



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE
MIOSINA TIPO II DE CISTICERCOS DE
Taenia crassiceps (copa ORF).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

REYES TORRES ANGELICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	Prof. Elpidio García Ramírez
Secretario	Prof. Javier Rolando Ambrosio Hernández
1er. Suplente	Prof. Marco Antonio Becerril Flores
2°. Suplente	Prof. José Cordero Hernández

Sitio en donde se desarrollo el tema:

Facultad de Medicina, Edificio A, Segundo Piso. Ciudad Universitaria

Asesor: Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández



Supervisor técnico: QFB. Laura Guadalupe González Malerva



Sustentante: Angélica Reyes Torres

Reyes Torres Angélica.

RECURSOS

Este trabajo de investigación se realizó en el Lab. de la Dra. Ana Flisser Steinbruch en el Departamento de Microbiología y Parasitología ubicado en la Facultad de Medicina de la UNAM. Bajo la dirección del Dr. Javier R. Ambrosio Hernández, con apoyo de DGAPA.

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Porque me ha ayudado a realizar todos mis sueños, por la vida que me ha regalado y sobre todo, por los padres que me dio.

A mis Padres. Felipe Reyes y Teresa Torres. Estoy segura que desde donde se encuentran siguen estando al pendiente de mí. Gracias por todo el amor, la confianza y la libertad que me dieron, nunca dejaron de creer en mí y gracias a ustedes he llegado hasta aquí y siguen siendo el mejor estímulo para seguir adelante. Los amo y los llevo en mi corazón.

A Ricardo. Mi amor, gracias por estar conmigo en todo momento, por tu apoyo, tu comprensión, y por todo el amor que me das. Gracias por impulsarme a crecer y a ser mejor cada día. Deseo que juntos luchemos para realizar todos nuestros sueños y que nuestro amor crezca cada día. Te amo.

A mis hermanos. Rubén, Roberto, Arturo, Gloria, Felipe, Rafael, Guadalupe y Elizabeth. Gracias porque he recibido apoyo de cada uno de ustedes y de todos he aprendido algo. Espero que nos unamos más, los quiero mucho.

Al Señor Francisco Lechuga y la Señora Carmen Mejía. Quienes me abrieron las puertas de su casa, me han brindado su cariño y confianza. Gracias por todo el apoyo.

Permito a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Reyes Torres Angélica.

FECHA: 19-Enero-2004

SIRMA: Reyes Torres Angélica.

A mis amigos. A todos mis amigos que han hecho más agradables mis días de escuela, a las Chicas del Club, que me brindaron su amistad y su confianza, espero que todos sus deseos se realicen. A mis amigos doneros, que donde quiera que se encuentren, sean felices.

Al Dr. Javier R. Ambrosio Hernández y mis compañeros de laboratorio. Gracias por el apoyo tanto académico como moral, es algo que jamás olvidaré.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Principalmente a la Facultad de Química, que me abrió sus puertas, me formó académicamente y me dio la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente. A la Facultad de Medicina, en la cual se ha desarrollado esta investigación y me ha brindado la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente. A la DGAFA de la UNAM, dependencia que financió este trabajo.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Abreviaturas.	1
I. Introducción.	2
II. Hipótesis.	4
III. Objetivos.	4
IV. Antecedentes.	
1. Constitución de fibras musculares.	5
2. Sistemas musculares en parásitos.	6
3. Miosinas.	8
3.1. Características generales.	8
3.2. Estructura.	8
3.3. Superfamilia de las miosinas y miosinas tipo II.	9
3.4. Fragmentación proteolítica de miosina tipo II.	11
3.5. Caracterización de miosina tipo II en helmintos.	13
4. Cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> .	13
4.1. Biología celular.	14
V. Parte experimental.	
1. Diseño Experimental.	16
2. Material y Métodos.	
2.1 Obtención de parásitos.	17
2.2 Procesamiento de parásitos para los ensayos inmunohistoquímicos.	17
2.3 Extracción de miosina tipo II.	18
2.4 Análisis bioquímico e inmunológico de miosina aislada.	19
2.5 Obtención de bandas de miosina.	20

2.6 Digestión enzimática con quimotripsina de miosina aislada.	21
2.7 Inmunolectrotransferencia de péptidos de miosina.	22
2.8 Análisis computacional de péptidos de miosina	23
2.9 Análisis inmunohistoquímico de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .	23
VI. Resultados y Discusión.	
1. Obtención de parásitos.	24
2. Extracción de miosina tipo II.	24
3. Análisis bioquímico, inmunoquímico y computacional de miosina aislada y de sus péptidos.	25
4. Análisis inmunohistoquímico y computacional de parásitos enteros y de sus cortes en congelación.	32
VII. Conclusiones.	35
VIII. Referencias.	38
IX. Apéndices.	
1. Preparación de soluciones.	42
2. Tablas.	44

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Miosinas tipo II	10
Árbol filogenético de la superfamilia de miosinas	11
Fragmentación proteolítica de miosinas tipo II	12
Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>	14
Cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	15
Diseño experimental del proyecto	16
Extracción de miosina II de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	26
Presentación de isoformas de miosina	26
Análisis electroforético e inmunoquímico del enriquecimiento de miosina tipo II	27
Identificación de miosina, su aislamiento y digestión enzimática	28
Evaluación del reconocimiento de péptidos de miosina por anticuerpos policlonales antimiosina	31
Inmunofluorescencia de anticuerpos policlonales antimiosina en cisticercos	34
Tabla 1. Péptidos generados durante la digestión enzimática de miosina aislada	44
Tabla 2. Péptidos de miosina reconocidos por anticuerpos policlonales antimiosina y revelados con DAB luego de su transferencia a membrana de PVDF	45
Tabla 3. Péptidos de miosina reconocidos por anticuerpos policlonales antimiosina y revelados por quimioluminiscencia luego de su transferencia a membrana de PVDF	46

ABREVIATURAS.

SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
ASB	Albúmina Sérica Bovina.
PVDF	Polivinil difluoruro.
DAB	3,3 – Diaminobenzidina.
TA	Temperatura ambiente.
GEL POLI	Gel de Poliacrilamida.
IET	Inmunoelctrotransferencia.

I. INTRODUCCIÓN.

La presencia de músculos en los organismos permite su adaptación y sobrevivencia bajo las condiciones en las cuales se desarrollen. La constitución de estos músculos garantiza la funcionalidad de los mismos y permite que se desarrollen los movimientos de contracción y relajación muscular que sean requeridos. Se conocen perfectamente las diferentes proteínas que integran las fibras musculares, las cuales a su vez forman los tejidos musculares y entre ellas destacan la miosina II y la actina filamentosa, quienes son las protagonistas moleculares para que se desarrollen los fenómenos de contracción muscular. Los músculos no sólo están presentes en organismos vertebrados, también se les encuentra en invertebrados en los cuales se denominan sistemas musculares y estos son de tipo liso (Alberts *et al*, 2002). La diferencia entre los sistemas musculares de tipo liso entre vertebrados e invertebrados, es que en estos últimos hay mayor diversificación y mayor funcionalidad que permite la adaptación de los organismos al medio en que se encuentran (Dowben, 1969). Incluso, dentro de las fibras musculares de estos organismos se encuentran proteínas como la paramiosina, además de las ya mencionadas, que permiten que estos organismos desarrollen fenómenos de contracción muscular muy prolongados como lo ejemplifican las ostras y los moluscos.

En los helmintos pocos estudios y conocimientos se tienen en relación a sus componentes de las fibras musculares de sus sistemas musculares, de hecho, sólo existen hasta el momento algunos trabajos publicados en el nematodo *C. elegans* (Epstein *et al*, 1985), los trematodos *Fasciola hepática*, *Schistosoma mansoni* y *Diclidophora merlangi* (Stütt *et al* 1992; Kumar *et al*, 2003; Mair *et al*, 1998) y el céstodo *Taenia solium* (Ambrosio *et al*, 1997) en quienes se ha descrito la presencia de miosina y actina en sus fibras musculares. En los cestodos se ha descrito que los músculos de estos parásitos son no estriados de tipo liso (Lumsden y Byram III, 1962), no tienen túbulos sarcolemales lo cual es un reflejo de músculos de contracción lenta (Larry y John, 2000).

