miosina en el medio de cultivo sin parásitos.

6. Evaluación de la inmunización y reconocimiento de los anticuerpos monoclonales y policlonales.

La inmunización de los conejos con miosina contenida en los geles y mezclada con adyuvante completo o incompleto de Freund, produjo una fuerte respuesta inflamatoria que provocó una reacción de Arthus severa en los sitios en que los conejos fueron inoculados con el antígeno, y se reflejó en la calidad de los anti-sueros obtenidos, ya que, luego de las evaluaciones por ELISA, los títulos mostraron ser elevados, ya que a una dilución de 1:3200 de los anti-sueros, las absorbancias de la reacción contra miosina aún eran de 2. Una vez recuperados y evaluados los anti-sueros anti-miosina nativa (Fig. 17A) se comparó su reconocimiento con la miosina comercial y se encontró que reaccionaron específicamente hacia miosinas de *T. solium*. El reconocimiento hacia estas miosinas se mantuvo aún cuando se hicieron diluciones muy altas de los anti-sueros (1:408000) y sólo a diluciones mayores de 1:102000, se encontró que para las miosinas de cisticercos se mantiene el máximo reconocimiento de los anticuerpos. La miosina comercial se reconoció solamente cuando el anti-suero era usado sin diluir o a muy bajas diluciones de los anti-sueros (hasta 1:800). Hubo una clara diferencia del reconocimiento de las miosinas por los anti-sueros anti-miosina en comparación con la de los anticuerpos monoclonales (Fig. 17B), ya que los sobrenadantes que contenían a los AcM 4B3 no se diluyeron para ser

reconocidas las miosinas de *T. solium* y cuando se hicieron diluciones de hasta 1:8, la reactividad hacia las miosinas empezó a disminuir. Según los resultados de estos ensayos con los sobrenadantes de hibridomas, los AcM 4B3

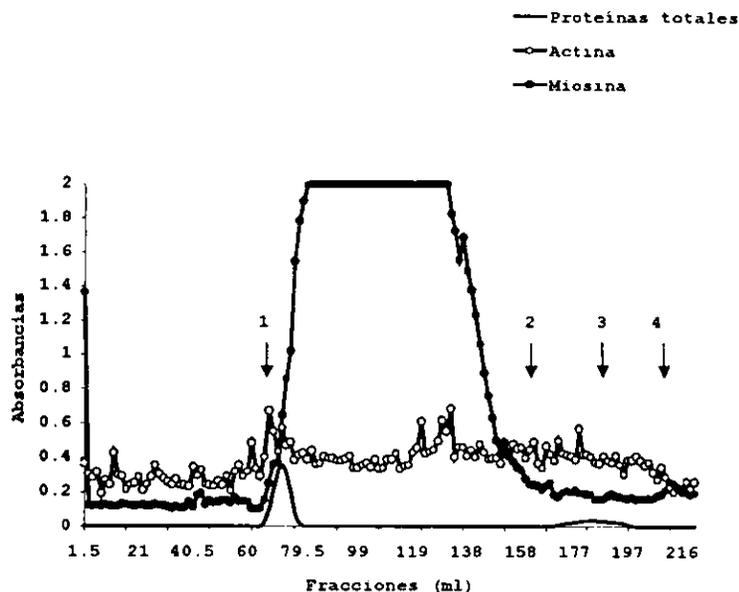


Figura 14. Purificación de actina de metacéstodos de *Taenia solium*. Se aplicó una muestra de extractos salinos de cisticercos previamente neutralizados en TRIS-HCL 1M y se filtró en una columna (2.5 x 60 cm) con gel de Sepharosa CL-4B para 10 que se usó una solución de TRIS-HCL 1M como eluyente. Cada una de las fracciones recuperadas (10 ml/min) se analizó para detectar la presencia de proteínas (línea continua) por su absorbancia a 280 nm de actina (círculos abiertos) y de miosina (círculos cerrados) usando anticuerpos específicos a cada una en ELISA. Cada uno de los marcadores de peso molecular está indicado 1: Azul Dextrán (2000 kDa), 2: Apoferritina (443 kDa), 3: Albúmina sérica bovina (66 kDa) y 4: Anhídrido carbónico (29 kDa) y la flecha en cada caso señala la fracción correspondiente al volumen de exclusión de los mismos.

no presentaron capacidad alguna para discriminar miosinas de cisticercos con las de tenias y prácticamente no reaccionaron con la miosina comercial.

Con la finalidad de emplear los anticuerpos anti-miosina contenidos en los sueros hiperinmunes, se purificaron los anticuerpos por precipitación con sulfato de amonio y por cromatografía de afinidad en Proteína A-Sepharosa. Posteriormente, para evaluar si los anticuerpos purificados seguían manteniendo el reconocimiento hacia las miosinas, se hicieron análisis de IP y se encontró que los anticuerpos no perdieron la capacidad de su reconocimiento (datos no mostrados).

7. Captura de miosina en heces por anticuerpos policlonales. Con la finalidad de evaluar si diferentes concentraciones de miosina purificada de cisticercos y adicionadas a sobrenadantes de materia fecal, podían ser capturadas por los anticuerpos policlonales purificados sin interferencia alguna por la materia fecal y que la cantidad atrapada de la misma tuviera que ver con las cantidades adicionadas exógenamente, diferentes cantidades de miosina purificada se adicionaron a los sobrenadantes y se evaluó la captura tanto en heces de hámster como de humano sanos (Fig. 18). Aunque se encontraron valores altos de reacción inespecífica en las muestras que no contenían miosina exógena (valores de absorbancia alrededor de 0.2 para el hámster y

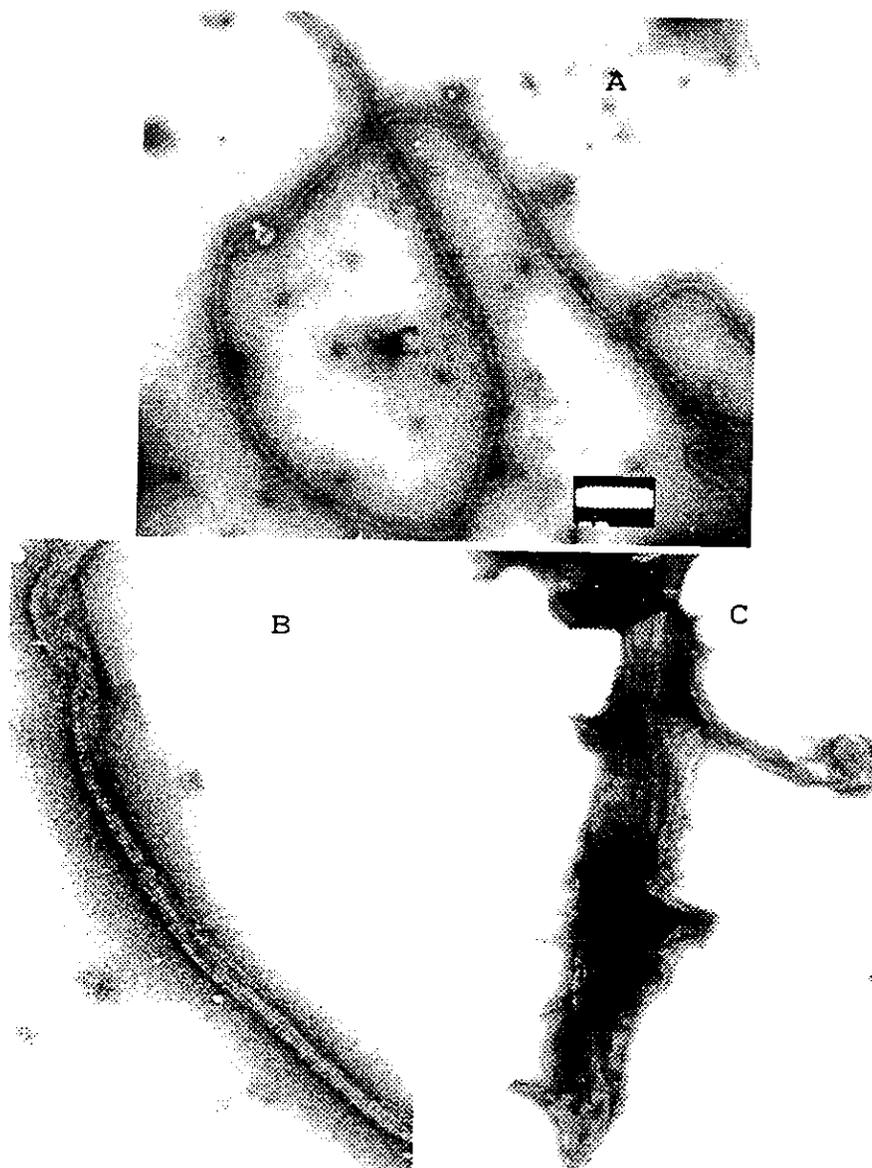


Figura 15. Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión. Fracciones recuperadas de la cromatografía en columna a la que fueron sometidos los micofilamentos de cisticercos de *T. solium* previamente tratados con TRIS-HCl, los cuales fueron observados a 60 keV usando tinción con acetato de uranilo. A. Fracción 63. B. Fracción 75. C. Fracción 89

0.6 para humano en los controles a y b de la Fig. 18 respectivamente), los valores de absorbancia de la miosina capturada estuvieron asociados a la cantidad de la proteína adicionada y con base en estos resultados, aparentemente, los sobrenadantes de materia fecal no interfirieron con la captura de la miosina exógena. De acuerdo con los resultados de tres diferentes ensayos de captura por cada materia fecal, el método podría tener una sensibilidad de hasta 8 ng/ml de miosina adicionada y podría tener la capacidad de detectar menores cantidades de miosina, ya que a las 6 semanas se recuperaron 4 tenias del intestino de un hámster (Fig. 18 A, barra c). De acuerdo con la comparación entre los sobrenadantes de heces de humano sano y de infectado y positivo a tenia (Figura 18B, barra c'), los resultados muestran que el sistema de captura no es eficiente si existen 8 ng/ml de miosina por el fondo inespecífico de reacción que se presenta. Sin embargo, existe la posibilidad de hacer detecciones de miosina cuando ella se encuentre en concentraciones más altas.

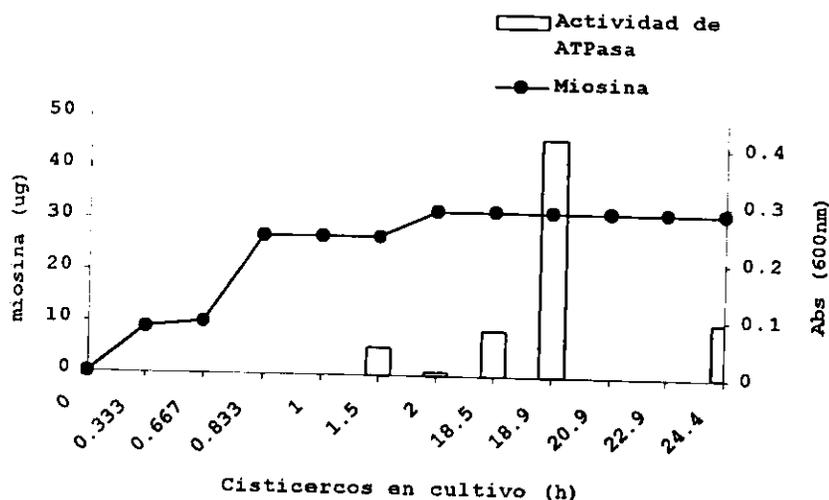


Figura 16: Cinética de aparición de miosina en el sobrenadante de cultivo de cisticercos. Grupos de cisticercos fueron mantenidos en cultivo en RPMI 1640 complementado con HEPES, ajustado a pH 7.4, y mantenidas a 37° durante el tiempo indicado. Una vez que transcurrió cada tiempo, se separaron a los cisticercos del medio y a éste se le determinó la miosina (círculos oscuros) y la actividad de ATPasa de miosina en presencia de actina (barras blancas). La determinación de la actividad de miosina se hizo según un ELISA y la actividad enzimática se hizo por determinación cinética del Pi liberado (Tomado de Reyes, 2000).

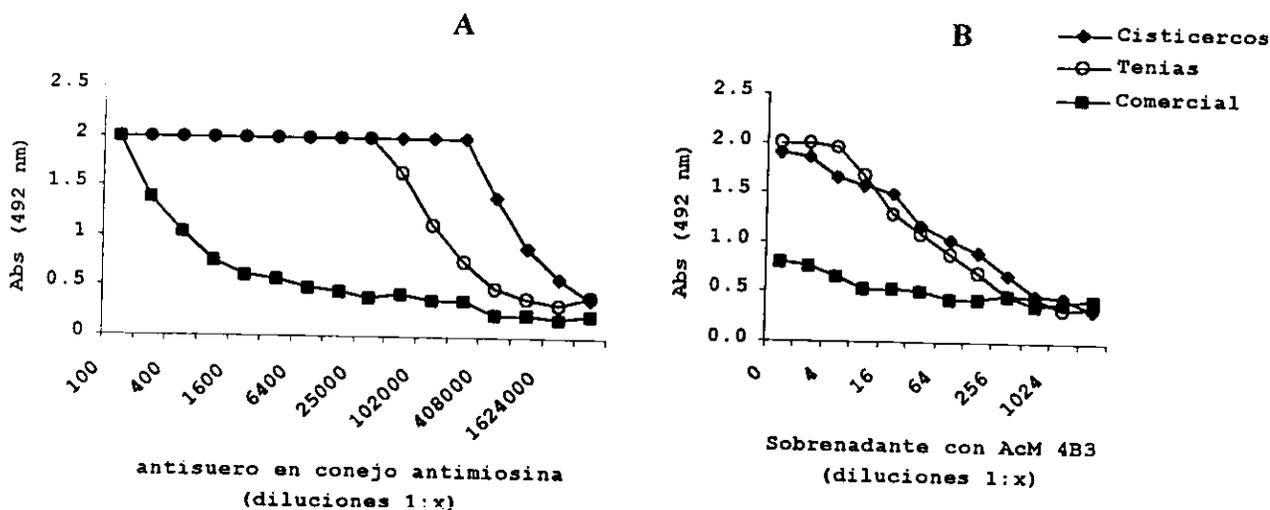


Figura 17. Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos anti-miosina hacia diferentes miosinas. Se incubaron en ELISA miosinas aisladas de cisticercos y de tenias, así como miosina comercial de cerdo con diferentes diluciones de anti-sueros anti-miosina nativa de cisticercos (A) y de sobrenadantes de cultivo de hibridoma productor de AcM 4B3 (B). El revelado de las reacciones se hizo en presencia de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa.

El análisis de la captura de miosina en heces de animales infectados experimentalmente, durante una infección experimental, mostró que a partir de la segunda semana postinfección la concentración de miosina aumentó en este grupo de animales y siempre fue mas alta que la que se detectó en los

RESULTADOS

animales del grupo control. Según los resultados, la miosina capturada se incrementó de acuerdo al tiempo de la infección (Fig. 19) y su detección podría haber estado relacionada con la edad de infección de los animales y con el número de parásitos presentes, ya que a la necropsia en la 6a semana postinfección, 4 de los animales sacrificados estuvieron parasitados con un promedio de 3.75 tenias por animal.

A pesar de que fue posible la captura de miosina adicionada exógenamente a sobrenadantes de materia fecal de humanos sanos (Fig. 18B), cuando se intentó hacer la determinación de la miosina posiblemente liberada por las tenias en sobrenadantes de pacientes positivos a huevos o proglótidos por análisis coproparasitológicos no fue posible diferenciar claramente entre las absorbancias en las muestras de los humanos sanos con los infectados (Datos no mostrados). Incluso se intentó hacer captura de la miosina mediante actina purificada como agente de captura, en lugar de los anticuerpos policlonales purificados, pero siempre se presentó un fondo alto de reacción como se observó en la Figura 18B, el cual no pudo ser eliminado con adsorciones o cambio de enzima para el revelado. Esto no ocurrió con la materia fecal de hámster, ya que se disminuyó el fondo de reacción y gracias a ello se logró evaluar la captura de miosina durante una infección experimental (Figs. 18A y 19).

Fue posible determinar cuantitativamente a la miosina liberada por tenias, por su captura con anticuerpos policlonales, en sobrenadante de animales infectados experimentalmente (Grupo 3). Según los resultados obtenidos, de acuerdo a las semanas post-infección, la cantidad de miosina se estuvo incrementando y siempre se mantuvo por arriba de los valores obtenidos para los animales sin infección (Grupo 1). En el caso de las heces de animales infectados, tratados con praziquantel al día 20 post-infección (Grupo 2), la miosina detectada se incrementó, con respecto al grupo control, luego del tratamiento y lo cual podría ser atribuido al efecto del medicamento en la liberación de miosina desde los parásitos dañados.