El conocimiento de los diferentes sistemas musculares y sus componentes, como la miosina tipo II en los helmintos, potencialmente podría representar la oportunidad de encontrar, desarrollar y/o evaluar sustancias antihelmínticas que afecten a estos niveles; tal y como se ha propuesto en el desarrollo de nuevos fasciolicidas (Kumar *et al*, 2003). Los estudios de caracterización de miosina tipo II muscular de *T. crassiceps*, como modelo experimental de cisticercos de *T. solium*, podría abrir un mundo de oportunidades de estudiar el efecto de sustancias que actúan a estos niveles y que potencialmente podrían ser útiles en las enfermedades que produce *T. solium*.

II. HIPOTESIS.

Las fibras musculares de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF contienen miosina tipo II, la cual puede ser aislada, analizada bioquímica e inmunquímica e identificada en los tejidos de los parásitos mediante anticuerpos policlonales específicos de miosina II de cisticercos de *T. solium*.

III. OBJETIVOS.

➤ General:

Aislar y caracterizar bioquímica e inmunquímica a miosina tipo II de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

➤ Particulares:

- ✓ Adaptar en el laboratorio el modelo de cisticercosis murina por *T. crassiceps* cepa ORF.
- ✓ Identificar y aislar miosina II de cisticercos de *T. crassiceps*.
- ✓ Evaluar el reconocimiento a miosina de cisticercos de *T. crassiceps* por parte de anticuerpos policlonales antimiosina de cisticercos de *T. solium*.
- ✓ Aislar la miosina identificada y someterla a digestión proteolítica con quimotripsina para obtener el perfil de digestión de esta proteína.
- ✓ Evaluar en los péptidos de miosina obtenidos, cuales de ellos son reconocidos por los anticuerpos policlonales antimiosina.
- ✓ Identificar, mediante ensayos inmunohistoquímicos, las regiones de miosina en cisticercos de *T. crassiceps* reconocidas por los anticuerpos policlonales antimiosina.

IV. ANTECEDENTES.

1. Constitución de fibras musculares.

El tejido muscular está especializado para la contracción y se compone de células alargadas llamadas fibras musculares. En los organismos vertebrados se les encuentra de tres tipos diferentes, cada uno de los cuales está especializado para realizar una clase distinta de contracción; las fibras musculares pueden ser: esqueléticas, quienes se contraen rápidamente durante el movimiento corporal, lisas de las vísceras y las cuales presentan contracciones rítmicas lentas y, finalmente, las cardíacas que producen las contracciones rítmicas del corazón (Rueg, 1989). Entre estos tres tipos de fibras hay diferencias claras como la estructuración compleja que caracteriza al tejido muscular esquelético. Sin embargo, aunque hay diferencias entre las fibras musculares, la disposición de ellas, en todos los tipos de sistemas musculares, corresponden a hileras paralelas que en su interior contienen elementos contráctiles que se alinean a lo largo de las fibras. Estos elementos, llamados miofibrillas, están constituidos a su vez por microfilamentos delgados de actina y los gruesos de miosina los cuales interaccionan unos con otros. Otras características de las fibras musculares es la ubicación y el número de sus núcleos celulares, mientras que las células cardíacas tienen núcleos ubicados en la parte central de las fibras, las de músculo esquelético son multinucleadas y las de músculo liso, como las que se encuentran en estómago o intestinos, presentan una apariencia fusiforme (extremos delgados y parte del centro es ancha) en donde los núcleos están situados en la parte central de las células (<http://www.geocities.com/bio135a/tejmusc.htm>).

En lo que se refiere a las fibras musculares de músculo liso, aún cuando no son demasiado complejas, desarrollan gran actividad muscular y presentan una gran plasticidad durante los fenómenos de contracción muscular. Este tipo de fibras forman los sistemas musculares de organismos invertebrados (Dowben, 1969) como en los parásitos helmintos (Larry y John, 2000) y son parecidas a los

músculos de tipo liso del ser humano: las células son largas y delgadas (longitud de 50-400 μm y 2-10 μm de ancho) y presentan desmosomas que favorecen la unión entre ellas. En su conjunto, todas las células forman una red que descansa sobre fibras finas de colágena con las cuales se encuentran intermezcladas y dado que no tienen una distribución regular se desplazan, unas sobre otras, lentamente (100 a 1000 veces) con respecto a las de músculo esquelético. Las características de este tipo de fibras musculares hace que los sistemas musculares de tipo liso sean los mas adecuados para mantener una contracción prolongada, sin que haya fatiga y con el mínimo de energía. La plasticidad en sus movimientos permite que puedan llegar al grado de encontrarse relajados completamente, aún en estados en los que se acortan o se adelgazan (Rüeg, 1989).

2. Sistemas musculares en parásitos.

Como ya fue indicado, los sistemas de musculatura lisa de los invertebrados son semejantes a las encontradas en los vertebrados, pero no llegan a ser exactamente igual a ellas; aparte de que las miofibrillas de las fibras musculares que tienen un alineamiento lateral, tienen una alta cantidad de paramiosina asociada a sus miofilamentos gruesos (Lowy y Hanson, 1962). Sin embargo, a pesar de las diferencias, las semejanzas que se presentan son indicativos de que los rigen aspectos funcionales similares (Lumsden y Byram III, 1962).

Varios sistemas de musculatura en helmintos se han evidenciado con el empleo de la microscopia de fluorescencia, lo cual ha permitido reforzar el conocimiento de su distribución completa y se ha establecido que existen dos tipos diferentes de sistemas musculares (como los encontrados en cestodos adultos): el somático y el no somático (Mair *et al*, 1998). El sistema muscular somático está involucrado en la forma y la locomoción de los parásitos ya que sus fibras se encuentran en mayor cantidad y presentan una localización tisular profunda. Estas fibras son de diferentes tipos y de ellas destacan las circulares externas y las longitudinales internas; en su conjunto parecen conformar una red tridimensional. En los cestodos, las fibras musculares se encuentran en capas internas,

predominan las de tipo longitudinal y están estratificadas en capas externas corticales y medulares internas, junto con otras transversales y dorsoventrales (Mair *et al*, 1998). Por su parte, el sistema muscular no somático está constituido por fibras musculares contenidas en órganos de adhesión, en el sistema digestivo de aquellos parásitos que lo contengan y en los tractos reproductores. A esta clasificación pertenecen fibras de tipo estriado, así como las que contienen paramiosina. Lo estudiado en parásitos monogéneos que parasitan peces (Halton *et al*, 1998) ha mostrado que en las ventosas hay fibras musculares de constitución compleja que podrían correlacionar con su función; cuando se contraen, sobre todo las que se encuentran orientadas de forma meridional, causan la apertura de los bordes de las ventosas y cuando se contraen las que están orientadas de forma ecuatorial, en conjunto con las radiales (las cuales se encuentran por dentro y por fuera de los bordes de estas ventosas), permiten que la ventosa adquiera la forma de una copa de succión y por ello se favorece su adhesión al tejido del huésped. Posiblemente, este tipo de organización muscular podría explicar la contracción de las ventosas, así como el movimiento de los ganchos en parásitos como *T. solium*; la forma parasitaria adulta de estos parásitos requiere de la adhesión al epitelio intestinal de los huéspedes infectados experimentalmente (Merchant *et al*, 1997) y lo cual podría tener mucho soporte tanto en la paramiosina encontrada en estas fibras musculares (Laclette *et al*, 1995) como de la miosina que también ha sido encontrada en estas zonas (Ambrosio *et al*, 1997). Ambos tipos de proteínas musculares podrían estar colocalizadas en las mismas fibras musculares. La fuerza con la que estos parásitos se adhieren al intestino, les permite un anclaje exitoso, su desarrollo y el que alcancen varios metros de largo. Posiblemente, la fortaleza de anclaje mencionado se deba a la constitución muscular que se presenta en la porción cefálica de estos parásitos, el cual es el sitio en que están situados tanto el rosetelo como los ganchos. Se sabe, por otros cestodos diferentes a *T. solium*, que para cada par de ganchos hay tres sistemas musculares asociados: Un sistema que permite la extensión de los ganchos denominado protractor, otro que hace que los ganchos se encuentren juntos denominado abductor y otro que permite el empuje

de los ganchos hacia el tejido del huésped el cual se denomina retractor. Sin embargo, a pesar de que son conocidos tales sistemas de musculatura, no existe conocimiento alguno de la forma en que estos se coordinan para su funcionamiento correcto, ni tampoco (a pesar de que los ganchos podrían ser importantes para la penetración en la pared intestinal) se conoce su papel exacto en ninguno de los estadios parasitarios en los que se encuentran (Smyth y McManus, 1989).

3. Miosinas.

Como se describió anteriormente, las miofibrillas que conforman las fibras musculares están compuestas de microfilamentos. De estos, los microfilamentos gruesos están constituidos de proteínas musculares conocidas como miosinas y que en los invertebrados, en estos mismos microfilamentos, se encuentra otra proteína muscular conocida como paramiosina. Lo que a continuación será tratado estará referido a las miosinas musculares.

3.1. Características generales. Las miosinas, también conocidas como motores moleculares, están agrupadas en una superfamilia en la cual están integradas, hasta el momento, 17 clases diferentes, con base las comparaciones de secuencias de DNA de su región globular y se considera altamente probable que estas proteínas estén presentes en todas las células eucarióticas. La forma en la cual funcionan, biológicamente hablando, como motores biológicos, se basa en el hecho de que interaccionan con los microfilamentos delgados de actina polimerizada, usando para ello la energía obtenida por la hidrólisis del ATP (motivo por el cual estos motores tienen actividad de ATPasa) en presencia de calcio y con lo cual, generan movimiento unidireccional a lo largo de la actina filamentosa para realizar fenómenos tan diversos como el movimiento celular, la contracción muscular, citocinesis y el transporte de vesículas, entre otros (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/Review/articleframe.html>; Sellers, 1999).

3.2. Estructura. Las miosinas son proteínas que pueden encontrarse en forma mono, di, tetra o hexamérica dependiendo de la clase a que pertenezca. En el caso de las miosinas diméricas (PM 170-240 kDa), ellas están formadas por dos

pares de cadenas ligeras de 15-30 kDa llamadas cadenas ligeras esenciales (ELC) y dos cadenas ligeras regulatorias (RLC). Es en las cadenas pesadas en donde radica la principal funcionalidad de estas proteínas. Cada una de estas cadenas pesadas está compuesta de tres dominios funcionales (ver figura 1). El primero, el dominio de motor, se encuentra localizado en la región amino terminal de la proteína y corresponde a una región de estructura cuaternaria que es denominada cabeza globular y cuya secuencia de aminoácidos es altamente conservada en todas las clases de miosinas. En este dominio se encuentran los sitios de unión a ATP y a actina y está compuesto de 720-780 residuos de aminoácidos. El segundo dominio funcional, la región denominada cuello, consiste de una larga y única hebra α -hélice la cual es estabilizada por la unión de las subunidades de las cadenas ligeras. También en esta región interaccionan las cadenas regulatorias de la proteína y por ello, ahí, se lleva a cabo la regulación de la mayor parte de miosinas. El tercer dominio, reconocido por ser una región filamentosa en forma secundaria, es el tallo y es esta región, la que más variabilidad presenta entre todas las miosinas conocidas. Es esta zona de la proteína en la que se fundamenta la diversidad de secuencia primaria, estructura y función de las miosinas, ya que sirve de soporte para poder mover los filamentos de actina y aquí los monómeros interaccionan para formar los dímeros de las proteínas. (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/Review/articleframe.html>; González, 1998; Sellers, 1999).

3.3. Superfamilia de las miosinas y miosinas tipo II. La clasificación de las diferentes clases de miosina se ha hecho con base al análisis filogenético, basado en una comparación de la secuencia de aminoácidos inferidos de la secuencia de bases del dominio motor, de todas las miosinas hasta ahora conocidas (ver figura 2). La asignación de su clasificación está basada en números romanos relacionados con su orden de descubrimiento (Sellers, 1999).

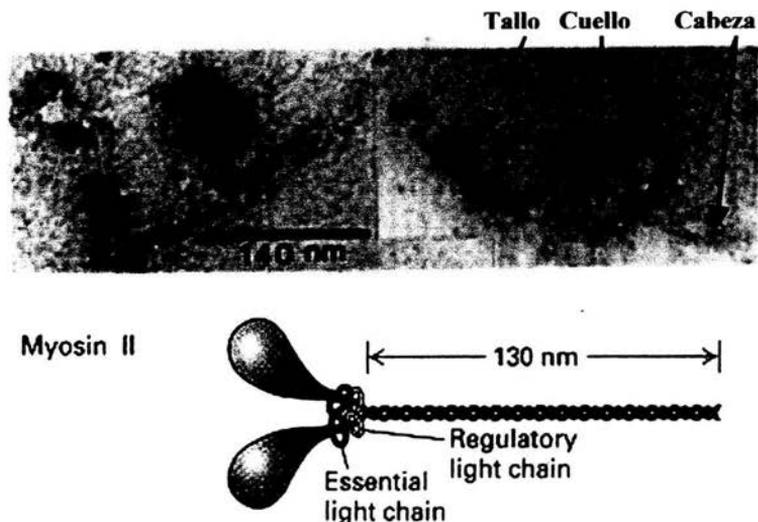


Figura 1. Miosinas tipo II. La figura muestra moléculas de miosina tipo II obtenidas de cisticercos de *T. solium* y observadas al microscopio electrónico de transmisión (Ambrosio *et al*, 1997), así como una representación esquemática de las partes que componen a este tipo de moléculas (Lodish *et al*, 2000).

Las miosinas de la clase II han sido las proteínas que más se han estudiado y para las que más se conocen sus características. Se sabe que estas proteínas tienen capacidad de autoensamblamiento a baja fuerza iónica, a través de su tallo enrollado de forma helicoidal, y con ello forman varias estructuras filamentosas que generan filamentos bipolares (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/Review/articleframe.html>). Con base a las secuencias de aminoácidos del dominio motor, las miosinas II pueden ser divididas en cuatro grupos: miosina II sarcomérica de músculo cardíaco y esquelético de vertebrados, miosina II no muscular y de músculo liso de vertebrados, miosina II de invertebrados y miosina II no muscular de protozoarios (Sellers, 1999).