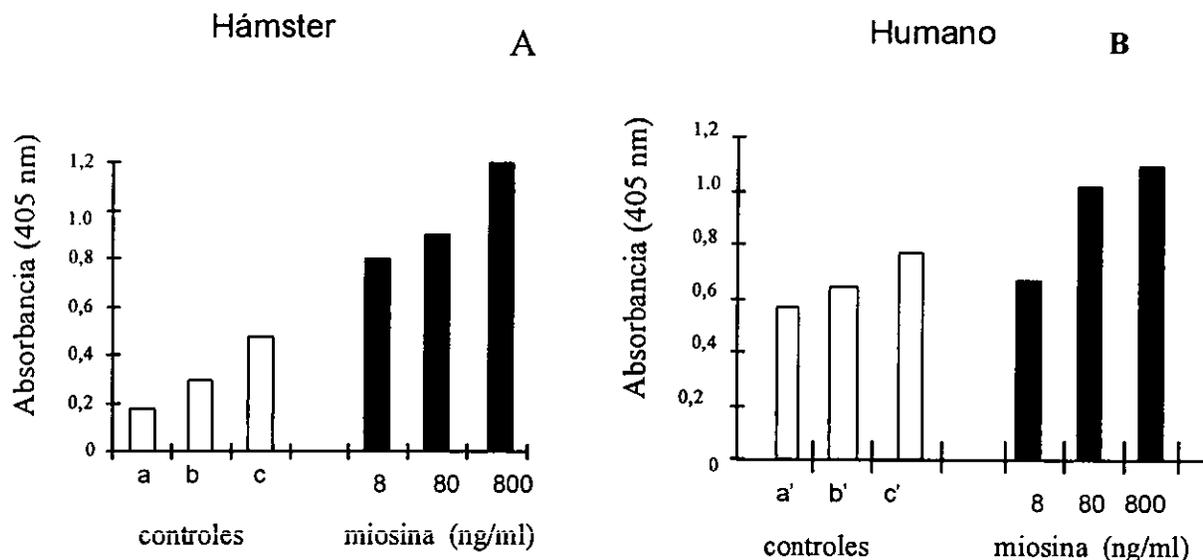


Figura 18. Análisis de la miosina adicionada a heces. Se agregaron diferentes concentraciones de miosina de *T. solium* semipurificada en KCl 0.6 M (8, 80, 800 ng/ml) a sobrenadantes de materia fecal de hámsteres (A) y humano sanos (B). Luego, los sobrenadantes se adicionaron a anticuerpos policlonales anti-miosina purificados adsorbidos. Para el revelado, se usaron los AcM-FA. Las lecturas se hicieron a los 30 minutos. a y a'. Ac. policlonal y AcM-FA, b y b': Ac.policlonal, sobrenadante de heces de hámster y humano no infectados y AcM-FA; c y c'. Sobrenadantes de materia fecal de hámster infectado experimentalmente (6a. semana de infección) y de humano infectado y positivo a tenia (Tomado de Martínez-Guarneros, 1998).

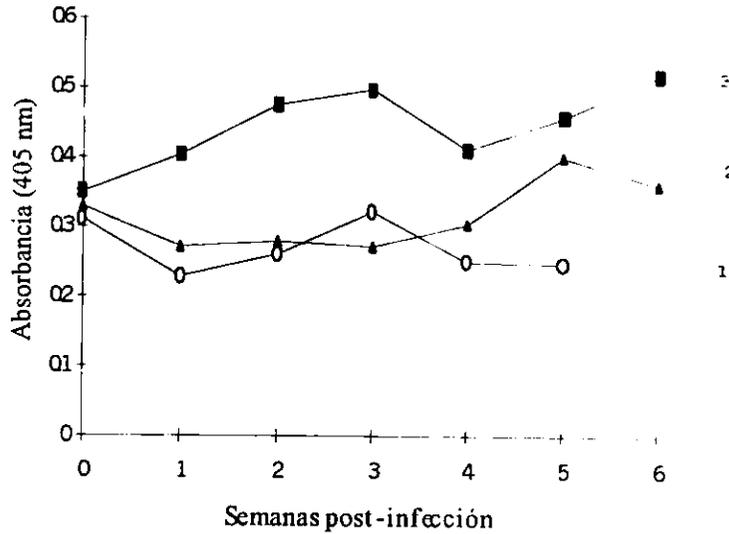


Figura 19: Cinética de aparición de miosina durante la infección experimental. Para la captación de miosina se utilizaron anticuerpos policlonales (10 µg/ml) y para el revelado se usó el A.M.H. conjugado a fosfatasa alcalina (18 µg/ml). Previo a los ensayos los anticuerpos fueron adsorbidos con heces de animales no infectados. La miosina fue capturada de supernatantes de paratubercula solubilizada en SSAF-Tween 20 (100µl). La actividad enzimática (1 h, 37°C) fue determinada por microensayos utilizando 4-Nitrofenilfosfato como sustrato y las lecturas de la reacción fueron leídas a 405 nm. Grupo 1. Animales sin infección (1). Grupo 2. Animales infectados y tratados con praziquantel (2.4 mg/animal) el día 20 post-infección (2). Grupo 3. Animales infectados (3) (Tomado de Martínez-Guarneros, 1998).

V. DISCUSION

Como ya ha sido mencionado en el capítulo de introducción, se conoce la existencia de al menos 15 familias distintas de miosinas, de entre las cuales las miosinas tipo II han sido las mas estudiadas y por ello se conoce mas de ellas (Sellers, Goodson and Wang, 1996). Sin embargo, a pesar del amplio conocimiento, este tipo de proteínas no había sido identificado y caracterizadas en *T. solium* ni en el phylum Eucestoda y por ello la importancia de los estudios presentados aquí. La parte fundamental para la identificación e inicio de la caracterización inmunoquímica de esta miosina, se logró con el empleo de anticuerpos monoclonales preparados en contra de tenias recuperadas de hámsteres infectados. Es posible que al preparar los extractos crudos salinos por homogenización de los parásitos en presencia de KCl 3 M, se hayan enriquecido los extractos con proteínas del citoesqueleto, entre las que predominaron las miosinas y lo cual, cuando se les utilizó como antígenos, propició la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM 4B3) específicos en contra de ellas. Se ha demostrado que el empleo de KI o KCl, en concentraciones mayores de 0.4M, favorece la solubilización de miosinas (Barylko et al, 1992). De hecho cuando se varían de las cantidades de estas sales, en estos intervalos de concentración, se logran separaciones específicas por las diferencias de solubilidad dependientes de su composición molecular (Epstein et al, 1985; Szent-Györgyi, Cohen, Kendrick-Jones, 1971). Otros factores que pudieron haber influido en la obtención de los anticuerpos anti-miosina, además del enriquecimiento de miosinas en los extractos crudos, podrían haber sido la antigenicidad e inmunogenicidad de las mismas, ya que se sabe que a pesar de ser proteínas conservadas entre las especies, son

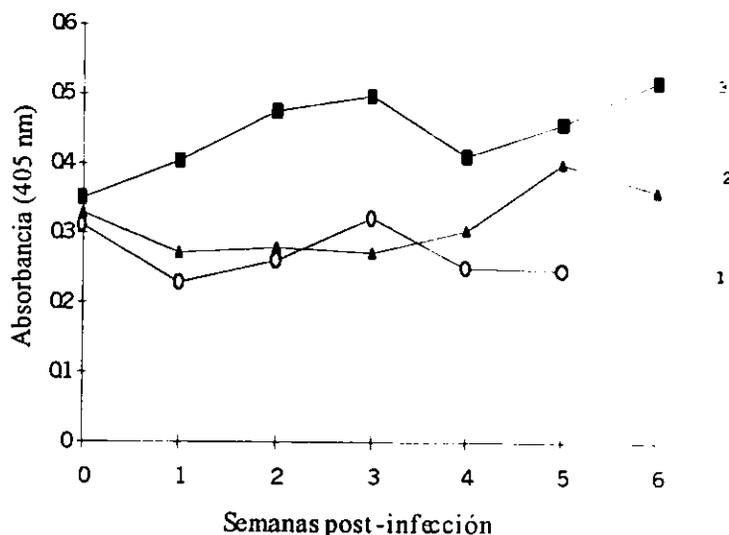


Figura 19: Cinética de aparición de miosina durante la infección experimental. Para la captura de miosina se utilizaron anticuerpos policlonales (10 µg/ml) y para el revelado se usó el A.M. 4B3 conjugado a fosfatasa alcalina (18 µg/ml). Previa a los ensayos los anticuerpos fueron adsorbidos en heces de animales no infectados. La miosina fue capturada de extractos de parásitos fecales solubilizada en SSAF-Tween 20 (100µl). La actividad enzimática (1 h, 37°C) fue determinada por microensayos utilizando 4-Nitrofenilfosfato como sustrato y las lecturas de la reacción fueron leídas a 405 nm. Grupo 1. Animales sin infección (1). Grupo 2. Animales infectados y tratados con praziquantel (2.4 mg/animal) el día 20 post-infección (2). Grupo 3. Animales infectados (3). (Tomado de Martínez-Guarneros, 1998).

V. DISCUSION

Como ya ha sido mencionado en el capítulo de introducción, se conoce la existencia de al menos 15 familias distintas de miosinas, de entre las cuales las miosinas tipo II han sido las más estudiadas y por ello se conoce más de ellas (Sellers, Goodson and Wang, 1996). Sin embargo, a pesar del amplio conocimiento, este tipo de proteínas no había sido identificado y caracterizadas en *T. solium* ni en el phylum Eucestoda y por ello la importancia de los estudios presentados aquí. La parte fundamental para la identificación e inicio de la caracterización inmunoquímica de esta miosina, se logró con el empleo de anticuerpos monoclonales preparados en contra de tenias recuperadas de hámsteres infectados. Es posible que al preparar los extractos crudos salinos por homogenización de los parásitos en presencia de KCl 3 M, se hayan enriquecido los extractos con proteínas del citoesqueleto, entre las que predominaron las miosinas y lo cual, cuando se les utilizó como antígenos, propició la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM 4B3) específicos en contra de ellas. Se ha demostrado que el empleo de KI o KCl, en concentraciones mayores de 0.4M, favorece la solubilización de miosinas (Barylko et al, 1992). De hecho cuando se varían de las cantidades de estas sales, en estos intervalos de concentración, se logran separaciones específicas por las diferencias de solubilidad dependientes de su composición molecular (Epstein et al, 1985; Szent-Györgyi, Cohen, Kendrick-Jones, 1971). Otros factores que pudieron haber influido en la obtención de los anticuerpos anti-miosina, además del enriquecimiento de miosinas en los extractos crudos, podrían haber sido la antigenicidad e inmunogenicidad de las mismas, ya que se sabe que a pesar de ser proteínas conservadas entre las especies, son

altamente antigénicas e inducen la generación de anticuerpos específicos (Murakami and Elzinga, 1992) e incluso por ello se considera que las miosinas podrían funcionar como agentes de vacunación hacia algunos parásitos (Raghavan et al, 1992; Newport et al, 1987). Durante la inmunización de los ratones, varios hibridomas se obtuvieron y de ellos se seleccionaron, para su estudio inmunológico, los que secretaran anticuerpos con mejor reactividad a antígenos de *T. solium* tales como los hibridomas productores de AcM 4B3. Estos hibridomas, hasta la fecha, son estables en la producción de los anticuerpos y en su capacidad de expansión tanto *in vitro* como *in vivo*.

La caracterización inmunológica del reconocimiento de los AcM 4B3 mostró que ellos reconocieron únicamente a miosina tipo II, tanto en extractos crudos, como en tejidos y en productos secretados por los parásitos mantenidos en cultivo *in vitro*. Estos últimos hallazgos serían interesantes de ser estudiados, sobre todo en el ámbito de relación huésped-parásito, ya que no existe explicación alguna de porque la miosina es liberada por las tenias. Una mejor caracterización molecular de estas miosinas, podría permitir su evaluación en su potencial de empleo en el diagnóstico o el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos o inmunopreventivos.

Cuando se estudió la localización de la miosina por los AcM 4B3 se encontraron diferencias entre los cisticercos y las tenias, aunque en los segmentos estudiados de esta últimas no se logró obtener una clara distribución de la proteína. Posiblemente, el problema se debió al grosor de los cortes, ya que en otros parásitos helmintos con cortes mas finos se ha logrado observar una distribución definida de la marca fluorescente (Mair et al, 1998; Walhberg, 1998), en la que incluso se ha encontrado una distribución radial o circular de fibras musculares que contienen actina (Halton et al, 1998). A pesar de ello, se observó que una gran cantidad de miosina se acumuló en las ventosas y en la base del rostelo de las tenias, pero ello no se pudo asociar con lo descrito para *T. solium* mediante tinciones histológicas en cisticercos (Slais, 1970). No se puede descartar que dado que en la porción cefálica de las tenias debe haber mas desarrollo muscular, porque es el sitio con el que se une la tenia al intestino de su huésped, deban estar involucradas la actina y miosina, como ha sido demostrado para la paramiosina (Laclette et al, 1995). En caso de un mejor conocimiento de la distribución de estas proteínas del citoesqueleto, se podrían apoyar las observaciones de microscopía electrónica de barrido, en donde la fortaleza muscular en la región cefálica de las tenias es un factor importante que permite su anclaje eficientemente al epitelio intestinal (Cañedo, Laclette y Morales, 1982). Esto podría ofrecer una explicación de la función biológica de estos órganos de fijación, de manera semejante a lo ya propuesto (Lumsden y Hildreth, 1983, Smyth y McManus, 1989). La distribución de la miosina en el escólex podría estar asociada con los movimientos cefálicos continuos que en el se presentan. De igual manera a los fenómenos de contracción, relajación, extensión y retracción del rostelo y las ventosas, los cuales permitan la adecuada sujeción de los parásitos adultos como se ha visto con infecciones experimentales tempranas (Merchant et al, 1998). Posiblemente, el que exista paramiosina y miosina en la porción cefálica (Laclette et al, 1995; Ambrosio et al, 1997) podría relacionarse con las necesidades de los parásitos de sujetarse con gran fuerza muscular pero con el menor consumo energético. En este sentido, para evaluar el efecto que ambas proteínas podrían tener sobre la estructuración del citoesqueleto en esta región del parásito, podría analizarse la co-localización de ambas proteínas y la evaluación de la actividad de ATPasa, dependiente de actina, de las miosinas frente a paramiosina.

Llama la atención que a nivel de cuello, la miosina se encuentre distribuida en filamentos longitudinales largos y los cuales aparentemente van de la porción cefálica al estróbilo, ya que no existe explicación alguna de la implicación biológica de tal distribución y al respecto no existe antecedente alguno.

Es posible que la miosina esté distribuida en los bordes de los proglótidos por cuestiones relacionadas con su función en el estróbilo. También es posible que los proglótidos tengan una actividad muscular intensa en sus regiones laterales, lo cual les permitiría efectuar movimientos de contracción y expansión frente al ambiente intestinal en el que se encuentran los parásitos y por ello, cabría esperar que la distribución de las proteínas del citoesqueleto sea diferente a lo encontrado en la porción cefálica. Una aproximación, al conocimiento de la dinámica muscular de estas zonas, podría darse con el conocimiento de la distribución espacial de actina y miosina como lo hecho durante los análisis de actina F-faloidina y anticuerpos anti-neurotransmisores marcados fluorescentemente bajo microscopía confocal en parásitos no ténidos (Halton et al, 1998). Con tal conocimiento podría comprenderse como es que se favorece la liberación de proglótidos sin que haya pérdida de la continuidad del estróbilo.

En el caso de los cisticercos, la miosina podría estar asociada a fibras musculares como las descritas en los análisis por tinciones histológicas (Slais, 1970) e incluso, a en las que se identificaron a la paramiosina (Laclette et al, 1987; 1995). Es posible, por lo reportado en moluscos (Cohen, 1982; Szent-Györgyi, Cohen and Kendrick-Jones, 1971) y el nemátodo *C. Elegans* (Epstein et al, 1985) que en las miofibrillas que componen a las fibras musculares puedan coexistir tanto miosina como paramiosina en las que se ha descrito que su porción exterior está constituida de miosina, mientras que en su interior contienen paramiosina.

Aunque en los presentes estudios no se evaluaron ni la distribución ni la actividad de ATPasa de la miosina durante el fenómeno de evaginación, es posible que ellas se encuentren involucradas porque cuando el escólex invaginado se expande, para permitir su evaginación desde la vesícula de los cisticercos, se podrían desencadenar actividad musculares importantes. Por ejemplo, cuando se hacen observaciones al microscopio estereoscópico de los parásitos recién evaginados, ellos mueven continuamente tanto su roseto como sus ventosas como intentando adherirse al sitio ideal en el intestino de su huésped. La colocalización de paramiosina y miosina, así como de actina y miosina podría dar información importante a la respecto de la dinámica muscular que se despliega.

En relación con la determinación de la actividad de ATPasa de la miosina, sobre todo con la obtenida de cisticercos y dado que en la purificación de la misma se encuentra siempre co-purificación de paramiosina, es posible que exista influencia por la presencia de esta última y una de las formas de resolver el problema sería a través de la medición de la actividad de ATPasa en ensayos con miosina purificada y activada por actina frente a paramiosina recombinante. Una evidencia relacionada con la co-purificación de paramiosina y miosina podría ser la que se presentó en la purificación de actina, ya que según la microscopía de transmisión se observaron diferentes tipos de miofilamentos entre los que había delgados (constituidos por actina F únicamente), gruesos (constituidos por miosina y paramiosina) con un patrón semejante a lo descrito en otros organismos ya que algunas de las terminaciones de los miofilamentos eran de forma de punta de lanza (Szent-Györgyi, Cohen y Kendrick-Jones, 1971) y otros, con aparente estructura correspondiente a paracrístales de paramiosina, semejantes a los aislados de moluscos (Szent-

Gyorgyi, Cohen and Kendrick-Jones, 1971). La copurificación de miosina y paramiosina es común cuando se intenta hacer la separación de una o de otra y eso implica que se tenga que dar un paso adicional para separarlas exitosamente (Szent-Györgyi, Cohen and Kendrick-Jones, 1971; Medeiros et al, 1998) y el cual no se llevó a cabo en la presente tesis.