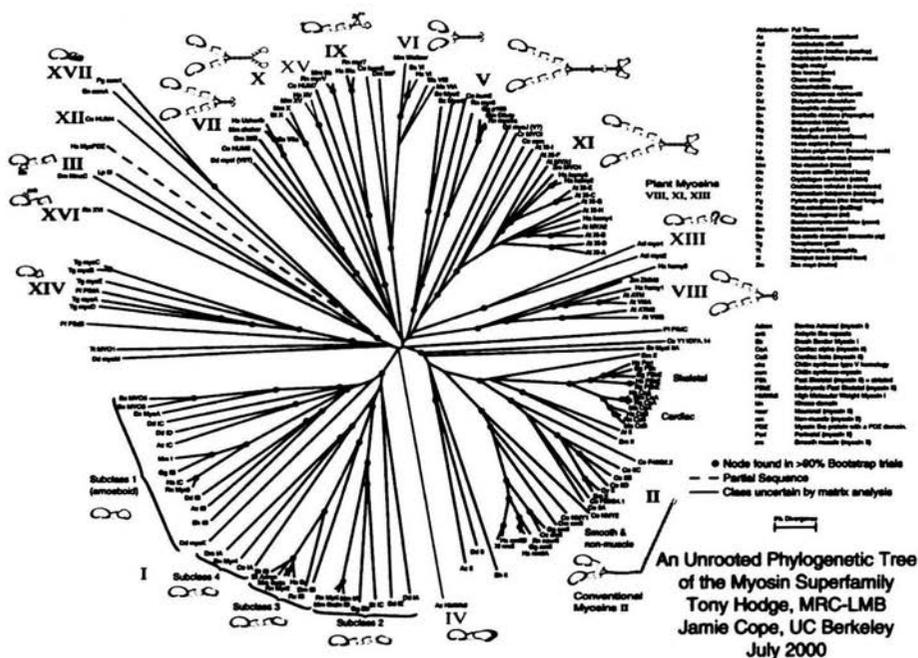


Figura 2. Árbol filogenético de la superfamilia de miosinas. La imagen muestra como para cada una de las clases de miosina existe una forma molecular de miosina definida y todas las miosinas comparadas tienen como punto común la región globular situada en el amino terminal de cada uno de las proteínas. Las miosinas de la clase I y II son las más estudiadas y conocidas hasta el momento. Tomado de <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/trees/gifs/tree.jpg>.

3.4. Fragmentación proteolítica de miosina tipo II. Cada una de las cadenas pesadas de las miosinas II puede ser separada en sus diferentes dominios mediante proteólisis enzimática controlada. Un sitio de rompimiento de la proteína ocurre cerca de los 130 kDa en la región amino terminal y se producen dos fragmentos: la meromiosina pesada (HMM) y la meromiosina ligera (LMM), las cuales pueden ser separadas por diálisis en condiciones de baja ionicidad. La HMM, soluble bajo estas condiciones, contiene las dos cabezas y gran parte de la estructura del tallo de la cadena pesada dimerizada. La LMM retiene las características de solubilidad de la miosina intacta y se polimeriza bajo

condiciones de baja fuerza iónica. La HMM, a su vez, puede ser dividida en dos subfragmentos: El 1 o S-1 y el 2 o S-2. El S-1, que corresponde únicamente a la cabeza o porción globular, esta asociada con ambas cadenas ligeras o solo con la cadena ligera esencial, dependiendo de la proteasa y de las condiciones usadas para la digestión. El S-2 es soluble y corresponde a la región del tallo dimerizada y enrollada. Si la miosina intacta es cortada solamente en S-1 y S-2 se producen tanto S-1 y un filamento del tallo que consiste de S-2 y la región de la LMM. En la porción globular, las miosinas tienen dos sitios susceptibles de acción enzimática proteolítica: El primero esta localizado cerca de los 25 kDa y el segundo, cerca de los 75 kDa del amino terminal. Estos sitios de corte dan como resultado la producción de tres fragmentos de la cabeza; un fragmento amino terminal de 25 kDa, un fragmento central de 50 kDa y un fragmento carboxilo terminal de 20 kDa. Estos fragmentos solo se disocian bajo condiciones desnaturizantes y no constituyen dominios independientes de la cabeza de la miosina (Sellers, 1999).

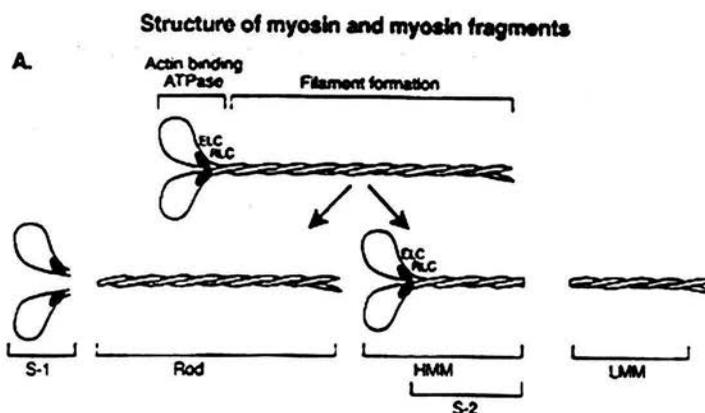


Figura 3. Fragmentación proteolítica de miosinas tipo II. El esquema muestra los sitios de corte de la miosina tipo II, uno de ellos produce dos fragmentos: S1 y el tallo (Rod); otro sitio de corte, utilizando la tripsina o la quimotripsina, produce a la HMM y LMM. (Sellers, 1999).

3.5. Caracterización de miosina tipo II en helmintos. No existen muchos estudios relacionados con caracterización de miosinas en helmintos, de hecho, sólo para *T. solium* se ha iniciado la caracterización bioquímica e inmunoquímica de una miosina tipo II muscular (Ambrosio *et al*, 1997; 2001) y se está estudiando su papel dentro de la relación hospedero-parásito. Lo único con lo que se cuenta a la fecha, son observaciones morfológicas que muestran la distribución de fibras musculares durante la evaginación de cisticercos, así como durante la fijación y estabilización de parásitos adultos a la mucosa en presencia de movimientos intestinales (Lumsden y Hildreth, 1983). Lo que se ha logrado establecer durante la caracterización bioquímica e inmunoquímica de la miosina II de *T. solium*, es que esta es una miosina tipo II clásica (fig 1), localizada en todas las fibras musculares del parásito y que presenta epítopes comunes, reconocidos por un anticuerpo monoclonal antimiosina de *T. solium*, con la paramiosina (también conocida como Antígeno B) de estos parásitos. La proteína fue detectada, mediante el mismo anticuerpo monoclonal, en el canal espiral de los cisticercos, en las ventosas, y por debajo y a lo largo de la superficie de proglótidos de los parásitos adultos (Ambrosio *et al*, 1997). Es posible que tal distribución de la miosina muscular pueda estar relacionada con la sobrevivencia y el desarrollo de los parásitos dentro de su hospedero. Estudios recientes, que aún no han sido publicados, muestran que dependiendo del estadio de desarrollo de *T. solium* se están expresando diferentes isoformas de miosina II e incluso, en un solo estadio parasitario como los cisticercos y con empleo de un anticuerpo policlonal antimiosina de *T. solium* (Kumar *et al*, 2003) hay expresión de varias isoformas de miosina (Cruz-Rivera M, comunicación personal).

4. Cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps es un gusano cuya forma adulta se encuentra en el intestino de zorros rojos de Europa y de Norte América. El hospedador natural intermediario para este parásito es el roedor y en la cavidad peritoneal de estos animales se multiplican las formas larvarias o de cisticercos (fig. 4). Debido a estas propiedades y dado que la morfología de los cisticercos es semejante a la de los

de *T. solium* se logró estandarizar y adaptar una cepa de cisticercos de *T. crassiceps* que se mantienen en reproducción continua, por gemación, y no tienen escólex. Esta cepa, denominada ORF, se multiplica de manera eficiente por gemación en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c y por ello se le utiliza como modelo de estudio de cisticercosis de *T. solium*. Parece que esta cepa, desde el punto de vista de la endocrinología, el género del hospedador murino es de gran importancia para la velocidad de reproducción de *T. crassiceps*, ya que en los ratones hembras se producen mejor luego de una infección temprana y con una gran carga parasitaria (Romano *et al*, 2003).

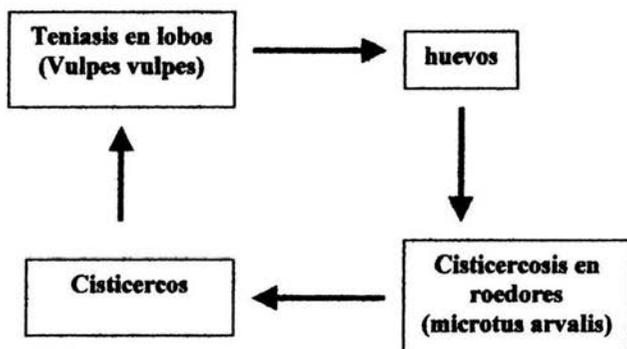


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. Las infecciones con estos parásitos ocurren de manera natural en animales salvajes. En el laboratorio, los cisticercos solo pueden ser mantenidas en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c. (Romano, *et al*. 2003).