Miosina y paramiosina son proteínas diferentes en lo relacionado con su funcionalidad biológica (Cohen and Parry, 1998), además de que su composición de aminoácidos les confiere una solubilidad diferente, pero a pesar de ello mantienen semejanzas a nivel de su región carboxilo terminal y gracias a lo cual interaccionan y se ensamblan (Cohen and Parry, 1998). Es posible, en el caso de *Taenia solium*, que los AcM 4B3 reaccionen con ambas proteínas en algún sitio de estos y que el mayor reconocimiento a miosinas se deba a que en ellas existan mas epítomos o bien, que la diferencia de hasta un solo aminoácido facilite una mejor interacción de los anticuerpos. En cualesquiera de los casos, los epítomos reconocidos por los AcM 4B3 podrían estar situados dentro o en los alrededores de estos sitios de interacción entre miosina y paramiosina y que se ubica en la región filamentosa de ambas proteínas. Un apoyo al respecto podría ser los resultados de los análisis y la predicción de los epítomos involucrados en el reconocimiento de los AcM 4B3 luego de que se consideró la reacción cruzada de los fragmentos recombinantes de paramiosina y la miosina. Se consideró que si un sitio de reconocimiento por anticuerpos monoclonales está constituido de no mas de 5 a 8 aminoácidos (Kuby, 1997) y de acuerdo con los análisis de los fragmentos de paramiosina (TQ Soft's Web Genetics; <http://www.webgenetics.com>), hubo repeticiones de diferentes péptidos en ambas regiones amino y carboxilo terminales. Luego, bajo restricciones de 5 aa, se encontraron dos péptidos EEAEA y RSQLE, mientras que cuando las restricciones se hicieron con 4 aa, varios péptidos (AALE, EEAE, LQTQ y SOLT) se encontraron. Solo el péptido EEAE se presentó con dos repeticiones en el carboxilo terminal. Al comparar las secuencias de los péptidos de 5 aa con todas las miosinas seleccionadas, se encontró que ellas podrían ser los mejores candidatos del reconocimiento de los AcM 4B3, ya que no presentaron homología alguna aunque varias de ellas estuvieran en parásitos helmintos. En relación a la comparación de los péptidos de 5 y 4 aa, al menos 6 de ellos (EEAEA, RSQLE, ADMA, DMAE, LEAD, LQTQ) también podrían ser candidatos de reconocimiento de los AcM 4B3 ya que tampoco tuvieron homología alguna.

Es interesante que uno de los péptidos de 4 aa, EEAE, se ha considerado un dominio importante para el ensamblaje de la paramiosina con la miosina (Cohen y Parry, 1998). Este péptido, a pesar de que se encuentra en varias paramiosinas y miosinas de músculo estriado de vertebrados, no se encuentra en miosinas no musculares de músculo liso ni tampoco de invertebrados. Adicionalmente a la proposición de los péptidos candidatos, los análisis de reconocimiento de miosinas tratadas bajo condiciones desnaturizantes (urea 4 M, β -mercaptoetanol o desnaturización por calor) mostraron que ellos podrían reconocer determinantes antigénicos lineales situados en la porción filamentosa de las miosinas. Las regiones filamentosas se sabe que son resistentes a condiciones semejantes a las que se hicieron en los análisis (Cohen and Parry, 1990). Adicionalmente al hecho de que los epítomos no son conformacionales, están localizados en la región filamentosa y resisten a las condiciones reductoras para mantener los sitios de reconocimiento, se demostró que cuando la miosina interacciona con actina adsorbida a micropozos y luego se revela la interacción con anticuerpos policlonales, los resultados son reproducibles siempre a diferencia de cuando se emplean anticuerpos policlonales como agentes de captura. En este sentido, posiblemente porque la miosina interactúe con la

actina a través de su porción globular (ver esquema de la figura 20), la porción filamentosa presente los epitopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales y esto no se podría dar cuando la captura de miosina se hace a través de los anticuerpos policlonales. El reconocimiento de estos anticuerpos policlonales se haría a través de cualquier región de la miosina y por ello no siempre estarían disponibles los sitios de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales. Posiblemente, una forma de determinar exactamente en que sitio de la molécula de miosina se lleva a cabo la interacción con los AcM 4B3 sería por su análisis por microscopía electrónica como lo hecho para otras miosinas y anticuerpos anti-miosina (Flicker et al, 1985; Kimura et al, 1991).

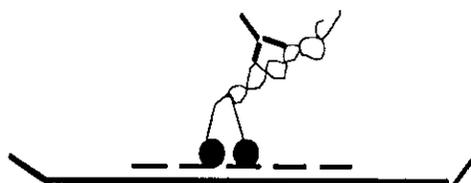


Figura 20 . Esquema de interacción entre actina, miosina y una molécula de AcM 4B3. Cada una de las líneas discontinuas representa a un monómero de actina con el cual se encuentra interaccionando la porción globular de la miosina. La porción filamentosa de la miosina se presenta como una estructura helicoidal a la cual se enlaza una molécula de anticuerpo monoclonal por medio de sus regiones Fab. El plato representa al micropozo de una placa a la cual se ha adherido a los filamentos de actina.

Aunque se demostró que los AcM 4B3 reaccionan con la miosina nativa y sus cadenas pesadas, no se evaluó si los anticuerpos generan algún efecto alguno sobre su actividad enzimática, lo cual sería un indicativo de la alteración de la miosina y de cómo ello podría afectar la interacción con actina. La importancia de determinar si los AcM 4B3 afectan o no la ATPasa de miosina, estaría relacionada con lo que se ha hecho con anticuerpos monoclonales anti-miosina, en donde éstos anticuerpos han sido utilizados como marcadores de la evaluación de la motilidad de la miosina sobre los filamentos de actina y que por ello se ha demostrado que ellos actúan como modificadores de la función biológica (Flicker et al, 1985). La importancia de determinar si los anticuerpos generan alguna alteración, ello podría tener potencial importante con fines terapéuticos en las enfermedades producidas por *T. solium* y que por ello se impulsara la producción de algún tipo de anticuerpo humanizado de uso en inmunoterapia contra cisticercos.

La inducción de anticuerpos policlonales anti-miosina, tanto en animales inmunizados como en animales infectados, se debe a que estas proteínas estructurales son altamente inmunogénicas (Guerra et al, 1982; Flisser et al, 1982; Laclette et al, 1992; Newport et al, 1987; Raghavan et al, 1992). Posiblemente, la interacción miosina-paramiosina tenga cierto grado de responsabilidad, ya que se ha establecido que en el parásito nemátodo *Brugia malayi*, la administración de ambas proteínas genera un componente muy inmunogénico (Schmitz et al, 1996). La inmunogenicidad hacia miosina podría deberse a que los animales tuvieron la capacidad de montar una respuesta de anticuerpos hacia sitios no conservados entre las especies y los cuales también podrían tener una localización a nivel de la región filamentosa de la miosina, ya que se sabe que sitios conservados como las porciones globulares difícilmente desencadenarían una respuesta inmune semejante. Una de las cosas que llamó la atención fue el hecho de que hubo una mayor rapidez de respuesta

en contra de las cadenas pesadas al comparar con la miosina nativa y ello podría deberse a que las cadenas pesadas aisladas exponen mas epitopos y los cuales resultan ser inmunogénicos. Estos epitopos también pueden ser diferentes en cantidad o disposición, tanto en miosinas de cisticercos como en las de tenias, ya que hubo diferencias de reactividad de las miosinas cuando se evaluaron los anticuerpos policlonales anti-miosina a miosinas de diferentes tejidos de un mismo individuo (Murakami, Mehta y Elzinga, 1991). No se descarta la posibilidad de la presencia de isoformas de miosina, las cuales podrían aparecer de un estadio parasitario a otro y que por lo tanto presentarían diferencias en su reconocimiento por anticuerpos. En este sentido, la presencia de isoformas estaría en relación con las necesidades de los parásitos de desarrollar diferentes actividades musculares u otras relacionadas con miosinas como se ha demostrado en el desarrollo natural de ciertos órganos (Kimura et al, 1991; 1995; King et al, 1995). La existencia de isoformas permite que las miosinas tengan diversidad en sus propiedades tales como formación de filamentos pequeños, baja actividad de ATPasa y motilidad disminuida frente a actina. Nuevamente, los cambios asociados a las isoformas se han establecido a nivel de su composición de aa en las porciones carboxilo terminal y las cuales son las causas de los distintos reconocimientos de los anticuerpos (Murakami y Elzinga, 1992). De acuerdo con estas consideraciones, también cabría la posibilidad de encontrar miosinas diferentes no sólo en los diferentes estadios de *T. solium*, sino también en otros ténidos como *T. saginata* o *T. taeniaeformis*.

La posibilidad de encontrar los sitios de diferencias entre las miosinas, tanto a nivel de proteínas como a nivel de genoma, tanto en los diferentes estadios parasitarios como en las diferentes especies, permitiría definir la diferencia de las miosinas tipo II en ténidos y céstodos y la posibilidad de ubicarlos dentro de lo propuesto en el árbol filogenético para miosinas tipo II (Sellers, Goodson and Wan, 1996). En esta clasificación filogenética, las secuencias reportadas para parásitos helmintos como nemátodos y tremátodos se encuentran a la mitad del árbol propuesto, mientras que las de los protozoarios están en el extremo anterior y las de los mamíferos, como el ser humano, se encuentran en el extremo opuesto. Otro tipo de estructuración filogenética, con base en el criterio de parsimonia máxima y basados en la comparación de secuencias de aa de la región globular de las miosinas, también ubican a las miosinas de parásitos nemátodos como *C. elegans* y *O. volvulus* (Goodson and Spudich, 1993) en una región similar del árbol propuesto. Si los criterios de ubicación de las secuencias son correctos, es posible predecir que en cuanto se cuente con las secuencias de las miosinas de los céstodos, éstas podrían encajar en las regiones en que se han situados las secuencias de las miosinas de los parásitos helmintos estudiados.

No sólo podría cobrar importancia desde el punto de vista filogenético el establecer las diferencias entre las miosinas, sino que también ello podría servir para el diagnóstico de las parasitosis por *T. solium* como el hecho de que la miosina sea detectada en sobrenadantes de cultivo y en heces de los animales infectados. En este sentido, otros estudios mas tendrían que llevarse a cabo para determinar la cantidad exacta de miosina detectada, su correspondencia con el grado de infección y la calidad de los anticuerpos por emplear para la identificación y cuantificación de la proteína. Un ejemplo de su utilidad diagnóstica sería lo patentado para enfermedades no infecciosas (Nagai, Kuroo and Kato, 1998; Katoh and Nagai, 1999; Sikorska, Savoie and Desputeau, 1997), lo realizado para la captura de miosina miocárdica (Katoh et al, 1995b) y de miosina vascular aórtica (Katoh et al, 1995a) o lo establecido para criterio de diagnóstico post-mortem en análisis forenses (Pérez-Cárceles et al, 1995). De acuerdo con resultados preliminares de la captura de miosina de *T. solium* por actina, no habría necesidad de usar anticuerpos policlonales ya que con actina purificada o con algún péptido

sintético derivado de ella podría atraparse específicamente a la miosina de los parásitos.

No existe explicación alguna, como para la paramiosina, de cual es la causa ni la forma en que la miosina a pesar de ser una proteína estructural sea liberada por los parásitos, no se descartan efectos por la destrucción tisular y muerte de los parásitos, recambio de su tegumento o liberación de tejidos por el crecimiento del estróbilo. En cualquiera de los casos, su liberación es indicativa de la presencia de los parásitos y que podría verse mas evidente luego de un tratamiento cestocida y ante lo cual, adquiriría potencial terapéutico y diagnóstico. Una forma de conocer, en los parásitos vivos, la salida de la miosina podría consistir en el uso de marcadores fluorescentes como lo que se ha hecho para células de mamíferos (Kolega, 1998).

Uno de los avances importantes en la determinación de la actividad biológica de la miosina fue la determinación de su actividad de ATPasa en presencia de actina de los parásitos, la cual actúa como su activador enzimático (Bray, 1992; Lodish et al, 1999). Como se indicó no hubo activación de la miosina en presencia de actina comercial polimerizada y estabilizada por falacidina, mientras que con la actina de los parásitos se logró una activación de la miosina de hasta 50 veces. Se conoce exactamente la serie de eventos involucrados en la activación de la miosina cuando esta participa en la contracción muscular (Lodish et al, 1999), además de que se ha propuesto que la miosina interactúa específicamente con una isoactina (Herman, 1993; Mounier and Sparrow, 1997) la cual debe presentar una secuencia corta de aminoácidos definido para que se permita la interacción específica de la región globular de las miosinas con un sitio específico en la unión de dos monómeros de actina (Vale and Milligan, 2000), por esas causas de alta especificidad de la interacción actina-miosina ello permite que cada cabeza del dímero de miosina se desplace sobre los filamentos de actina (Walker et al, 2000)

(<http://www.leeds.ac.uk/bms/research/muscle/muscle.html>).

Debido a que la ATPasa de miosina de *T. solium* mostró que solo se activaba en presencia de actina homóloga y la posibilidad de estudiar a esta última una vez aislada, actualmente se han ampliado los estudios para no solamente caracterizar a la miosina sino también a la actina. Esta otra proteína importante del citoesqueleto también mostró aspectos interesantes desde su purificación, ya que el método originalmente propuesto permitía la obtención de la actina despolimerizada de eritrocitos, la actina que se obtuvo de *T. solium* era polimerizada y lo cual podría ser un indicativo de que es diferente al menos de la de eritrocitos.

Si *T. solium* presenta isoactinas diferentes, las cuales interaccionan con sus miosinas, ello motiva a plantearse cual es su localización en los tejidos de los parásitos y cual es su dinámica de asociación con respecto a miosina en los tejidos de los parásitos. Aunque sólo se sabe de la existencia de dos genes de actina, de los que aparentemente uno se expresa (Campos et al, 1990), realmente no hay idea de cuantas isoformas mas podrían existir. En *D. dendriticum*, un cestodo de peces, se han encontrado que 6 se expresan por análisis de hibridización *in situ* de diferente manera en los estadios larvario y adulto (Wahlberg, 1997) y 2 de ellos, son semejantes a los de *T. solium* (Wahlberg and Johnson, 1997), cabría esperar la posibilidad de que estos tuvieran una distribución semejante en *T. solium*. En los parásitos de *D. dendriticum*, según el análisis de la distribución faloidina-rodamina, la actina se distribuye de diferente manera dependiendo de si se trata del estadio de desarrollo y del área de observación (Wahlberg, 1998). Es posible que el aislamiento de actinas de diferentes estadios parasitarios (Reynoso-

Ducoing et al, 2000), así como su análisis bioquímico, permitan encontrar las respuestas. Con la información obtenida se podría definir su semejanza con isoactinas conocidas, lo cual podría ser corroborado a través de su análisis de la región amino terminal, ya que según en este sitio es en donde se presenta la mayor variabilidad de estas proteínas (Herman, 1993; Mounier and Sparrow, 1997). Posteriores análisis de actina purificada por afinidad, la evaluación de su composición a través de geles bidimensionales y su interacción con miosina purificada de los parásitos, aportará nueva información para los parásitos de *T. solium* y tal vez ello permita evaluar su impacto en la relación huésped-parásito.

En resumen, con la serie de conocimientos obtenidos durante la caracterización de la miosina y de la actina, además de lo que se conoce de la paramiosina, existen las posibilidades de generar nuevos conceptos relacionados con el citoesqueleto de *T. solium*. Se podrá determinar su distribución durante el proceso infeccioso, su relación con la infección y todos ellos en conjunto permitirían proponer nuevas estrategias de acción en contra de los parásitos. No sólo se han abierto nuevas expectativas de estudio de tipo inmunológico y bioquímico con las proteínas en estudio, sino que también se sientan las bases funcionales para estudios relacionados con la biología molecular. En lo relativo a la biología celular, se ha dado un gran paso en cuanto a la distribución tisular de las miosinas en estos parásitos. En el momento que se logre combinar el conocimiento obtenido para la actina y la paramiosina, se podrían conocer como es que estas proteínas interaccionan dentro de los parásitos y como se distribuyen durante su desarrollo. Los resultados obtenidos en su conjunto permitirían incrementar el conocimiento de la fisiología de los parásitos y con ello proponer estrategias de su control. De acuerdo con lo obtenido en relación a la distribución de la miosina tipo II en las tenias, esta podría estar asociada al sitio anatómico del huésped infectado y lo cual podría favorecer su sobrevivencia o mantenimiento. Posiblemente, un bloqueo de la actividad biológica de miosina que evite el anclaje al intestino, por la parálisis del parásito sería tan eficiente como la producida por el praziquantel y lo cual permitiría que la respuesta inmune del huésped provoque la muerte o eliminación de los parásitos. En este sentido llama la atención que las tenias parasiten una región anatómica, la cual tiene una constitución muscular de tipo liso. Esto permite que el intestino desarrolle movimientos de contracción y relajación mas lentos a diferencia de que si tuviera músculo esquelético y gracias a lo cual se genera y se mantiene una tensión muscular larga (Lodish et al, 1999). Dado que los sistemas musculares de las tenias son de tipo liso, ello sería una muestra de la adaptación al huésped de los parásitos lo cual les permite su sobrevivencia.

VI. REFERENCIAS

ALLAN JC, AVILA G, GARCIA-NOVAL J, FLISSER A, CRAIG PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. 1990. 101; 473-477.

AMBROSIO J, CRUZ M, ALLAN J, MORAN E, ERSFELD K, FLISSER A. Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*. 1997. 144 (6): 545-553.

AVRAMEAS S, TERNYNCK T. Técnicas inmunoenzimáticas, Grupo Editorial Iberoamericana. México. 1989. Pags. 23-25.