4.1. Biología celular. Como fue indicado anteriormente, los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF han sido empleados como un modelo experimental murino de cisticercosis por sus características morfológicas y fisiológicas. La facilidad de la infección y sostenimiento de animales de experimentación son características que los hacen útiles en estudios en donde se requieren grandes cantidades de ellos y donde se requiere ampliar los estudios de estas formas larvarias para fines diagnóstico, obtención de vacunas y, como se muestra en este trabajo de tesis, fines de estudio de la biología celular de estos parásitos, ya que no existe nada al respecto.

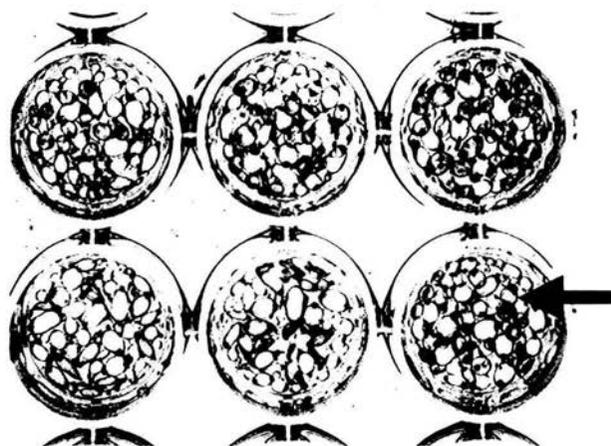
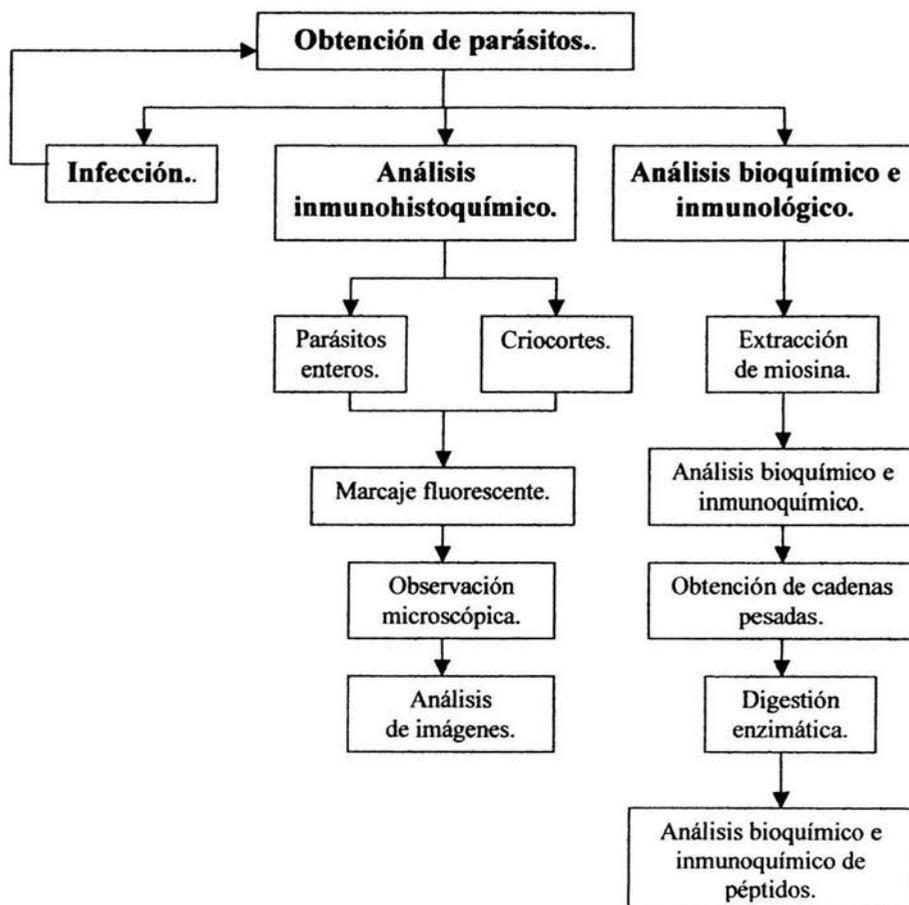


Figura 5. Cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Se muestran diferentes pozos que contienen varios cisticercos recién extraídos de la cavidad peritoneal de ratones Balb/C infectados durante 5 meses. En el caso señalado con la flecha se muestran cisticercos en proceso de gemación.

V. PARTE EXPERIMENTAL**1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

2. MATERIAL Y METODOS.

2.1 Obtención de parásitos.

En el presente proyecto de tesis se emplearon cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF (fig. 5). Estos parásitos fueron donados por el Dr. Ignacio Terrazas del Instituto Nacional de Cardiología. Para mantener la cepa, los cisticercos fueron inyectados por vía intraperitoneal en ratones hembras Balb/C a razón de 15 cisticercos por ratón. Después de 7 meses de infestación, los ratones fueron sacrificados por desnucamiento, se expuso su cavidad peritoneal y se lavó exhaustivamente con SSAF para la recuperación de los parásitos. Los parásitos obtenidos fueron divididos de acuerdo a los ensayos por realizar: una parte se reutilizó para infectar otros ratones, otra realizar para los ensayos inmunohistoquímicos y otra fue congelada o procesada para la extracción de la proteína.

2.2 Procesamiento de parásitos para los ensayos inmunohistoquímicos.

2.2.1. Parásitos enteros. Una vez que los parásitos fueron recuperados de la cavidad peritoneal de los ratones, fueron lavados dos veces con SSAF, fijados por su incubación con formaldehído al 4%, lavados en dos ocasiones con SSAF, e inmediatamente permeabilizados con una solución de Tritón X-100 (Sigma) al 2% en SSAF (37°C, 90 min). Transcurrido el tiempo, los parásitos fueron lavados nuevamente con SSAF, puestos a bloquear con ASB (Boehringer Mannheim) al 1% solubilizada en SSAF-Tween, lavados 3 veces con SSAF y SSAF-Tween e incubados con el anticuerpo policlonal anti-miosina (producido en el laboratorio) (1:1500) solubilizado en la solución de bloqueo. Para el revelado del anticuerpo, los parásitos fueron lavados 3 veces con SSAF y SSAF-Tween e incubados con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a biotina (Lab Vector; dilución 1:30) solubilizado en la solución de bloqueo. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, los cisticercos fueron lavados 3 veces con SSAF-Tween y SSAF e incubados con avidina-rodamina (Lab Vector; dilución 1:200) en SSAF. Para la

observación microscópica, los parásitos fueron lavados 3 veces con SSAF y colocados en un portaobjetos. La fijación de la preparación se hizo por adición de unas gotas de solución de montaje (medio de montaje para fluorescencia; DAKO) para preservar la fluorescencia y las laminillas fueron guardadas a 4°C hasta su posterior observación al microscopio de fluorescencia confocal.

En todo lo que se refiere a incubación o bloqueo, las muestras fueron incubadas durante 1 h a 37°C.

2.2.2. Criocortes de tejidos. Para la obtención de los cortes, una vez que los parásitos fueron recuperados y lavados, se les sumergió en un medio de montaje para cortes en congelación (Tissue-Tek) e inmediatamente se les sumergió en nitrógeno líquido en donde se les mantuvo hasta su procesamiento. Para la obtención de los cortes de los parásitos congelados, los bloques fueron procesados en un crióstato (Leica) y se obtuvieron cortes congelados de 10 μ de grosor. Las laminillas con los cortes fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Previo al proceso de marcaje, las laminillas fueron descongeladas, fijadas durante 5 min con acetona fría, secadas al aire, lavadas con SSAF y SSAF-Tween y secadas. Los cortes fueron bloqueados con ASB al 1% en SSAF-Tween, a 37°C por una hora y luego lavados con SSAF y SSAF-Tween. La incubación con los anticuerpos primarios, secundarios, avidina conjugada a rodamina, y el montaje permanente de las laminillas, fueron procesos que se siguieron de la misma manera que se indicó en la sección de marcaje fluorescente de los parásitos enteros (inciso 2.2.1).

2.3 Extracción de miosina tipo II.

La miosina fue obtenida siguiendo los pasos para el aislamiento de filamentos gruesos y delgados de músculo de invertebrados (Szent-Györgyi *et al*, 1971), con varias modificaciones. Luego de haber lavado a los cisticercos con SSAF, ellos fueron nuevamente lavados con la solución A (ver apéndice), homogenizados en presencia de inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche) mediante el empleo de un politron (Brinkman Instruments) bajo condiciones de homogenización a una graduación de la velocidad intermedia (de acuerdo a las

características el equipo) durante 10 segundos en presencia de un baño de hielo. El homogenizado resultante fue centrifugado (centrifuga BECKMAN modelo J2-21, rotor JA20) a 10 000rpm, 5 min, 4°C y el botón obtenido fue resuspendido en solución A; luego, nuevamente, la suspensión fue centrifugada bajo las mismas condiciones. El botón obtenido fue resuspendido en la solución B (ver apéndice en lo referente a las soluciones para aislamiento de miosina), a la cual le fueron adicionados EDTA 0.1mM, ATP 5mM (Boehringer Mannheim) y una tableta de inhibidores de proteasas completo (Roche) y se le sometió a agitación en baño de hielo por 10 min. La suspensión resultante fue centrifugada a 80 000g, 20 min, 4°C. Posteriormente, el botón fue recuperado, resuspendido en solución B en presencia de EDTA 1mM e inhibidores de proteasas completo y la mezcla se puso en agitación continua durante 10 min. Nuevamente, la suspensión resultante fue centrifugada a 80 000g, 20 min, 4°C. El botón obtenido fue resuspendido en la solución B' (ver apéndice) en presencia de KCl 0.4M, MgCl₂ 5mM, ATP 3mM y una tableta de inhibidores de proteasas libres de EDTA. Esta suspensión final fue la correspondiente a miosina y para intentar su aislamiento, fue sometida a ultracentrifugación (100 000g, 4h, 4°C). Luego, el sobrenadante obtenido se consideró el correspondiente a la miosina purificada de cisticercos de *T. crassiceps*.

2.4 Análisis bioquímico e inmunoquímico de miosina aislada.

Hubo dos tipos de evaluación: Una para el análisis general de la extracción y otro para la evaluación de la proteína purificada. Para el primer análisis se hizo fraccionamiento de las proteínas mediante electroforesis (Laemli, 1970), utilizando una cámara miniprotean III y una fuente de poder Power pac 3000, (Bio Rad), en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, bajo condiciones reductoras, y posterior tinción de los mismos con azul de Coomassie brillante (Meyer, y Lamberts, 1965). Luego, para el análisis de la miosina aislada, algunos de los pasos del proceso de aislamiento fueron evaluados y éstos correspondieron a extracto crudo, precipitados que contenían a la miosina y el sobrenadante en donde se recuperó a la miosina soluble (ver inciso 2.3). En estos casos, las

proteínas fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida al 8% y procesadas como se indicó anteriormente. Estos análisis fueron hechos por duplicado. Luego, en caso de la evaluación inmunológica de la proteína aislada, una vez que los geles fueron recuperados de la electroforesis, se pusieron en contacto con membranas de PVDF para la electrotransferencia de las proteínas contenidas en ellos. La electrotransferencia se realizó de acuerdo a lo descrito por el fabricante, en un equipo Trans-blot SD, semi-dry transfer cell. La identificación de las proteínas electrotransferidas por los anticuerpos se realizó por ensayos de reconocimiento con un anticuerpo policlonal anti-miosina de *T. solium* (Kumar *et al*, 2003) diluido 1:17 000 en ASB al 1%. Previamente se demostró que este anticuerpo había reaccionado positivamente, por ELISA, a extractos totales de cisticercos de *T. crassiceps* (Cruz-Rivera M, comunicación personal), así como de parásitos adultos de *Fasciola hepática* (Kumar *et al*, 2003). Luego, para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo, se empleó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Zymed) y la reacción fue revelada con DAB y H₂O₂. Las bandas reveladas, tanto por tinción de los geles, como por reacción de la DAB y H₂O₂, fueron capturadas y analizadas como se indica en el inciso 2.8 relacionado con el análisis computacional.

2.5 Obtención de bandas de miosina.

Una vez evaluada la miosina aislada se procedió a su recuperación, para lo cual la proteína (aproximadamente 10µg con respecto a una curva de miosina de cadena pesada comercial de conejo (Sigma), analizada bajo las mismas condiciones de electroforesis) fue nuevamente fraccionada en electroforesis con geles de poliacrilamida al 8% y los geles resultantes fueron tratados bajo el método de tinción reversible de Zn-imidazol (Fernández-Patron *et al*, 1995). Una vez identificadas las bandas de interés, situadas en los 250 kDa, éstas fueron cortadas de los geles, colocadas (cada una por separado) en tubos Eppendorf de 500 µl, desteñidas con EDTA 0.5M y lavadas por 3 ocasiones con agua destilada. Luego, las bandas fueron lavadas por 5 min con 300 µl de acetonitrilo al 50% y mantenidas en agitación suave en un agitador vortex durante ese tiempo.

Transcurrido el tiempo, la solución fué sustituida con 300 μ l de una solución de acetonitrilo al 50%/NH₄HCO₃ 50mM ajustada a pH 8.0 y mantenida en agitación suave. Finalmente, se realizó un lavado con 300 μ l de otra solución compuesta de acetonitrilo al 50%/NH₄HCO₃ 10mM ajustada a pH 8.0 y mantenida en agitación. Durante los lavados de las bandas con las soluciones que contenían el acetonitrilo, éstas fueron sometidas a agitación suave durante 30 min a 4°C. Finalmente, la solución fue eliminada y las bandas fueron sometidos a deshidratación en un equipo de microcentrifugación al vacío (Labnet) durante una hora. Una vez secas las bandas, los tubos que la contenían fueron sellados y almacenados en el congelador hasta su uso posterior.

2.6 Digestión enzimática con quimotripsina de miosina aislada.

Una vez secadas las bandas de miosina y para determinar su perfil peptídico por digestión enzimática controlada, ellas fueron sometidas a digestión (Cleveland *et al*, 1977) a 37°C bajo diferentes tiempos de incubación (30, 60 y 120 minutos). El tiempo 0, considerado como control, consistió en la incubación de las bandas de miosina en presencia de la solución amortiguadora de NH₄HCO₃. Pevio a la incubación de las muestras, para su digestión enzimática, ellas fueron incubadas a 4°C durante 30 minutos para permitir que las bandas se impregnaran con la enzima previo a la digestión de las proteínas. Todas las digestiones de la proteína se realizaron por duplicado. Para estos fines, la quimotripsina (1 μ g/ μ l) fue preparada en una relación 1:40 con una solución amortiguadora de NH₄HCO₃ 10mM ajustada a pH 8.0. Luego, esta preparación fue mezclada con las bandas de miosina de tal forma que el volumen final agregado fuera suficiente para cubrir a las bandas. Transcurrido el tiempo de las digestiones, excepto a las bandas del tiempo 0, a las bandas se les adicionó un volumen igual, al que ya tenían, de solución amortiguadora de NH₄HCO₃ y éstas fueron incubadas inmediatamente a 37°C bajos los tiempos de incubación con la enzima ya indicados. Transcurridos los tiempos de incubación con la quimotripsina y con la finalidad de parar la reacción enzimática, a los tubos se les adicionó el mismo volumen de solución de Laemmli y se les incubó a 100°C durante 2 min. A las bandas del tiempo 0 se les

adicionó la misma solución y se les sometió al mismo procedimiento indicado para la digestión enzimática. Finalmente, todas las muestras fueron analizadas por electroforesis, en geles de poliacrilamida al 8%. Para estos fines, las bandas tratadas fueron colocadas, cuidadosamente, a lo largo del interior de cada uno de los carriles del gel separador que se preparó al respecto. Los carriles fueron preparados con peines de 1.5 mm de grosor, de 8.2 cm de largo y 5 dientes de 1.3 cm cada uno. Terminada la electroforesis, los geles resultantes fueron teñidos con nitrato de plata (Merril y Goldman, 1984) y el análisis de los péptidos se realizó como se indica en el inciso 2.8. Para el análisis de los péptidos producidos y reconocidos por el anticuerpo policlonal anti-miosina, los geles fueron procesados como se indica a continuación.