- BARYLKO B, WAGNER M, REIZES O, ALBANESI J. Purification and characterization of a mammalian myosin I. *Proceedings of the Natural Academy of Science, USA*. 1992. 89; 490-494.
- BRAY D. Surface contractions and Myosin in Cell Movements. Garland Publishing, Inc, New York London. 1992. Chapter 8, 107-122.
- 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.
- CAÑEDO L, LACLETTE JP, MORALES E. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In *Cisticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, Willms, Laclette, Larralde, Ridaura y Beltrán Editors. Academic Press. USA. 1982 363-373.
- CARDENAS-RAMIREZ L, ZARAGOZA AM, GONZALEZ DEL PLIEGO M. Neural and excretory structures of *Cysticercus cellulosae*. In *Cisticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, Willms, Laclette, Larralde, Ridaura y Beltrán Editors. Academic Press. USA. 1982. pp. 281-305.
- COHEN C. Matching molecules in the catch mechanism. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 1982. 79: 3176-3178.
- COHEN C, PARRY D. α -Helical coiled coils and bundles: How to design an α -helical protein. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 1990. 7: 1-15.
- COHEN C, PARRY D. A conserved C-Terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *Journal of Structural Biology*. 1998. 122: 180-187.
- CORREA D, SARTI E, TAPIA-ROMERO R, RICO R, ALCANTARA-ANGUIANO I, SALGADO A, VALDEZ L, FLISSER A. Antigens and antibodies in sera from human cases of epilepsy or taeniasis from an area of Mexico where *Taenia solium* cysticercosis is endemic. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 1999 93 (1): 69-74.
- CRAIG PS, McPHERSON CNL, NELSON GS. The identification of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using anti-onchospherical monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986. 35: 152-158.
- DOWBEN RM. General Physiology. A molecular approach. Harper & Row Publishers, Inc. USA. 1969.
- EPSTEIN HF, MILLER III DM, ORTIZ I, BERLINER GC. Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure. *The Journal of Cell Biology*. 1985. 100. 904-915.
- FLICKER PF, PELTZ G, SHEETZ MP, PARHAM P, SPUDICH J. Site-specific inhibition of myosin-mediated motility *in vitro* by monoclonal antibodies. *The Journal of Cell Biology* 1985. 100: 1024-1030.
- FLISSER A, MADRAZO I, DELGADO H. *Cisticercosis Humana*. Ed El Manual Moderno México. 1997. 1-64.
- FLISSER A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In *Progress in Clinical Parasitology*. (ed. Sun, T.). CRC Press, Inc. USA. 1994. 77-116.

- GIESE AC. *Cell Physiology*, 4th edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1973.
- GODING W J. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, Inc. Orlando Florida. 1983.
- GOODSON HV, SPUDICH JA. Molecular evolution of the myosin family: Relationships derived from comparison of aminoacid sequences. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*. 1993. 90: 659-663.
- GONZALEZ L. Análisis del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales que reconocen miosina de *T. solium*. Tesis de Licenciatura (QFB). Escuela de Química, Universidad La Salle. México, DF. Agosto de 1998.
- GUERRA G, FLISSER A, CAÑEDO L y LACLETTE JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present status knowledge and perspectives*. (Eds. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C & BELTRAN F). Academic Press. New York, USA. 1982. 437-451.
- HALTON DW, MAULE AG, MAIR GR, SHAW C. Monogenean neuromusculature: some structural and functional correlates. *International Journal for Parasitology* 1998. 28: 1609-1623.
- HAMES B, RICKWOOD D. *Gel electrophoresis of Proteins*. I.R.L. Press. England Oxford. 1981, pags 31-32.
- HARLOW E, LANE D. *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. (CSH). USA. 1988.
- HEIDCAMP WH. *Cell Biology Laboratory Manual. Tubules and Filaments*. Gustavus Adolphus College, Saint Peter, Minnessota, USA.
<http://www.qac.edu/cgi-bin/user/~cellab/phpl?chpts/chpt9/ex9-9.html>. 1996.
Cap.9. Ejercicio 9.9.
- HERMAN IM. Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* 1993. 5: 48-55
- HIGGINS RC, DAHMUS. Rapid visualización of protein bands in preparative SDS-PAGE gels. *Analytical Biochemistry*. 1979. 93: 257-260.
- HIGHTOWER KE, McCARTY RE. Structural stability of chloroplast coupling factor 1 as determined by differential scanning calorimetry and cold inactivation. *Biochemistry*. 1996. 35: 4852-4857.
- KATOH H, SUZUKI T, HIROI Y, OHTAJI E, SUZUKI S, YAZAKI Y, NAGAI R. Diagnosis of aortic dissection by immunoassay for circulating smooth muscle myosin. *Lancet* 1995a. 345, 191-192.
- KATOH H, SUZUKI T, YOKOMORI K, SUZUKI S, OHTAJI E, WATANABE M, YAZAKI Y, NAGAI R. A novel immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain in serum. *Journal of Immunological Methods*. 1995b. 185, 57-63.
- KATOH H, NAGAI R. Antibody reagent for detecting dissecting aortic aneurysm and uses thereof. US5908757 Patent.
<http://www.patents.ibm.com/details?pn=US5908757>. June 1, 1999
- KIMBER D C. Tejido muscular, fisiología de la contracción, palancas, músculos esqueléticos. En *Manual de Anatomía y fisiología*. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1960 Cap. 7; 125-199.

- KIMURA A, TSUJI T, MATOBA R, FUJITAMI N, OHMORI K, MATSUMURA S. Tissue-specific and non-tissue specific heavy chain isoforms of myosin in the brain as revealed by monoclonal antibodies. *Biochemical and Biophysical Acta. Protein structure and molecular enzymology*. 1991. 1118, 59-69.
- KIMURA A, IKEDA H, YASUDA S, YAMAGUCHI K, TSUJI T. Brain tissue identification based on myosin heavy chain isoforms. *International Journal of Legal Medicine (Germany)*. 1995. 107 (4), 193-196.
- KING L, JIANG MJ, HUANG T, SHEU G. Protease-susceptible sites and properties of fragments of aortic smooth-muscle myosin. *Biochemistry Journal*. 1995. 312, 511-5118.
- KODAMA T, FUKUI K, 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.
- KOLEGA J. Fluorescent analogues of Myosin II for tracking the behavior of different myosin isoforms in living cells. *Journal of Cell Biochemistry*. 1998. 68: 389-401
- KUBY J. Immunology. USA: Ed. WH Freeman and Company. 3rd Ed. 1997: 131-139.
- LACLETTE JP, LANDA A, ARCOS L, WILLMS K. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda) *Molecular and Biochemical Parasitology* 1991. 44, 287-296.
- LACLETTE JP, MERCHANT MT, WILLMS K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* 1987. 76, 121-129.
- LACLETTE JP, ORNELAS Y, MERCHANT MT, WILLMS K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. (Eds. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C & BELTRAN F). *Academic Press*. New York, USA. 1982. 375-387.
- LACLETTE JP, RODRIGUEZ M, LANDA A, ARCOS L, DE ALBA P, MANCILLA R, WILLMS K. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: Role of the antigen B. *Acta Leidensia* 1989. 57 (2): 115-122.
- LACLETTE JP, SHOEMAKER CH B, RICHTER D, ARCOS L, PANTE N, COHEN C, BING D, NICHOLSON-WELLER A. Paramyosin inhibits Complement C1. *The Journal of Immunology* 1992. 148: 124-128.
- LACLETTE JP, SKELLY PJ, MERCHANT MT, SHOEMAKER CH B. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. *Experimental Parasitology* 1995. 81, 140-143.
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J. Cell Motility and Shape I: Microfilaments. Ch. 18 In *Molecular Cell Biology*. 4rd. edn. W.H. Freeman and Company. New York. USA. 1999: 751-845.
- LOWY J, HANSON J. The ultrastructure of invertebrate smooth muscles. *Physiological Reviews*. 1962. 42: 34-47.
- LUMSDEN RD, BYRAM III J. The ultrastructure of cestode muscle. *The Journal of Parasitology*. 1967. 53 (2): 326-342.

LUMSDEN RD, HILDRETH MB. The fine structure of adult tapeworms. In *Biology of the Eucestoda*. Vol.1 (ArmeC, Pappas PW editors). *Academic Press*, New York. 1983 pp190-205

LUMSDEN RD, VOGEL M, SOGANDARES-BERNAL F. The metacestode tegument, fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. In *Cysticercosis: Present states in knowledge and perspectives*. (Eds. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C & BELTRAN F). *Academic Press*. New York, USA. 1982. 307-361.

MAIR GR, MAULE AG, SHAW C, HALTON DW. Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitology Today* 1998. 14 (2); 73-76.

MARAVILLA P, AVILA G, CABRERA V, AGUILAR L, FLISSER A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *Journal of Parasitology* 1998. 84 (5); 882-886.

MARTINEZ-GUARNEROS JA. Detección de miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en fluidos biológicos recuperados de infecciones experimentales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México, D.F. 1998.

McMANUS DP, BRYANT C. Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus*. In *Echinococcus and Hydatid Disease* (Thompson RCA and Lymbery AJ eds). CAB INTERNATIONAL. 1995 Ch 4; 135-181.

MEDEIROS NA, REESE TS, HOWARD J, DEGIORGIS JA, BEARER EL. Primary peptide sequences from squid muscle and optic lobe myosin I: Strategy to identify an organelle myosin. *Cell Biology International*. 1998. 22 (2): 161-173.

MERCHANT MT, AGUILAR L, AVILA G, ROBERT L, FLISSER A and WILLMS K. *Taenia solium*: Description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *Journal of Parasitology* 1998 84(4); 681-685.

MERCHANT MT, CORELLA C, WILLMS K. Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *Journal of Parasitology* 1997 83(3); 363-367.

MOUNIER N, SPARROW JC. Structural comparison of muscle and nonmuscle actins give insights into the evolution of their functional differences. *Journal of Molecular Evolution*. 1997. 44: 89-97.

MURAKAMI N, MEHTA P, ELZINGA M. Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform specific synthetic peptides. *FEBS* . 1991. 278 (1); 23-25.

MURAKAMI N, 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.

NAGAI T, KUROO M, KATO H. Antibody to smooth muscle myosin heavy chains. US5747652 Patent. <http://www.patents.ibm.com/details?pn=US5747652>. May, 5, 1998

NEWPORT GR, HARRISON RA, MCKERROW J, TARR P, KALLESTAD J, AGABIAN N. Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1987. 26, 29-38.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- PEREZ-CARCELES MD, OSUNA E, VIEIRA DN, LUNA A. Usefulness of myosin in the postmortem diagnosis of myocardial damage. *International Journal of Legal Medicine*. 1995. 108: 14-18.
- PERRY SV. Myosin Adenosinetriphosphatase. *Methods in Enzymology*. 1955. 2; 582-588.
- PINDER J, SLEEP J, BENNETT P, GRATZER W. Concentrated tris solutions for the preparation, depolymerization, an assay of actin: Application to erythroid actin. *Analytical Biochemistry* 1995. 225; 291-295.
- RAGHAVAN N, MAINA CV, FITZGERALD PC, TUAN RS, SLATKO BE, OTTESEN EA, NUTMAN TB . Characterization of a muscle-associated antigen from *Wuchereria bancrofti*. *Experimental Parasitology* 1992. 75, 379-389.
- RAMIREZ-BON E, MERCHANT MT, GONZALEZ DEL PLIEGO M, CAÑEDO L. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. (Eds. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C & BELTRAN F). *Academic Press*. New York, USA. 1982. 261-280.
- REYES V. Determinación de miosina liberada por cisticercos de *T. solium*. Tesis de licenciatura (QFB). FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México. Junio del 2000.
- REYNOSO-DUCOING O, CRUZ-RIVERA MY, AMBROSIO J, FLISSER A. Las actinas y su estudio en parásitos. *Boletín de Educación Bioquímica* 2000. 19 (1): 32-35.
- RUEG JC. Muscle. In *Human Physiology*. Schmidt RF, Thews G editors. Springer-Verlag, Berlin. 1989. Chapter 4. pp 62-81.
- SARTI E, SCHANTZ P, PLANCARTE A, WILSON M, GUTIÉRREZ IO, LÓPEZ AS, ROBERTS J and FLISSER A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium*. Taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992 46(6): 677-685.
- SARTI E, FLISSER A, SCHANTZ P, GLEIZER M, LOYA M, PLANCARTE A, AVILA G, ALLAN J, CRAIG P, BRONFMAN M and WIJEYARATNE P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997 56(2); 127-132.
- SCHMITZ KA, HALE TH, RAJAN TV, YATES JA. Localization of paramyosin, myosin and a heat shock protein 70 in larval and adult *Brugia malayi*. *Journal of Parasitology*. 1996. 82 (2): 367-370.
- SELLERS JR, GOODSON HV, WANG F. A myosin family reunion. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1996. 17, 7-22.
- SIKORSKA H, SAVOIE S, DESPUTEAU C. Anti-myosin mouse monoclonal antibody and method of use for diagnosis of myocardial infarction. US5626830 Patent. <http://www.patents.ibm.com/details?pn=US5626830>. May, 6, 1997.
- SLAIS J. The morphology and pathogenicity of the bladder worms. *Academia*. Prague, Czechoslovakia. 1970.
- SLAIS J. Morphology of the scolex of *cysticercus cellulosae* in brain cysticercosis. In *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. (Eds. FLISSER A, WILLMS K, LACLETTE JP, LARRALDE C, RIDAURA C & BELTRAN F). *Academic Press*. New York, USA. 1982. 235-299

SMYTH JD, McMANUS DP. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press Cambridge. 1989.

SZENT-GYORGYI AG, COHEN C, KENDRICK-JONES J. Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles. II. Native filaments: Isolation and Characterization. *Journal of Molecular Biology* 1971. 56; 239-258.

TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 1979. 76, 4350-4354.

UBELAKER JE. Metacestodes: Morphology and Development. In *Biology of the Eucestoda* (Arme C and PW Pappas editors). Academic Press, New York. 1983. Vol I. pp.139-176.

VALE RD, MILLIGAN RA. The way things move: Looking under the hood of Molecular Motor Proteins. *Science*. 2000. 288 (7): 88-95.

WAHLBERG MH. Three main patterns in the expression of six actin genes in the plerocercoid and adult *Diphyllobothrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997. 86; 199-209.

WAHLBERG MH. The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cellular and Tissue Research* 1998. 291; 561-570.

WAHLBERG MH, JOHNSON MS. Isolation and characterization of five actin cDNAs from the cestode *Diphyllobothrium dendriticum*: A phylogenetic study of the multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 1997. 44: 159-168.

WALKER ML, BURGESS SA, SELLERS JR, WANG F, HAMMER III JA, TRINICK J, KNIGHT P. Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*. 2000. 405 (15): 804-807.

WILKINS PP, ALLAN JC, VERASTEGUI M, ACOSTA M, EASON AG, GARCIA HH, GONZALEZ AE, GILMAN RH, TSANG VC. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999. 60:2 199-204.

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 Medical Association of Formosa*. 1933. 32: 166-169.

CONSIDERACIONES A LA PRESENTE TESIS.

Parte de los resultados discutidos en este trabajo han sido publicados (Ambrosio et al, 1997) y presentados en diferentes foros nacionales e internacionales. Actualmente se encuentran en proceso de edición dos manuscritos: uno relacionado con la caracterización de actina y otro con la caracterización inmunológica y bioquímica de miosinas de ténidos. De igual manera, algunos de ellos han formado parte de las tesis de licenciatura de varios estudiantes. Gracias al avance obtenido en los temas involucrados en la tesis doctoral, se ha logrado mantener diferentes apoyos financieros y ello también ha propiciado el desarrollo de nuevos proyectos de doctorado de los cuales uno se encuentra en proceso. Asimismo, dos propuestas de proyectos que fueron originados por los resultados que se presentan aquí, aplicadas para aprobación de apoyo financiero, fueron consideradas con calificación de muy buenas pero no fueron financiadas. Los datos que se mencionan al respecto se encuentran presentados a continuación:

SMYTH JD, McMANUS DP. The physiology and biochemistry of cestodes. *Cambridge University Press Cambridge*. 1989.

SZENT-GYORGYI AG, COHEN C, KENDRICK-JONES J. Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles. II. Native filaments: Isolation and Characterization. *Journal of Molecular Biology* 1971. 56; 239-258.

TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 1979. 76, 4350-4354.

UBELAKER JE. Metacestodes: Morphology and Development. In *Biology of the Eucestoda* (Arme C and PW Pappas editors). *Academic Press, New York*. 1983. Vol I. pp.139-176.

VALE RD, MILLIGAN RA. The way things move: Looking under the hood of Molecular Motor Proteins. *Science*. 2000. 288 (7): 88-95.

WAHLBERG MH. Three main patterns in the expression of six actin genes in the plerocercoid and adult *Diphyllobothrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997. 86; 199-209.

WAHLBERG MH. The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cellular and Tissue Research* 1998. 291; 561-570.

WAHLBERG MH, JOHNSON MS. Isolation and characterization of five actin cDNAs from the cestode *Diphyllobothrium dendriticum*: A phylogenetic study of the multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 1997. 44: 159-168.

WALKER ML, BURGESS SA, SELLERS JR, WANG F, HAMMER III JA, TRINICK J, KNIGHT P. Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*. 2000. 405 (15): 804-807.

WILKINS PP, ALLAN JC, VERASTEGUI M, ACOSTA M, EASON AG, GARCIA HH, GONZALEZ AE, GILMAN RH, TSANG VC. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999. 60:2 199-204.

YOSHINO K. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part III. On the development of cysticercus cellulosae within the definite intermediate host. *Journal of Medical Association of Formosa*. 1933. 32: 166-169.

CONSIDERACIONES A LA PRESENTE TESIS.

Parte de los resultados discutidos en este trabajo han sido publicados (Ambrosio et al, 1997) y presentados en diferentes foros nacionales e internacionales. Actualmente se encuentran en proceso de edición dos manuscritos: uno relacionado con la caracterización de actina y otro con la caracterización inmunoquímica y bioquímica de miosinas de ténidos. De igual manera, algunos de ellos han formado parte de las tesis de licenciatura de varios estudiantes. Gracias al avance obtenido en los temas involucrados en la tesis doctoral, se ha logrado mantener diferentes apoyos financieros y ello también ha propiciado el desarrollo de nuevos proyectos de doctorado de los cuales uno se encuentra en proceso. Asimismo, dos propuestas de proyectos que fueron originados por los resultados que se presentan aquí, aplicadas para aprobación de apoyo financiero, fueron consideradas con calificación de muy buenas pero no fueron financiadas. Los datos que se mencionan al respecto se encuentran presentados a continuación:

CONSIDERACIONES GENERALES A LA PRESENTE TESIS

PUBLICACIONES

Artículo Internacional.

1. **Ambrosio J**, Cruz-Rivera M Y, Allan J, Morán E, Ersfeld L and Flisser A. Partial characterisation of a myosin-like protein of *Taenia solium* parasites. *Parasitology*. 1997. 14 (6): 545-553.

Artículo Nacional.

1. Reynoso Ducoing O, Cruz-Rivera MY, **Ambrosio J** y Flisser A. Las actinas y su estudio en los parásitos. *Boletín de Educación Bioquímica*. 2000. 19(1): 32-35

Capítulo de libro.

1. Sarti E, Flisser A, Correa D, Sotelo J, Escobedo F, Tato P, Proaño J, **Ambrosio J**, Avila G, Plancarte A, De Aluja A, Sciutto E, Lachette JP, Willms K and Alvarez R. Teniasis y Cisticercosis. En Diez Problemas Relevantes de Salud Pública. De la Fuente JR and Sepúlveda J Compiladores. Fondo de Cultura Económica. Colección Biblioteca de la Salud. México, D.F. 1999. Pag. 117-144.

Resúmenes de congresos y cursos.

1. **Ambrosio J**, Cruz M, Morán E, Allan J and Flisser A. Identificación y caracterización parcial de miosina de estadios parasitarios de *Taenia solium*. Resúmenes de trabajos de investigación de la reunión anual de estudiantes de investigación biomédica y de la salud. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. 39 (4, Supl. 1), 22. 1996.
2. Medina Y, Vaughan G, Cruz M, García-Rodea R, **Ambrosio-Hernández J** y Correa-Beltrán D. Anticuerpos monoclonales en el estudio de la relación huésped-parásito y en el diagnóstico de cisticercosis por *Taenia solium*. Resúmenes de trabajos de investigación de la reunión anual de estudiantes de investigación biomédica y de la salud. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. 39 (4, Supl. 1), 48. 1996.
3. Medina Y, Vaughan G, Cruz M, García R, **Ambrosio J** y Correa D. Anticuerpos monoclonales en el estudio de la relación huésped-parásito y en el diagnóstico de cisticercosis por *Taenia solium*. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, Ags. Pag. 27. 1996.
4. **Ambrosio J**, Cruz M, Morán E, Allan J, Craig P and Flisser A. Caracterización parcial de miosina de cisticercos y parásitos adultos de *Taenia solium*. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, Ags. Pag. 26. 1996.
5. Cruz M, **Ambrosio J**, Medina Y, Allan J, Correa D, Craig P and Flisser A. Caracterización de dos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de *Taenia solium*. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, Ags. Pag. 27. 1996.
6. Cruz M, **Ambrosio J**, Allan J, Flisser A. Participación de la miosina de *Taenia solium* en la relación huésped-parásito durante la taeniosis experimental. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, Ags. Pag. 57. 1996.
7. **Ambrosio J**. Caracterización de miosina de *Taenia solium*. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, Ags. Pag. 77. 1996.
8. Flisser A. y **Ambrosio J**. Taeniasis experimental por *Taenia solium* en hámsteres. Estudios inmunológicos y parasitológicos. Proyecto IN209994. Catálogo de Resúmenes 1994. Vol II. Ciencias Biológicas y de la Salud. DGAPA-UNAM. Pag. 149. 1996. ISBN 968-36-4918-1.
9. **Ambrosio J**. Inmunquímica de la Taeniosis. Investigación Multidisciplinaria. UNAM. Campus Cuautitlán. Pags. 200-203. 1996. ISBN 968-36-5450-9.
10. **Ambrosio J**, Cruz M, Morán E, Allan J, Craig P and Flisser A. Identification and characterization of *Taenia solium* myosin. Abstracts of XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Nagasaki, Japan. Pag. 246. November 17-22, 1996.
11. González L, Cruz M, **Ambrosio J**, Flisser A. Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales, producidos contra parásitos adultos de *Taenia solium*, hacia diferentes miosinas. Reunión Anual de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM 1997. 40 (5) Supl 1: 54.
12. Cruz Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Comparación bioquímica e inmunquímica de miosinas de parásitos Taenidos. Reunión Anual de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM 1997. 40 (5) Supl 1: 54.
13. Reynoso Ducoing O, Hernández H, Cruz Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Purificación de actina de parásitos de *Taenia solium* y su uso potencial en la caracterización de miosina de estos parásitos. Reunión Anual de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM 1997. 40 (5) Supl 1: 54.
14. Martínez Guarneros JA, Cruz Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Detección de miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en fluidos biológicos recuperados de infecciones experimentales y naturales. XXII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Oaxaca, Oax. Nov. 15. 1997. *Addendum*

CONSIDERACIONES GENERALES A LA PRESENTE TESIS

15. González L, Cruz M, **Ambrosio J**, Flisser A. Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales, producidos contra parásitos adultos de *Taenia solium*, hacia diferentes miosinas. XXII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Bioquímica y Microbiología Clínica. Oaxaca, Oax. Nov. 15. 1997. *Addendum*.
16. Cruz Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Comparación bioquímica e inmunológica de anticuerpos de parásitos *Taenidos*. XXII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Bioquímica y Microbiología Clínica. Oaxaca, Oax. Nov. 15. 1997. *Addendum*.
17. Reynoso Ducoing O, Hernández H, Cruz Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Distribución de actina de parásitos de *Taenia solium* y su uso potencial en la caracterización de miosina de estos parásitos. XXII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Bioquímica y Microbiología Clínica. Oaxaca, Oax. Nov. 15. 1997. *Addendum*.
18. Martínez JA, Reynoso O, Cruz Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Determinación de miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en materia fecal recuperada de infecciones experimentales y naturales. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Inmunología y Parasitología Mexicana de Inmunología. Xalapa, Veracruz. Marzo 22-25 de 1998. Abstract M-94.
19. Hernández-Sánchez Hugo, Cruz-Rivera Mayra, Reynoso Ducoing Olivia, **Ambrosio Javier**, Flisser Ana. Distribución de actina en metacéstodos de *Taenia solium*. Revista de la Facultad de Medicina. Reunión Anual de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud. 1998 41 (2); 11.
20. **Javier Ambrosio**, Mayra Cruz, Olivia Reynoso Ducoing, Elizabeth Morán, Hugo Hernández, Armando Martínez y Ana Flisser. Actin and Myosin of *Taenia solium* parasites: Purification, Evaluation and Distribution. Program Guide and Abstracts for the 1998 Annual Meeting of The American Society of Parasitologists. Kona, Hawaii. August 16. 1998. Abstract 21.
21. **Ambrosio J**, Cruz Rivera M, González L, Reynoso Ducoing O and Flisser A. Immunochemical and biochemical evaluation of *Taenia solium* type II myosin. International Symposium. Environmental adaptation of *Echinococcus*. Hokkaido University. Sapporo, Hokkaido, Japan. August 18-20. 1998.
22. **Ambrosio J**, Cruz Rivera M, Reynoso Ducoing O, Morán E, Hernández H, Martínez A and Flisser A. Actin and myosin of *Taenia solium* parasites, purification, evaluation, and distribution. Parasitology International. 47 Suppl; 213. August, 1998. Abstracts of the IXth International Congress of Parasitology (ICOFA IX).
23. **Ambrosio J**, Cruz Rivera M, Reynoso Ducoing O, Morán E, Hernández H, Martínez A and Flisser A. Actin and myosin of *Taenia solium* parasites, purification, evaluation and distribution. 1998. Second European Congress on Tropical Medicine. Sept 14-18, Liverpool, UK.
24. Reynoso Ducoing O, Hernández H, Cruz-Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Purificación de actina de *Taenia solium* y su uso potencial en la caracterización de miosina de estos parásitos. Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Parasitología. Octubre 8-10 de 1998. Zacatecas, México.
25. González Malerva L, Cruz-Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales, producidos contra parásitos adultos de *Taenia solium*, hacia diferentes miosinas. Resúmenes del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre 1-6 de 1998. Mérida, Yucatán. Pag 235.
26. Hernández H, Cruz-Rivera M, Reynoso O, **Ambrosio J**, Flisser A. Distribución de actina en metacéstodos de *Taenia solium*. Resúmenes del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre 1-6 de 1998. Mérida, Yucatán. Pag 236.
27. Reynoso Ducoing O, Hernández H, Cruz-Rivera M, **Ambrosio J**, Flisser A. Extracción, purificación y caracterización parcial de actina de metacéstodos de *Taenia solium*. Resúmenes del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre 1-6 de 1998. Mérida, Yucatán. Pag 239.
28. Cruz-Rivera M, Reynoso O, **Ambrosio J**, Flisser A. Comparación bioquímica e inmunológica de miosinas de parásitos tenidos. Resúmenes del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre 1-6 de 1998. Mérida, Yucatán. Pag 241.

TESIS PROFESIONALES.

Licenciatura

1. Cruz Rivera MY. Caracterización de dos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura (Q.F.B.). FES-Cuautitlán. Septiembre de 1995. Asesores: Biol. Yolanda Medina y M en I.B.B. Javier Ambrosio.
2. Martínez Guarneros Armando. Determinación de miosina en infecciones experimentales y naturales por parásitos adultos de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura (Q.F.B.). FES-Cuautitlán. Abril de 1998. Asesor: M en I.B.B. Javier Ambrosio
3. González Malerva Laura. Análisis del reconocimiento dos anticuerpos monoclonales que reconocen miosina de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura (Q.F.B.). Escuela de Química, Universidad La Salle. Agosto de 1998. Asesor: M en I.B.B. Javier Ambrosio
4. Morán Tlaltelpa Elizabeth. Caracterización bioquímica parcial de miosina de parásitos de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura (Q.F.B.). FES-Zaragoza. Enero de 1999. Asesor: M en I.B.B. Javier Ambrosio

5. Reyes Nicolás Víctor. Determinación de la miosina alterada por cisticercos *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Cuernavaca, México, UNAM. Junio del 2000. Asesor: M en I.B.B. Javier Andrés.
6. Correa Hifa David. Determinación de la forma de actina en cisticercos de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Cuernavaca, FES- Cuautitlán, UNAM. Julio del 2000. Asesor: M en I.B.B. Javier Andrés.
7. Hernández Jirón H. Caracterización de la distribución de actina y miosina durante el fenómeno de evaginación en los cisticercos de *T. solium*. Tesis de Licenciatura (O.F.B.). FES-Jaralisco Tepehualpa, Cuernavaca, UNAM. Asesor: M en I.B.B. Javier Andrés, Cotutor M.I.B.B. Javier Andrés.

Doctorado

1. González Mariana Laura. Determinación de puentes de miosina de cisticercos de *Taenia solium* reactivos por anticuerpos monoclonales. Doctorado Unico en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. Agosto del 2000. Tutor Dra. Ana Flisser, Cotutor M.I.B.B. Javier Andrés.

CONFERENCIAS EN CURSOS Y SIMPOSIOS

NACIONALES

1. Purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales. I Curso teórico-práctico de producción de anticuerpos monoclonales. INDRE/SSA. 3-13 noviembre de 1993.
2. Inmunquímica de la Teniosis. X Foro de Investigación Multidisciplinario. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Septiembre de 1996.
3. El sistema de actina-miosina en *Taenia solium*. Seminario del Departamento de Microbiología y Parasitología. Fac. de Medicina, UNAM. Octubre 9 de 1998
4. Caracterización de miosina de *Taenia solium*. Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, Aguascalientes México. Octubre de 1998.
5. La relación huésped-parásito en *Taenia solium*. Curso de Posgrado Biología del Parasitismo I. Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN. Abril 13 de 1998.
6. Mesa Redonda sobre cisticercosis. Festejos del 74° Aniversario de la FES Cuautitlán. FESC UNAM. Abril 24 de 1998.
7. Estudio de proteínas con potencial diagnóstico en la cisticercosis y la teniosis por *Taenia solium*. Mesa redonda. XIII Congreso Nacional de Parasitología. Octubre 10 de 1998.
8. La relación huésped-parásito en *Taenia solium*. Curso de Posgrado Biología del Parasitismo I. Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN. Marzo 23 de 1999.

INTERNACIONALES

1. Purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales. 2o. Taller internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos. INDRE/SSA, Mayo 8 de 1995. México, D.F.
2. Inmunología de la teniosis. 1er. Diplomado Latinoamericano en Parasitología Médica. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM. Agosto 31. 1995. México, D.F.
3. Caracterización de un anticuerpo monoclonal en contra de antígenos de *Taenia solium*. Reunión internacional de cisticercosis y taeniosis. México, D.F. Noviembre 5 de 1995.
4. Coproanticuerpos y anticuerpos monoclonales en teniosis. Encuentro Latinoamericano de cisticercosis y teniosis. XII Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP). Noviembre 18 de 1995. Santiago de Chile.
5. Estudios parasitológicos, inmunquímicos e inmunológicos en la taeniosis experimental por *Taenia solium*. Departamento de Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical. Universidad de los Andes. Noviembre 23 de 1995. SantaFé de Bogotá, Colombia.
6. Caracterización parcial de miosina de *Taenia solium*. 2o. Simposium intenacional "Tania Martínez Flisser" Agosto de 1996. México, D.F.
7. Purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales. 3er. Taller Internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos. Marzo 20 de 1997.
8. Purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales. 4o. Taller Internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos. Febrero 27 de 1998. México, D.F.
9. Actina y Miosina de parásitos de *Taenia solium*. Distribución, Purificación y Evaluación. 1er Foro Iberoamericano del Citoesqueleto. Agosto 5 de 1998. Guanajuato, Gto. México
10. Actin and Myosin of *Taenia solium* Parasites: Purification, Evaluation and Distribution. 1998 Annual Meeting of the American Society of Parasitologists. August 16th. Kona, Hawaii, USA.
11. Research on cysticercosis in UNAM. International Symposium. Environmental adaptation of *Echinococcus*. Hokkaido University. Sapporo, Hokkaido, Japan. August 20. 1998.

- Actin and myosin of *Taenia solium* parasites, purification, evaluation and distribution. 12th International Congress of Parasitology. Makuhari, Chiba, Japan. August 24-28. 1998.
- Myosin purification and localization of actin and myosin in parasites of *Taenia solium*. Department of Immunology, Beckman Center, School of Medicine, Stanford University, Stanford, California, USA. September 4, 1998.
- Actin and Myosin of *Taenia solium* parasites. Purification, evaluation and distribution. Myosin and parasite biochemistry. Second European Congress on Tropical Medicine. Glasgow, UK. 11th September.
- Identificación y marcaje de anticuerpos. V Taller de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y su modificación por Ingeniería Genética. México, D.F. Abril 2000.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS.

1. Financiamiento a proyecto de investigación. Proyecto No. IN209994. DGAPA/UNAM. Julio 1 de 1997- Julio, 1997. Proyecto "Taeniasis experimental por *Taenia solium* en hámster. Métodos inmunológicos y parasitológicos. Responsable: Dra. Ana Flisser. Corresponsable: M. en I.B.B. Javier Ambrosio.
2. Bece de apoyo a proyecto de investigación de doctorado. Proyecto 01230. PADEP. Submisión de Maestrías y Doctorados. Facultad de Medicina, UNAM. Agosto de 1996.
3. Reconocimiento Institucional CONACYT a proyecto propuesto (no financiado) (Caracterización bioquímica e inmunológica de miosina de cisticercos y adultos de *Taenia solium*. Proyecto No. 3354P-N9608. Febrero 14 de 1997.
4. Reconocimiento a proyecto de Investigación "Desarrollo de estrategias biotecnológicas contra el tránsito de *Taenia solium*". Comunidades Europeas CII*-CT94-0081.
5. Bece de apoyo a proyecto de investigación de doctorado. Proyecto 12323. PADEP. Submisión de Maestrías y Doctorados. Facultad de Medicina, UNAM. Mayo 22 de 1997.
6. Financiamiento a proyecto de investigación. Proyecto No. IN200297. DGAPA/UNAM. Julio 1 1997-Junio 1, 2000. Proyecto "Caracterización molecular de miosina de diferentes estadios de *Taenia solium* y sus implicaciones en la relación huésped-parásito. Responsable: Dra. Ana Flisser. Corresponsable: M. en I.B.B. Javier Ambrosio. Agosto 11 de 1997.
7. Financiamiento a proyecto de investigación. Proyecto No. IN203900. DGAPA/UNAM. Agosto 2000-Julio, 2003. Proyecto "Componentes del citoesqueleto de *Taenia solium*: su caracterización molecular, su dinámica de distribución y su interacción en los parásitos. Responsable: Dra. Ana Flisser. Corresponsable: M. en I.B.B. Javier Ambrosio. Octubre 31 del 2000.

Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody

J. AMBROSIO¹*, M. CRUZ-RIVERA¹, J. ALLAN², E. MORÁN¹, K. ERSFELD²
and A. FLISSER¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, 04510 D.F.