2.7 Inmuno-electrotransferencia de péptidos de miosina.

Una vez que las proteínas fueron separadas por electroforesis se les electrotransfirió a membranas de PVDF bajo condiciones definidas (5V, 10min; 13V, 15min; 20V, 25min y 25V, 10min). El gel resultante de la transferencia fue teñido con plata, mientras que la membrana fue bloqueada con ASB al 1% (1h, agitación constante, T.A.). Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces con SSAF-Tween y luego 3 veces con SSAF. Cada uno de los lavados fue realizado durante 4 min. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo antimiosina policlonal (1:17 000) diluido en SSAF-Tween y ASB al 1%, se les puso en agitación suave durante algunos minutos para favorecer la impregnación de las membranas y luego se les guardó a 4°C toda la noche. Al otro día, las membranas fueron lavadas, nuevamente, con SSAF y SSAF-Tween como se indicó previo a la adición del anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:2000) diluido en SSAF-Tween y ASB al 1% fue efectuado durante 1h a temperatura ambiente y con agitación suave y continua. Finalmente, las membranas fueron lavadas alternadamente con SSAF y SSAF-Tw durante todo el día, con intervalos de 10 minutos cada lavado. Al siguiente día de la adición de los anticuerpos, las membranas fueron sometidas a revelado por quimioluminiscencia de acuerdo a las recomendaciones del

fabricante (Supersignal West Pico Chemiluminescence kit Pierce Chemical Co). Los registros de las fluorografías fueron hechas en película Kodalith MP II y el revelado de las mismas se hizo con reactivos de fijación y revelado de Kodak, para este tipo de películas, a diferentes intervalos de tiempo. Luego, una vez reveladas las placas, las imágenes de éstas fueron capturadas y analizadas de acuerdo a como se indica en el inciso 2.8.

2.8 Análisis computacional de péptidos de miosina.

Los análisis y la captura de imágenes fueron realizados mediante el sistema de análisis e imagen de laboratorio de UVP, utilizando el programa de cómputo Lab Works Analisis Software v.3.0.02.00.

2.9 Análisis inmunohistoquímico de cisticercos de *T. crassiceps*.

Las observaciones y el registro de las imágenes obtenidas, luego de los análisis inmunohistoquímicos con los anticuerpos antimiosina, fueron registradas mediante un programa de cómputo Zeiss LMS Image software, luego de que las observaciones se hicieron con un microscopio confocal Zeiss Axiovert a través del sistema de observación Carl Zeiss Laser Scanning System LSM 510. Las observaciones fueron realizadas y registradas a tres diferentes aumentos: 10 x, 20x y 40x y, en el caso de los parásitos enteros, se hicieron observaciones a diferentes planos de corte de aproximadamente 1 μm .

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Obtención de parásitos.

Luego de 7 meses de infección, de la cavidad peritoneal de los ratones, fueron recuperados aproximadamente 60 ml de cisticercos y para las extracciones de miosina, fueron requeridos hasta 150 ml de parásitos. En todos los casos de infección de los ratones se obtuvo aproximadamente el 87% de infección, lo cual es un indicativo de la eficiencia del proceso.

2. Extracción de miosina tipo II.

Como se observa en la figura 6, el tratamiento permitió el enriquecimiento de al menos dos bandas diferentes de miosinas, situadas alrededor de los 250 kDa. Según lo observado, a lo largo del enriquecimiento y en el peso molecular mencionado, tres bandas se presentaron desde los extractos crudos de los parásitos (carril 2 de la fig. 6), se mantuvieron durante los tratamientos de centrifugación, separación por variación de la fuerza iónica del medio y adición de sales de Mg^{2+} , K^+ y ATP (carriles 4, 11 y 16 de la fig. 6 respectivamente) y sólo en el enriquecido de miosina (carril 19 de la fig 6) se observaron dos bandas; una predominante con respecto a la otra, la cual presentó un menor peso molecular según lo destacado por la tinción por azul de Coomassie y el análisis computarizado. Aún cuando otras bandas de menor peso molecular (menores a 250 kDa) también fueron observadas durante el proceso de purificación, sólo se consideró para los fines del presente proyecto el discutir lo relacionado con las que podrían corresponder a miosinas II. Este tipo de miosinas, incluyendo sus isoformas, presentan un peso molecular situado por arriba de los 200 kDa (Sellers, 1999; Schiaffino y Reggiani, 1994; Talmadge y Roy, 1993; Picard *et al*, 1999) y por lo consiguiente, es posible que el proceso de purificación empleado permita el enriquecimiento de diferentes isoformas de miosinas tipo II de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Cuando se hizo el análisis computacional de las bandas indicadas en la fig 7, utilizando como base el marcador de peso molecular mas alto incluido en la misma figura (PM=250 kDa), se encontró que las dos bandas del carril 19 presentaron pesos moleculares promedios de 284 y 250 kDa,

respectivamente. Mientras que, la otra banda (situada, según un promedio, en 293 kDa) pudo haberse perdido por el proceso de enriquecimiento empleado.

Debido que en el enriquecimiento de miosina, mostrado en el carril 19 de la fig. 6, había copurificación de otras proteínas (como la de 98 kDa y que podría corresponder a la paramiosina, otra proteína muscular), se consideró conveniente para la continuación del proyecto el aislar, por corte en el gel de poliacrilamida, la banda correspondiente a miosina y con ella que se realizaron los ensayos de digestión enzimática para obtener el perfil peptídico de la miosina aislada de esta forma. Posiblemente, ya que no fue evaluado, la actina estuvo presente desde el inicio del análisis electroforético, como se observa en la fig. 6 (indicado por una flecha) en el intervalo de los marcadores de PM de 50 y 37 kDa.

3. Análisis bioquímico, inmunoquímico y computacional de miosina aislada y sus péptidos.

En la figura 8 se muestra el patrón electroforético de la banda de miosina indicada en las figuras 6 y 7 durante algunos pasos de su extracción: fases soluble del extracto crudo (carril 2), fases insolubles de las centrifugaciones efectuadas (carriles 3-9) y fase soluble del enriquecido de miosina (carril 10). La banda de miosina fue la proteína predominante en el enriquecido final, aunque también fue enriquecida otra banda situada en ~98 kDa y la cual podría corresponder a paramiosina. Es conocido que durante el proceso de purificación de miosinas en invertebrados (Epstein *et al*, 1985; Medeiros *et al*, 1998; Szent-Gyorgi *et al*, 1971), la paramiosina copurifica y que ello se debe a las propiedades con las que interacciona con la miosina II (Cohen, 1982; Epstein *et al*, 1985; Szent-Gyorgi *et al*, 1971) ya que incluso se encuentra localizada en las mismas fibras musculares (Epstein *et al*, 1985).