²Department of Biological Sciences, University of Salford, Salford M6 4WT, UK

(Received 2 October 1996; revised 21 November 1996; accepted 21 November 1996)

SUMMARY

The host-parasite relationship in taeniosis due to *Taenia solium* is practically unknown. Monoclonal antibodies were prepared against whole extracts of adult *T. solium* parasites and evaluated with tapeworms recovered from experimentally infected hamsters and with cysticerci from naturally infected pigs. With one antibody, mAb 4B3, it was possible to identify, purify and partially characterize a *T. solium* myosin. Some findings indicate that it corresponds to conventional myosin or myosin type II such as: purification with KCl, high molecular weight, size, structure (dimeric protein with globular and long tail portions), reaction with commercial anti-myosin antibodies, distribution in muscle fibres of parasites and cross-reactivity with antibodies against paramyosin from *T. solium* cysticerci. The reaction of the mAb was only with taeniids and not with other parasites. Also myosin was detected in faeces of infected animals and in supernatants of parasite cultures. Its presence in biological fluids may be useful for diagnosis of infected hosts.

Key words: cysticerci, immunofluorescence, myosin, *Taenia solium*, taeniosis, tapeworms

INTRODUCTION

Taenia solium (Cestoda) causes 2 diseases: cysticercosis and taeniosis. The former is a public health problem in many developing countries, while the latter is a benign asymptomatic disease that, although it is the main risk factor for acquiring cysticercosis (Sarti *et al.* 1992), is not considered a public health problem. There are practically no studies of taeniosis probably because the only host is man. A few years ago an experimental model of taeniosis was developed in hamsters (Allan *et al.* 1991) mainly with the purpose of standardizing a better diagnosis of this tapeworm infection by an ELISA for detection of antigen in faeces (Allan *et al.* 1990). This assay resulted in a high sensitivity and a good specificity except that it does not discriminate *T. solium* from *T. saginata*. In order to further increase the specificity we have prepared monoclonal antibodies (mAb) against adult *T. solium*.

Myosin and actin, the classical muscular proteins have not been identified and characterized in cestodes and their role in the host-parasite relationship is

unknown (Smyth & McManus, 1989). There are indirect data from morphological observations which indicate that the distribution of several muscle fibres is related to evagination of cysticerci (Slais, 1982) and to fixation and stabilization of adult parasites to the mucosa in the presence of intestinal movements (Lumsden & Hildreth, 1983). Also, muscle fibres participate in proglottid movement for their release from the host and probably for the release of eggs (Lumsden & Hildreth, 1983; Smyth & McManus, 1989). Here we report the characterization of myosin from *T. solium* identified with mAb 4B3.

Only 1 protein has been thoroughly studied in *T. solium*: Antigen B (AgB) because it is immunodominant in human neurocysticercosis (Flisser, Woodhouse & Larralde, 1980; Guerra *et al.* 1982; Lacleste, Merchant & Willms, 1987). The C terminal portion inhibits complement activity because it binds to C1q (Lacleste *et al.* 1992) and the N terminal induces a strong antibody response (Lacleste, J. P., personal communication). Ag B binds to collagen (Plancarte, Flisser & Larralde, 1983), is apparently secreted (Lacleste *et al.* 1987) and is present on other cestodes (Olivo, Plancarte & Flisser, 1988). Furthermore a great similarity with paramyosin has also been described (Lacleste *et al.* 1991) and, in the present study, cross-reactivity of AgB with mAb 4B3 was found.

* Corresponding author: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Edificio A, 2º. Piso, Ciudad Universitaria, México, 04510 D.F.
Tel: +525 6232467. Fax: +525 6232382.
E-mail: jrah@servidor.unam.mx.

MATERIALS AND METHODS

Experimental model

Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), 10 weeks old of both sexes were treated with 30 mg/kg of praziquantel (Cysticid, Merck) 1 week before they were infected with cysticerci. Animals were maintained with sterilized acid tap water *ad libitum* and fed with commercial rodent balanced food (Nutricubos para animales de laboratorio, Ralston Rations). Infection of animals was performed by oral administration of 5 *T. solium* cysticerci recovered from fresh pork meat. In order to maintain the infection hamsters were immunosuppressed with 2 mg of methyl prednisolone acetate per animal (Depomedrol, UpJohn) administered at days 1 and 15 after infection. At 30 days post-infection hamsters were humanely euthanized with ether and intestinal tapeworms were recovered and used as required. Faeces from non-infected and infected hamsters were collected weekly post-infection and kept frozen until use.

Parasite tissues

Cysticerci were obtained from pigs and adult parasites were recovered from hamsters. Parasites were washed exhaustively with phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS), whole cysticerci, the scolex and some proximal and distal proglottids were covered with an embedding solution (Tissue-Tek Miles Scientific Laboratories), immediately frozen by immersion in liquid nitrogen and stored at -20°C until use. For immunofluorescence studies sections 7–10 μm were obtained in a cryostat (American Optical Corporation) at -20°C .

Parasite extracts

Taenia solium tapeworms and cysticerci as well as adult *T. saginata* worms were washed 5 times with PBS, homogenized with 3 M KCl in a chilled Polytron (Brinkman Instruments), extracted at 4°C with slow stirring and centrifuged at 2000 *g* for 30 min at 4°C . The supernatant was recovered, dialysed against PBS, centrifuged at 24000 *g* for 60 min at 4°C , filtered with a 0.22 μm pore membrane and concentrated under positive pressure with nitrogen (Flisser *et al.* 1975; Allan *et al.* 1990). Protein concentration in each extract was measured (BioRad Protein Assay) and antigens were kept in aliquots at -20°C until use. Protease inhibitors (1.1 mM *p*-hydroxymercuribenzoate, 3.4 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 2.5 mM ethylenediaminomethane tetraacetic acid, EDTA) were added to extracts during preparation. Crude parasite extracts of adults of *T. saginata*, *Fasciola hepatica*, *Macracanthorynchus hirudinaceus* and *Ascaris suum* were

obtained from G. Avila, UNAM, México following the method described for cysticerci as well as for the extracts from *T. taeniaeformis* cysticerci and adults that were obtained from A. Plancarte, UNAM, México. Parasite extracts from *Trichinella spiralis* were obtained from D. Correa, INDRE, México and *Leishmania mexicana* parasites were obtained from E. Melendro, UNAM, México.

Excretion/secretion antigens from adult parasites

Fresh *T. solium* adults were washed 5 times with sterile PBS mixed with a diluted antibiotic-antimycotic solution (Gibco) and kept *in vitro* using RPMI 1640 medium (Gibco) supplied with HEPES buffer (0.2%), glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM) and sodium bicarbonate (0.007%) during 2 days under standard conditions (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 and 95% relative humidity). Afterwards culture medium was removed and concentrated ($\times 10$) under positive pressure, the protein concentration was measured and the solution was kept at -20°C in aliquots. Excretion/secretion (ES) from *T. solium* cysticerci were obtained from D. Correa, INDRE, México.

Myosin isolation

Parasite extracts and ES were processed in order to obtain semi-purified myosin (Dowben, 1969; Giese, 1973). Extracts were mixed with 0.2 M NaCl, homogenized and centrifuged (12000 *g*) during 30 min at 4°C . Pellets were recovered in ice in 0.6 M KCl, pH 6.5 and centrifuged as above. Supernatants were recovered and used as the myosin solution. To obtain myosin from ES, culture medium was mixed with 0.6 M KCl and centrifuged as above. Protein concentration was determined and myosin solutions were kept at -20°C in aliquots.

Myosin antigenic analysis

The specificity of myosin was tested in ELISA using the myosins obtained from ES products and extracts of *T. solium* and from *T. saginata* adults as well as one commercial myosin from porcine muscle (Sigma). Three different antibodies were used: mAb 4B3 which was produced against *T. solium* adults (see below), a polyclonal antibody against *T. solium* AgB donated by A. Landa, UNAM, México and a commercial anti-myosin (smooth and skeletal muscle from bovines) antiserum produced in rabbits (Sigma).

Myosin structure

Electron transmission microscopy was performed with purified filaments of myosin. For this, semi-purified myosin was mixed with a low salt buffer

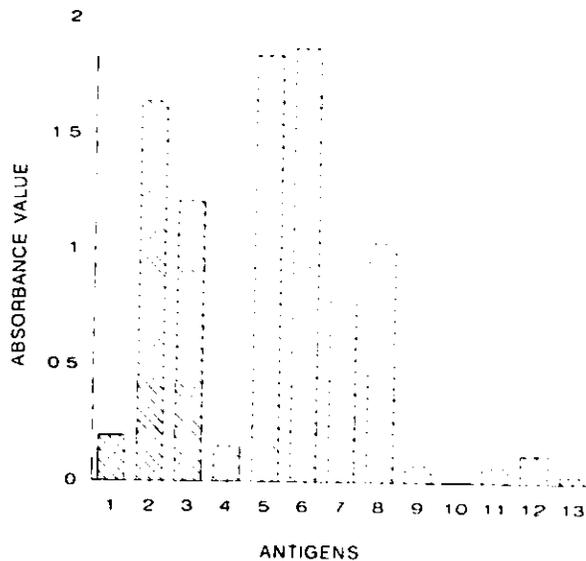


Fig. 1. Specificity of mAb 4B3 for several parasite antigens as tested by ELISA. *Taenia solium* cysticerci (1), tapeworms obtained from humans (2) and from infected hamsters (3), ES of cysticerci (4) and tapeworms (5), *T. saginata* adults (6), *T. taeniaeformis* cysticerci (7) and adults (8), *Fasciola hepatica* (9), *Trichinella spiralis* (10), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (11), *Ascaris suum* (12) and *Leishmania mexicana* (13). Antigens were adsorbed to ELISA plates and incubated with the supernatant of cultured hybridoma 4B3. Reactions were developed with anti-mouse IgG coupled to peroxidase, OPD and H_2O_2 . Absorbance values were obtained at 492 nm.

solution (2-mercaptoethanol, EDTA and distilled water), extracted overnight at 4 °C and centrifuged in an Eppendorf microfuge at 13000 g for 30 min at 4 °C (Hermanson, Laframboise & Daood, 1991). The pellet containing purified myosin filaments was dissolved in 50 μ l of PBS and an aliquot was stained with 1% uranyl acetate on a copper support (300 mesh) previously treated with Formvar membrane and evaporated charcoal and observed in an electron transmission microscope (JEOL JEM-1200 EXII) at $\times 40000$ –60000 using 100 kV.

Monoclonal antibodies against adult *T. solium*

Monoclonal antibodies were prepared according to Goding (1983), Harlow & Lane (1988) and Craig, MacPherson & Nelson (1986) with minor modifications. Balb/c mice were immunized i.p. with 0.2 mg of an adult *T. solium* extract obtained from hamsters using Freund's complete (once) and incomplete (twice) adjuvant (Sigma) and a final intravenous booster with the extract. After 4 immunizations (10–14 day intervals) spleen cells were removed and fused with murine myeloma cells (X63/Ag8.653) using polyethylene glycol 4000 (Gibco). Optimum I culture medium (Gibco) complemented with 5% inactivated foetal bovine serum (FBS, Gibco), 1%

antibiotics (streptomycin/penicillin 1000000 I.U.), 2 mM L-glutamine, 0.0045 mM azaserine, 0.075 mM hypoxanthine (HAT medium) were used to culture cells for 3 weeks under standard conditions (37 °C, 95% relative humidity and 7% CO_2). Surviving cells were cultured for 2 more weeks in the same complemented medium but without azaserine. Afterwards, the supernatant was recovered and tested by ELISA as described below. Cells of selected wells were cloned by limiting dilution and maintained in Optimum medium complemented with 5% FBS and 1% antibiotics. Cells were stored frozen in liquid nitrogen. All further assays were performed with culture supernatants as source of mAb.

Characterization of mAb 4B3

mAb 4B3 was selected because of its high recognition of adult *T. solium* antigens. Immunoglobulin (Ig) class and subclass were determined by ELISA using Immulon IV immunoplates (Dynatech Laboratories), culture supernatants were used as antigen, PBS-Tween 20 as blocking agent and several commercial anti-mouse Ig antibodies conjugated with peroxidase (1:500, Sigma). Reactions were developed with 5-aminosalicylic acid (Sigma) and 0.005% (v/v) H_2O_2 . Absorbance values were obtained at 450 nm after 25 min.

Specificity of mAb 4B3

ELISA was performed with antigenic extracts obtained from *T. saginata*, *T. taeniaeformis*, *F. hepatica*, *T. spiralis*, *M. hirudinaceus* and *A. suum* at 25 mg/ml and, in the case of *L. mexicana*, with 10 million parasites/ml which were adsorbed to Maxisorb (Nunc) plates overnight. Plates were blocked with 3% commercial unfatted milk (Sveltys) in PBS-Tween 0.3%, washed 3 times with PBS-Tween, incubated with mAb supernatants for 1 h at room temperature, washed again, incubated for 1 h with a commercial anti-mouse Ig antibody conjugated with peroxidase (1:500), washed and developed with substrate solution (0.4 mg/ml) o-phenylenediamine (OPD, Sigma) diluted in citrate buffer with 30% (v/v) H_2O_2 . Reaction was stopped with 2 M sulfuric acid after 5 min and absorbance values were measured at 492 nm.

Antigens recognized by mAb 4B3

Antigen characterization was performed by Western blot. *T. solium* extracts were separated by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels (5 and 10%) under reduced or non-reduced conditions (Mighty Small SE250, Hoeffer) during 2 h at 100 V as described (Harlow & Lane, 1988). The gel was transferred to nitrocellulose membrane (NCM)

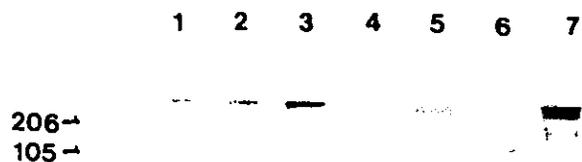


Fig. 2. Western blot characterization of *Taenia solium* parasite antigens by mAb 4B3. Whole extracts of adults recovered from humans (1, 2, 3), ES of adults from hamsters (4, 5) and extracts of cysticerci (6, 7) were fractionated using 10% SDS-PAGE gels under non-reduced (odd lanes) or reduced (even lanes) conditions. Western blot was performed on NCM and developed using antibodies as described for ELISA with diaminobenzidine as substrate. High range pre-stained protein molecular weight standards were used (the 2 highest bands are indicated).

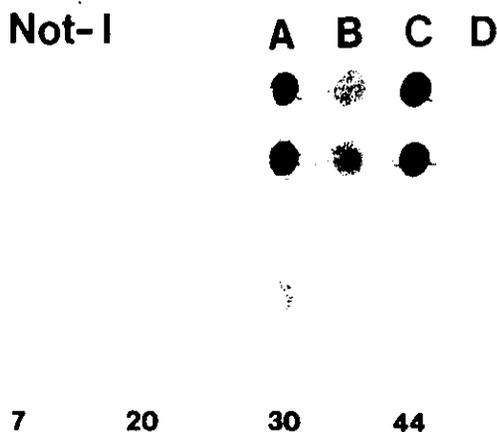


Fig. 3. Detection of secreted faecal antigens by mAb 4B3. Faecal supernatants corresponding to days 7, 14, 20, 27, 30, 39, 44 and 50 post-infection from infected and from non-infected hamsters (Not-1) were analysed by dot blot. As positive controls, extracts of tapeworms from humans (A), hamsters (B), ES from adults (C) and cysticerci (D) were used. Antibodies and substrates were used as in ELISA.

(Schleicher & Schuell, 0.2 µm, Hoeffler transfer equipment) at 100 V for 1 h according to the method described by Towbin, Staehelin & Gordon (1979), with recommended modifications (Harlow & Lane, 1988). High range pre-stained molecular weight

for the ELISA described above but the substrate used was 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) solution (0.5 mg/ml) with 30% (v/v) H₂O₂. After 5 min incubation the reaction was stopped.

Detection of selected antigens with mAb 4B3

Dot blot assays were performed according to Charcampa *et al.* (1992). ES and faeces from infected and non-infected hamsters were used as samples (5-10 µl) and adsorbed to NCM using a dot apparatus (BioRad). Faeces were treated with PBS 0.3% Tween as described by Allan *et al.* (1990) for the ELISA for coproantigen detection. Non-specific reaction between secondary antibody and faecal samples was eliminated by adsorption of non-infected hamster faecal supernatants with conjugated anti-mouse IgG (3 times). Antigen samples adsorbed to NCM were processed as described for ELISA but using shorter incubation times (30 min).

Immunohistochemical recognition of parasite tissue

Immunofluorescence assays were performed following similar steps to the ELISA. Sections were blocked with PBS-unfatted milk, incubated in a humid chamber with mAb for 1 h, washed and further incubated with anti-mouse IgG coupled to fluorescein isothiocyanate (IgG-FITC, 1:50, Sigma) in the presence of Evan's blue (1:5000) as a counterstain. Observations were made in an epifluorescence microscope (Nikon) using ×10, 40, 60 and 100 objectives and filters with a range between 490 and 517 nm. All observations were registered on colour film (Fujicolor) ASA 1600.

RESULTS

The mAb 4B3 was IgG1 that recognized antigens from *T. solium* ES, cysticerci and adults, *T. saginata* and *T. taeniaeformis* but not with trematodes such as *F. hepatica*, nematodes such as *T. spiralis*, *M. hirudinaceus* and *A. suum* or the protozoan parasite *L. mexicana* (Fig. 1). Recognition by Western blot or mAb 4B3 of antigens from adult, cysticerci and ES from *T. solium* showed that mAb reacted mainly with 2 bands, one above 206 kDa and a thin band at 105 kDa. Recognition did not change in reduced or non-reduced conditions (Fig. 2). Faecal supernatants from infected hamsters also reacted with mAb 4B3 (Fig. 3). Immunohistochemical results are shown in Figs 4 and 5. In a low magnification of a cysticercus section, fluorescence was located mainly in the bladder wall and in the spiral canal (Fig. 4A) while at high magnification muscle fibres located in the spiral canal with an ordered distribution of muscle fibres (Fig. 4B) and below the tegumental surface in

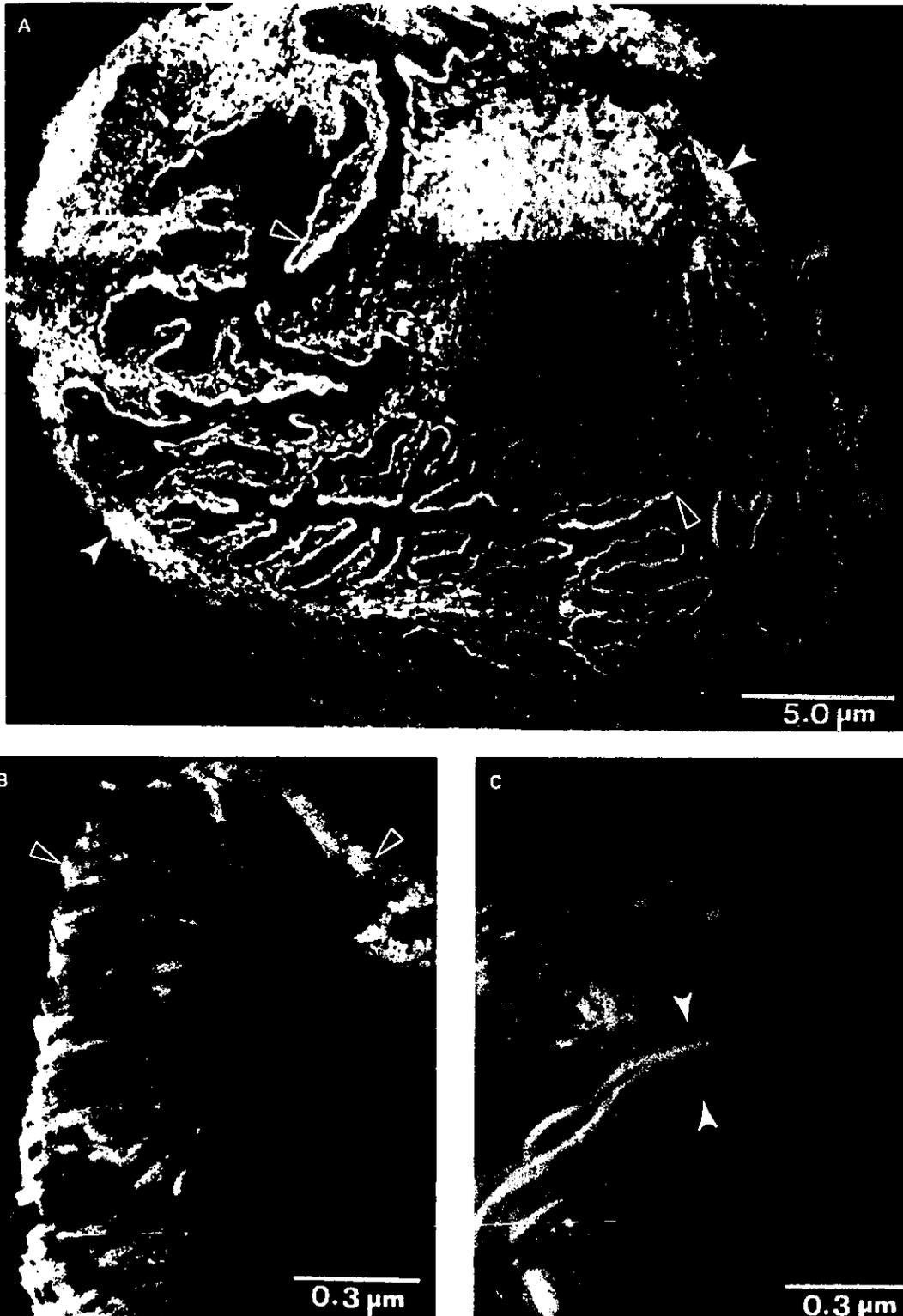


Fig. 4. Recognition of mAb 4B3 to parasite tissue. (A) Photographic composition in order to show a whole section of a cysticercus. Intense stain is seen in the spiral canal (black arrows with white border) and in the cysticercus tissue (white arrows). (B) Closer observation of the spiral canal (black arrows with white border). (C) Closer observation of the vesicular bladder wall (white arrows). The intense stain is specific for the mAb and the pale diffuse stain corresponds to background tissue.

distribution (Fig. 4C). In the adult parasite fluorescence was intense in the suckers where a random distribution of aggregated fluorescence was seen

(Fig. 5A and B); in the neck fluorescence was located in long filaments that apparently connect the scolex to strobila (Fig. 5C) and intense stain was also seen

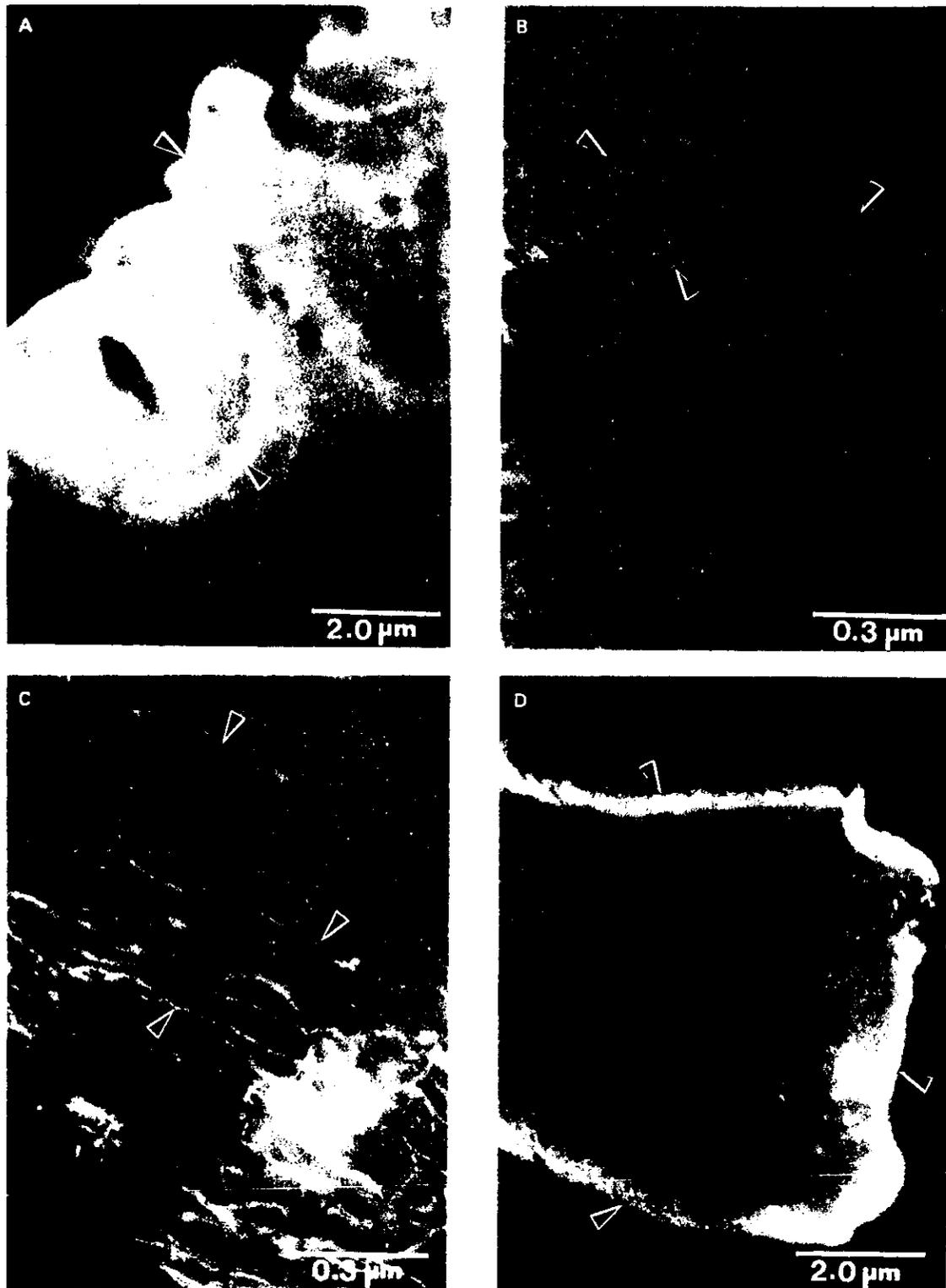


Fig. 5. Recognition of mAb 4B3 to tapeworm tissue: (A and B) Scolex. (C) Neck. (D) Proglottid. Arrows point to positive immunofluorescence.

in the border of proglottids (Fig. 5 D). Myosin from different parasites was recognized by mAb 4B3, by anti-Ag B polyclonal antibodies and by commercial anti-myosin (Fig. 6), apparently mAb 4B3 recognized a common antigenic determinant in all myosins tested with high reactivity, except ES myosin that was not recognized by anti-Ag B Ab.

Western blot analysis of ES myosin with mAb 4B3 showed that one 206 kDa fraction was recognized (Fig. 7) and electron transmission microscopy revealed that ES myosin filaments have similar ultrastructure to conventional myosin or myosin II as double heads, neck, long coil and its size (inserts in Fig. 7).

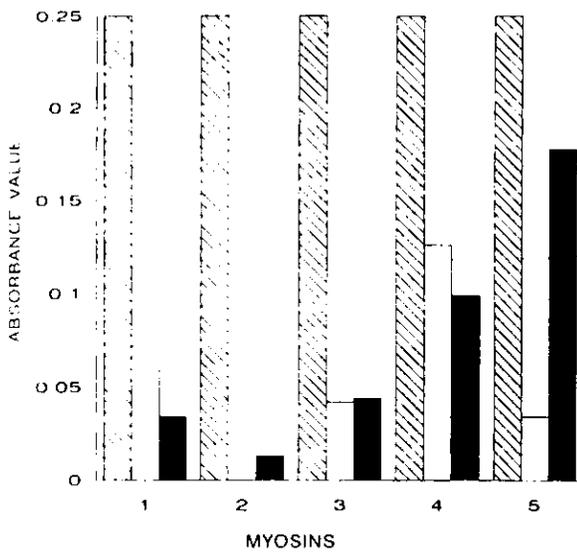


Fig. 6. Antibody recognition of parasite myosins. Myosin extracts (0.3 M KCl) were tested by ELISA using mAb 4B3 (▨), polyclonal antibodies against Antigen B (□) and commercial antibodies against smooth and skeletal bovine myosin (■). Purified myosin samples were from cysticerci extract (1), ES products (2), tapeworms from infected hamsters (3), *Taenia saginata* tapeworms (4) and commercial myosin from porcine muscle (5).

DISCUSSION

The data obtained in this study show that mAb 4B3 recognizes myosin in all samples obtained from *T. solium*. Myosin was defined by the following parameters: purification with KCl (Dowben, 1969; Giese, 1973), high molecular weight (> 206 kDa) (Darnell, Baltimore & Lodish, 1990; Giese, 1973), distribution of fluorescence in parasite tissue at the level of muscle fibres (Newport *et al.* 1987), appearance and size of purified myosin filaments in electron microscopy (Darnell *et al.* 1990) and recognition of 206 kDa myosin filaments with mAb 4B3. Electron microscopy indicated that the structure of myosin in solution corresponds to conventional myosin or myosin II (Darnell *et al.* 1990) and that it is present as homodimeric protein according to its high molecular weight (Dowben, 1969; Giese, 1973).

The fact that mAb 4B3 recognized myosin in *T. solium* adult and cysticercus suggests that it is the same type of myosin or at least they share an epitope, as defined by ELISA, Western blot and immunohistochemistry. Similarity among myosins was further seen in the cross-reactivity of mAb 4B3 with other taeniids, but not with the nematodes assayed or with the trematode and the protozoan parasite.

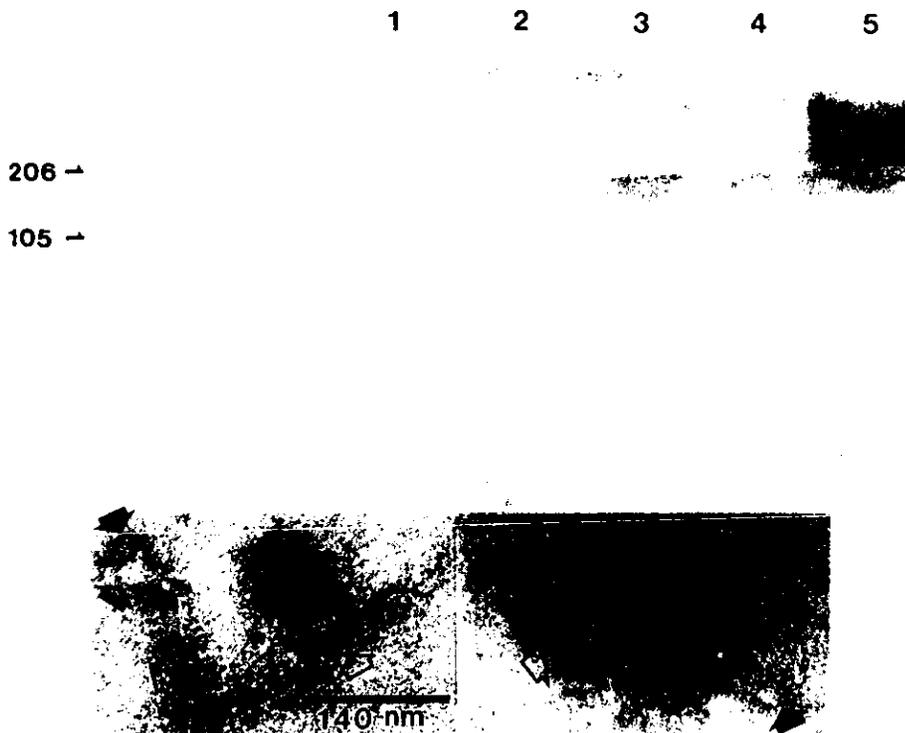


Fig. 7. Western blot analysis of tapeworm *Taenia solium* myosin. Samples were processed by 10% SDS-PAGE under reduced conditions and Western blot analysis. Different sources of myosin were analysed by Western blot against mAb 4B3. Intestinal hamster tissues (1), commercial pig myosin (2), filaments purified from ES products (3), ES products (4) and tapeworm extract from hamsters (5). No reaction was seen with intestinal myosins and the reaction with pig myosin, although present, was very faint. Purified myosin filaments from ES obtained from tapeworms were identified by electron transmission microscopy at 100 keV using uranyl stain (inserts). Myosin heads are indicated with full arrows, myosin tails with empty arrows.

Interestingly a commercial myosin obtained from skeletal pig muscle reacted intensely by ELISA and by Western blot mAb 4B3 recognized native myosin and the heavy chain fraction (data not shown).

In the case of cysticerci, an additional band was seen by Western blot, its molecular weight (105 kDa) corresponds to AgB (Guerra *et al.* 1982) as well as its histological distribution (Laclette *et al.* 1995), suggesting that paramyosin or AgB is recognized by mAb 4B3 which is specific for myosin. A similar finding between paramyosin and myosin was recently described in *Brugia malayi* (Schmitz *et al.* 1996). Myosin in *T. solium* seems to be distributed along the surface of proglottids in the adult parasite which is also evident from the metacystode stage where the spiral canal was labelled in the outer surface that will become the adult parasite. This distribution could be related with growth and support of a long parasite in the intestine where it has to remain in the presence of vigorous peristaltic movements. In the neck, myosin distribution might help fasten the large strobilum to the head as well as support nascent proglottids as suggested by the labelling of the long fibres.

T. solium myosin was detected with mAb 4B3 in secretion and excretion products and in extracts from tapeworms recovered from humans as well as in faeces from infected hamsters. This is an important finding because it may be used as a marker of infection for more specific diagnostic assays of the intestinal adult parasite. Detection of myosin in serum by a mAb has been described in association with cardiac diseases (Kato *et al.* 1995*a, b*) and antimyosin antibodies have been found in schistosome and filarial infections (Newport *et al.* 1987; Raghavan *et al.* 1992). The ELISA for coproantigen detection in taeniosis applied to humans (Allan *et al.* 1990) was standardized with anti-*T. solium* antibodies raised using whole adult parasites minced in 3 M KCl where parasite myosins are purified (Giese, 1973). This assay has high sensitivity but it does not differentiate between *T. solium* and *T. saginata*. By raising antibodies against different regions of adult *T. solium* myosin the technique might become highly specific, because specific non-conserved regions of myosin have been found in all myosins studied (Kato *et al.* 1995*a, b*; Kimura *et al.* 1991; Newport *et al.* 1987; Ruppel & Spudich, 1995). We are currently working on this aspect.

This work was supported by the European Community contract CII*CT940081, a PAPED-UNAM contract 012302 and a PAPIIT-UNAM contract IN209994. J.A. was supported by a CONACyT fellowship, M.C.R. was supported by a PAPIIT-UNAM fellowship, J.C.A. was supported by a Wellcome Trust Tropical Fellowship, Royal Society and Mexican Academy of Sciences, Y. Medina (INDRE) for training in monoclonal technology, M. T. Merchant (Fac. Medicina, UNAM) for electron transmission microscopy.

REFERENCES

- ALLAN, J. C., AVILA, G., GARCIA-NOVAL, I., FLISSER, A. & CRAIG, P. S. (1990). Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* **101**, 473-477.
- ALLAN, J. C., GARCIA DOMINGUEZ, C., CRAIG, P. S., BOGIAN, M., LOWE, B. S. & FLISSER, A. (1991). Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **85**, 573-576.
- CHAICUMPA, W., YUWAPORN, R., BURI, D., CHONGSA, M. & ECHEVERRIA, P. (1992). Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella typhi* antigen in urine. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2513-2515.
- CRAIG, P. S., MACPHERSON, C. N. L. & NELSON, C. S. (1980). The identification of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using anti-oncospherical monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**, 152-158.
- DARNELL, G., LODISH, H. & BALTIMORE, D. (1990). *Molecular Cell Biology*, 2nd edn. Scientific American Books, New York.
- DOWBEN, R. M. (1969). *General Physiology: A Molecular Approach*. Harper & Row Publishers, Inc. USA.
- FLISSER, A., TARRAB, R., WILLMS, K. & LARRALDE, C. (1975). Immunoelectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Archivos de Investigación Médica* **6**, 1-13.
- FLISSER, A., WOODHOUSE, E. & LARRALDE, C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clinical and Experimental Immunology* **39**, 27-37.
- GODING, W. J. (1983). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, Orlando, Florida.
- GIESE, A. C. (1973). *Cell Physiology*, 4th edn. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- GUERRA, G., FLISSER, A., CAÑEDO, L. & LACLETTE, J. P. (1982). Biochemical and immunological characterisation of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present States of Knowledge and Perspectives* (ed. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. & Beltran, F.), pp. 437-451. Academic Press, New York.
- HARLOW, E. & LANE, D. (1988). *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- HERMANSON, J. W., LAFRAMBOISE, W. A. & DAOOD, M. J. (1991). Uniform myosin isoforms in the flight muscles of little brown bats, *Myotis lucifugus*. *Journal of Experimental Zoology* **259**, 174-180.
- KATOH, H., SUZUKI, T., HIROI, Y., OHTAJI, E., SUZUKI, S., YAZAKI, Y. & NAGAI, R. (1995*a*). Diagnosis of aortic dissection by immunoassay for circulating smooth muscle myosin. *Lancet* **345**, 191-192.
- KATOH, H., SUZUKI, T., YOKOMORI, K., SUZUKI, S., OHTAJI, E., WATANABE, M., YAZAKI, Y. & NAGAI, R. (1995*b*). A novel immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain in serum. *Journal of Immunological Methods* **185**, 57-63.
- KIMURA, A., TSUJI, T., MATOBA, R., FUJITAMI, N., OHMORI, K. & MATSUMURA, S. (1991). Tissue-specific and non-tissue specific heavy chain isoforms of myosin in the brain as revealed by monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology* **1118**, 59-69.

- LACLETTE, J. P., LANDA, A., ARCOS, L. & WILLMS, K. (1991). Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematode) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology* **44**, 287-296.
- LACLETTE, J. P., MERCHANT, M. T. & WILLMS, K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* **73**, 121-129.
- LACLETTE, J. P., SHOEMAKER, CH. B., RICHTER, D., ARCOS, L., PANTE, N., COHEN, C., BING, D. & NICHOLSON-WELLER, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Parasitology* **148**, 124-128.
- LACLETTE, J. P., SKELLY, P. J., MERCHANT, M. T. & SHOEMAKER, CH. B. (1995). Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. *Experimental Parasitology* **81**, 140-143.
- LUMSDEN, R. D. & HILDRETH, M. B. (1983). The fine structure of adult tapeworms. In *Biology of the Eucestoda*. Vol. 1, (ed. Arme, C. & Pappas, P. W.), pp. 190-205. Academic Press, London.
- NEWPORT, G. R., HARRISON, R. A., MCKERROW, J., TARR, P., KALLESTAD, J. & AGABIAN, N. (1987). Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**, 29-38.
- OLIVO, A., PLANCARTE, A. & FLISSER, A. (1988). Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* **18**, 543-546.
- PLANCARTE, A., FLISSER, A. & LARRALDE, C. (1983). Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios* **36**, 83-93.
- RACHAVAN, V., MATHAN, V., ELIZABETH, P. C., DEAN, B. S., STAIKOU, B. E., OLSEN, J. A. & NEUMAN, J. B. (1992). Characterisation of a muscle-associated antigen from *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology* **75**, 379-389.
- RUPPEL, K. M. & SELLER, J. A. (1995). Myosin motor function: structural and mutagenic approaches. *Current Opinions in Cellular Biology: Cytoskeleton* **7**, 89-93.
- SARTE, E., SCHANZ, P. M., PLANCARTE, A., WILSON, M., GUERRERO, E. O., GÓPEZ, A. S., ROBERTS, J. & FLISSER, A. (1992). Prevalence and risk factor for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 677-684.
- SCHMIDT, K. A., HALL, J. E., RAMAN, U. V. & YATES, J. A. (1996). Localization of paramyosin, myosin, and a heat shock protein 70 in larval and adult *Bungia malayi*. *Journal of Parasitology* **82**, 367-370.
- STALS, J. (1982). Morphology of the scolex of *Cysticercus cellulosae* in brain cysticercosis. In *Cysticercosis: Present States of Knowledge and Perspectives* (ed. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaaura, C. & Beltran, F.), pp. 235-299. Academic Press, New York.
- SMYTH, J. D. & M-MANUS, D. P. (1989). *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350-4354.

LAS ACTINAS Y SU ESTUDIO EN PARÁSITOS

Olivia A Reynoso-Ducoing, Mayra Y Cruz-Rivera, Javier Ambrosio y Ana Flisser. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F. Correo electrónico: oard@servidor.unam.mx

RESUMEN

Las actinas son proteínas importantes en la estructura y función del citoesqueleto celular. Evolutivamente se han conservado, aunque presentan una ligera e importante variación en la composición de los 10 primeros aminoácidos de la región amino terminal de la proteína. Esta variabilidad permite que las actinas interactúen de forma específica con otras proteínas accesorias tales como la miosina. En este trabajo se presenta una revisión de los conocimientos sobre la actina, con énfasis en la de parásitos.

PALABRAS CLAVE: Actina, citoesqueleto, miosina, parásitos

ABSTRACT

Actins are important proteins for the structure and function of the cytoskeleton. They have been conserved during evolution, although with a slight, rather important, variation in the composition of the first 10 aminoacids in the amino terminal region of the protein. This variability allows the specific interaction of actins with other accessory proteins such as myosin. In this paper we review the knowledge regarding actin, emphasizing that of parasites.

KEY WORDS: Actin, cytoskeleton, myosin, parasites

CITOESQUELETO

En el contexto actual de la biología se concibe al citoplasma celular como una entidad que contiene dos fases: una proteica y otra acuosa. La primera forma la estructura del citoesqueleto constituida por microtúbulos, microfilamentos de actina, filamentos intermedios y proteínas del sistema microtrabecular que recubren a los otros componentes del citoesqueleto, a los organelos y forman la corteza celular (1).

Desde 1970 se admite la existencia de un citoesqueleto dinámico, aunque en la literatura del si-

glo pasado ya se encuentra el concepto de Substancia Fundamental Celular (SFC), no fue sino hasta que se empleó la microscopía de alto voltaje, que se tuvo la oportunidad de conocer la estructura y características de la SFC o citoesqueleto, que es una compleja red tridimensional de filamentos y de proteínas asociadas.

Una de las funciones del citoesqueleto es la de dar sostén a los polirribosomas libres en los vértices de la red, lo que permite la organización inmediata de las proteínas recién sintetizadas que forman cadenas enzimáticas como la de la glucólisis o bien la estructuración de los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, así como la restitución y distribución propia de la red (2). El citoesqueleto mantiene la estructura y organización de la célula, le permite tener movimientos de reajuste y transporte intra y extracelular de acuerdo con el estado morfofisiológico de la misma, así como realizar los movimientos a nivel muscular por interacción de los microfilamentos de actina con miosina o bien de deslizamiento celular a través del substrato por polimerización y depolimerización en momentos y microambientes específicos de la célula, como se observa en las imágenes en video del citoesqueleto mostradas en Internet: <http://nessie.bch.ed.ac.uk/PAUL/ACTIN/> y/o <http://borisy.bocklabs.wisc.edu/>.

Cada una de las fibras que componen este sistema son polímeros constituidos por subunidades proteicas pequeñas unidas por enlaces de tipo no covalente, un ejemplo es la actina filamentosa o polimerizada, llamada actina F cuyas unidades se llaman actina globular o actina G (1).

EL CITOESQUELETO DE LOS PARÁSITOS

Es posible que el citoesqueleto de las células de los parásitos, así como el que forma parte directa de los mismos, esté estructurado y funcione de forma semejante al de las células de los organismos superiores, porque en algunos casos se ha demos-

trado que tienen gran parecido. El citoesqueleto le permite a los parásitos unicelulares resolver necesidades de colonización y sobrevivencia dentro de sus huéspedes. Por ejemplo, *Entamoeba histolytica* y *Acanthamoeba castellanii* presentan una membrana celular muy dinámica con un continuo intercambio de sustancias y formación de pseudópodos. En otros protozoarios como *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium berghei* y *Toxoplasma gondii*, el citoesqueleto presenta una organización que forma un complejo apical que favorece la orientación del parásito, así como su interacción y penetración en el huésped.

De igual forma que en los protozoarios, las células de los céstodos y la constitución de los mismos, posiblemente presentan una estructura estrechamente relacionada con la adaptación y estabilidad frente al medio que el huésped les presenta, que además debe ser lo suficientemente plástica para que puedan alcanzar con éxito las diferentes etapas de desarrollo de estos organismos multicelulares. Adicionalmente, para la adaptación de los parásitos céstodos y su desarrollo, podría requerirse una determinada constitución tanto del citoesqueleto celular como la del parásito completo, para lo cual la estructuración de su musculatura debe ser muy importante. Se sabe que de seis genes para actina identificados en *Diphyllobotrium dendriticum*, tres de ellos codifican para actina muscular, otros dos genes codifican para actina citoplásmica, que interviene en procesos de división, migración y diferenciación celular y el último gen codifica para la actina del tegumento celular (3). En el caso de *Taenia solium*, el citoesqueleto y la musculatura de los cisticercos probablemente tienen una estructura diferente a la del adulto, como lo sugiere la distribución de miosina (4).

INTERACCIÓN ACTINA-MIOSINA

De manera general, las células musculares estriadas típicas de mamíferos son cilíndricas, de 1 a 40 mm de longitud y de 10 a 50 μm de ancho, contienen aproximadamente 100 núcleos y están constituidas por unidades de filamentos de actina F y miosina denominados sarcómeros, que se repiten a lo largo de las células (1). La contracción de células musculares y no musculares depende principalmente de la miosina, cuyas variantes se agrupan en 13 familias diferentes. De estas miosinas,

las tipo II son los motores del movimiento muscular, son diméricas de alto peso molecular (440 kDa), constituidas por dos monómeros o cadenas pesadas homólogas y de las que cada una presenta una región globular y otra filamentosa, estos monómeros tienen la capacidad de ensamblarse espontáneamente en filamentos e interactuar con la forma filamentosa de la actina, lo que favorece e incrementa la actividad enzimática de ATPasa de miosina y por lo tanto, la contracción muscular. La región globular de miosina tiene un sitio de interacción con actina F, así como un sitio catalítico de ATP. Se sabe que la miosina hidroliza una molécula de ATP en aproximadamente 30 segundos; sin embargo, su interacción con actina F favorece e incrementa sustancialmente esta actividad y cada sitio catalítico es capaz de hidrolizar de 5 a 10 moléculas de ATP por segundo (1). Las cadenas ligeras situadas en la región globular de la miosina regulan las propiedades de unión a actina así como su actividad enzimática. No obstante, también se sabe que la eficiencia de la interacción actina-miosina está dada por las características del extremo amino terminal de la actina, y es de vital importancia el grado de negatividad que este presenta, ya que entre más negativa sea esta región es más eficiente la activación de la miosina (5).

CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LAS ACTINAS

Las actinas son proteínas estructurales muy conservadas presentes en todos los eucariotes. Por lo general son codificadas por varios genes, lo que favorece que se produzcan diferentes formas de actina, denominadas isoformas. En la mayoría de las células, las moléculas de actina pueden ser modificadas después de su traducción, principalmente por acetilación del residuo amino terminal y/o metilación de una de sus histidinas. Todas las isoformas presentan semejanzas en sus propiedades físicas y químicas, las que se conservan a lo largo de la evolución, como el sitio de unión específico con el ATP y la conformación tridimensional que les permite interactuar con proteínas que se asocian a ellas (5, 6). La presencia de los sitios de interacción entre los monómeros de actina G favorece el ensamblaje de los monómeros para formar los filamentos de actina F. Los monómeros de actina G son de 43-45 kDa y los filamentos de actina F de 2,500 kDa de peso molecular.

Los filamentos de actina miden aproximadamente 8 nm de diámetro, son flexibles y en conjunto forman una densa red tridimensional o haces de fibras que tiene una estrecha interacción con la membrana celular. El estado monomérico es favorecido tanto *in vitro* como *in vivo* por fuerzas iónicas débiles y está constituido por una cadena polipeptídica sencilla que puede variar de 375 a 427 aminoácidos según la especie. En la primera, los aminoácidos ácidos de la porción amino terminal generan un punto isoeléctrico cercano a un pH de 5.5, mientras que en las de mayor peso molecular, la presencia de residuos básicos eleva el punto isoeléctrico a valores cercanos a 6.7 (7). Cada monómero presenta dos dominios globulares separados por una cavidad, donde se lleva a cabo la hidrólisis de ATP en presencia de calcio o magnesio. Cada monómero de actina G tiene dos sitios de unión a otros dos monómeros, los que al unirse a su vez a otros monómeros forman un filamento helicoidal o actina F que puede alcanzar varios micrometros de longitud (6).

La primera clasificación de las actinas tuvo como fundamento el tipo de tejido del cual se extrae la actina, es decir, si proviene de un tejido muscular o no muscular. La actina de músculo esquelético se caracterizó como la forma más ácida de estas proteínas y se le denominó α -actina. La actina no muscular, presente en el citoplasma celular de los demás tipos celulares, es más básica y se le denominó actina β y/o γ . En la actualidad, esta clasificación ya no tiene vigencia porque se ha encontrado que algunas actinas purificadas de tejidos musculares o no musculares no corresponden a las características indicadas para dicho tejido, pero a pesar de esto la mayoría de los protocolos de purificación aún siguen esta clasificación (8).

A pesar de la semejanza molecular entre estas proteínas, existe variabilidad entre ellas por lo que se han clasificado recientemente por su secuencia primaria de aminoácidos y específicamente por los diez primeros aminoácidos de la porción amino terminal. Esta clasificación es la vigente. Como se mencionó, las actinas interaccionan de forma específica con otras proteínas, como la miosina. Probablemente, por cada variante de actina hay un tipo específico de miosina que permite que su actividad sea más eficiente y determina diferentes fun-

ciones. De esta manera se ha propuesto que el potencial de contracción muscular está asociado a la α -actina, y que en el desplazamiento celular de un sitio a otro participa la β -actina, mientras que el reacomodo del citoesqueleto para mantenimiento de la forma de la célula depende de la γ -actina (7).

ACTINA DE TÉNIDOS

En *Diphyllobotrium dendriticum* los resultados de identificación, secuenciación e hibridación *in situ* muestran que en este parásito céstodo existen 6 genes diferentes, coexpresados al mismo tiempo en células de diferentes regiones del parásito, los cuales podrían ser necesarios en diferentes etapas del ciclo de vida o en los procesos de división, diferenciación y migración celular. Algunos de estos genes tienen secuencias de bases altamente homólogas a la actina de mamíferos (3). En *T. solium* únicamente se han identificado, aislado y secuenciado dos genes que codifican para actina y se denominaron PAT 5 y PAT 6 (9). El análisis comparativo de las bases de estos genes muestra alta homología con algunos de los reportados para *D. dendriticum*, por lo que podrían tener funciones similares.

PERSPECTIVAS

Aunque las actinas son proteínas ampliamente estudiadas en múltiples organismos, y en general, tienen gran semejanza entre sí, es necesario caracterizarlas en aquellos en los que no han sido descritas. Esto se debe a que, por un lado, mediante tecnologías modernas, como la microscopía de fluorescencia confocal, es posible determinar con mayor precisión su distribución en el citoesqueleto. Por otro lado, en el caso de parásitos, los estudios relacionados con actina son escasos y su importancia reside en que el conocimiento de la morfofisiología de ésta, y de otras proteínas del citoesqueleto, permitirá seguramente obtener información sobre la relación huésped-parásito.

REFERENCIAS

1. Darnell J, Lodish H, Baltimore D, Berk A, Matsudaira P y Zipursky L (1996) En: Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York, NY, USA, pp 991-1050.
2. Porter K R y Tucker J B (1981) The ground substance of the living cell. *Sci Amer* 244: 56-67.

3. Wahlberg M H (1997) Three main patterns in the expression of six actin genes in the plerocercoid and adult *Diphyllobothrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 86: 199-209.
4. Ambrosio J, Cruz-Rivera M Y, Allan J, Morán E, Ersfeld K y Flisser A (1997) Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology* 114: 545-553.
5. Bray D (1992) Cell movements. Garland Publishing, New York and London, p 406.
6. Scheterline P y Sparrow J C (1994) En: Protein profile actin. Academic Press Limited, Great Britain, pp 1- 5.
7. Herman I M (1993) Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5: 48-55
8. Uyemura D G y Spudich J A (1980) Biochemistry and regulation of nonmuscle actins. En: Biological regulation and development. Editor: Goldberger R F. Plenum Publishing Corporation, pp 317- 338.
9. Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gómez E, Hernández R, Willms K y Lacleite J P (1990) Cloning and sequencing of two genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 40: 87-94.