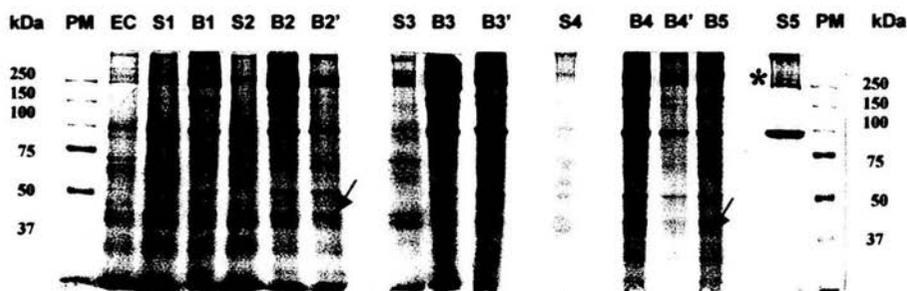


Fig 6. Extracción de miosina II de cisticercos de *T. crassiceps*. Extractos enriquecidos de proteínas filamentosas fueron procesados mediante variaciones de fuerza iónica del medio, en combinación con centrifugaciones diferenciales, para el enriquecimiento de la miosina II, (señalada con un asterisco). Las etapas del enriquecimiento son mostradas en los carriles numerados y los geles de poliacrilamida resultantes fueron teñidos con azul de Coomassie: PM, Pesos moleculares comerciales (Bio-Rad); EC, Extracto crudo; S1, Sobrenadante recuperado después de la primera centrifugación a 10,000rpm; B1, Botón recuperado luego de la primera centrifugación a 10,000rpm; S2, Sobrenadante posterior a la segunda centrifugación a 10,000rpm; B2, Botón recuperado luego de la segunda centrifugación a 10,000rpm; B2', Botón resuspendido en solución B complementada con 0.1mM EDTA y 5mM ATP; S3, Sobrenadante obtenido después de la centrifugación a 80,000g; B3, Botón recuperado luego de la tercera centrifugación a 80,000g; B3', Botón resuspendido en solución B complementado con 1mM EDTA; S4, Sobrenadante obtenido después de la segunda centrifugación a 80,000g; B4, Botón recuperado luego de la segunda centrifugación a 80,000g; B4', Botón resuspendido en solución B' complementada con 0.4M KCl, 5mM MgCl₂ y 3mM ATP; B5, Botón obtenido después de la centrifugación a 100,000g; S5, Sobrenadante correspondiente a miosina semipurificada luego de la centrifugación a 100,000g. La flecha indica la posible posición de la banda de actina.

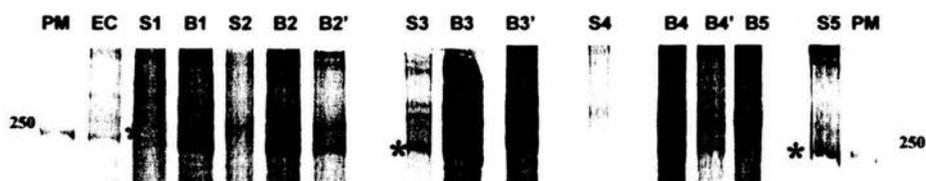


Figura 7. Presentación de isoformas de miosina. Se muestra una ampliación de los geles de poliacrilamida, de la figura anterior, de la región que comprende a bandas localizadas por arriba de los 250 kDa en donde se encontraba situada la banda de miosina II (asteriscos). En los carriles EC, S1, B1, B2, S3, B3, B3', B4, B4', B5 se presenta mas de una banda de mas de 250 kDa.

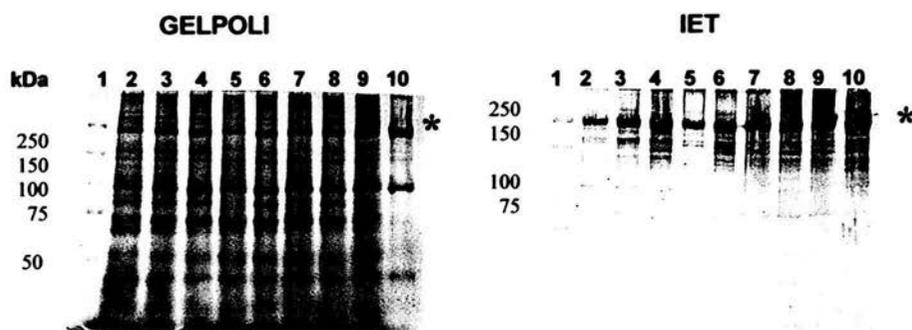


Figura 8. Análisis electroforético e inmunológico del enriquecimiento de miosina tipo II. Fracciones seleccionadas de la figura 6, correspondientes a las fases de enriquecimiento de miosina II (indicada por un asterisco) y relacionadas con los botones obtenidos luego de las centrifugaciones llevadas a cabo, son mostradas en los carriles numerados del 2 al 10 (GELPOLI). El carril 1, en ambas figuras, muestra a los marcadores de peso molecular utilizados en los ensayos. En el carril 10 se muestra a la miosina II enriquecida y a otras proteínas que copurificaron con ella y que por el peso molecular podrían corresponder a paramiosina (100 kDa) y actina (42 kDa). La figura correspondiente a la inmunoelectrotransferencia (IET) muestra a las proteínas transferidas de GELPOLI a una membrana de PVDF, la cual fue hecha reaccionar con anticuerpos policlonales antimiosina y revelada con DAB y H_2O_2 .

Las proteínas enriquecidas fueron sometidas a electrotransferencia desde los geles de poliacrilamida a membranas de PVDF, hechas reaccionar con anticuerpos policlonales antimiosina y reveladas con DAB y H_2O_2 como se muestra en la figura 8. Como se observa, las bandas de proteínas correspondientes a miosina (GELPOLI), después de transferidas a la membrana (IET), fueron inmunoreconocidas intensamente con los anticuerpos a diferencia de otras bandas de menor peso molecular. La tinción con azul de Coomassie del gel, utilizado durante la transferencia de las proteínas, mostró que no todas las de alto peso molecular ($>$ a 98 kDa) fueron transferidas completamente (datos no mostrados); sin embargo, las que si lograron alcanzar la membrana fueron reconocidas eficientemente por los anticuerpos.

Debido a la intensidad del reconocimiento de la banda correspondiente a miosina, se decidió cortarla. Fue empleado, como parámetro para su localización

en los geles de donde se aisló, al marcador de peso molecular correspondiente a la cadena pesada de miosina situado en 250 kDa. Otras proteínas que copurificaron con la banda de miosina no interfirieron para su separación (según lo observado con la tinción reversible de Zinc-Imidazol mostrada en la fig. 9),

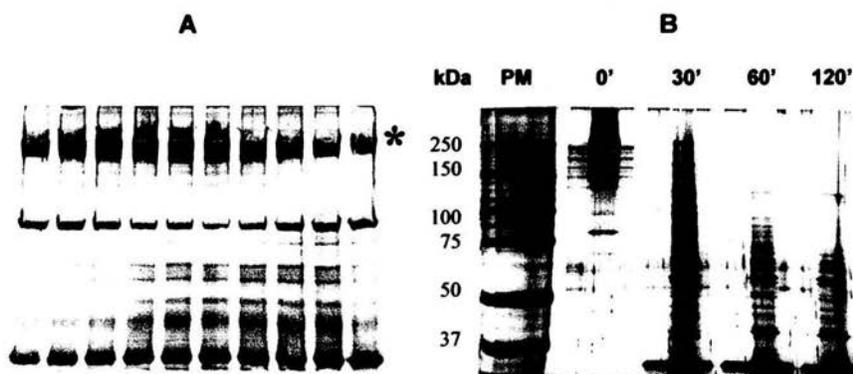


Figura 9. Identificación de miosina, su aislamiento y digestión enzimática. Posterior a la identificación de miosina como se indica en la fig. 8, las muestras que contenían a miosina enriquecida fueron separadas electroforéticamente y los geles resultantes fueron teñidos con Zinc-imidazol (A), la fracción correspondiente a miosina (indicada por una asterisco) fue separada del gel y sometida a digestión enzimática con quimotripsina (B); en B, una vez que las bandas fueron sometidas a digestión en diferentes tiempos de incubación, ellas fueron colocadas y separadas electroforéticamente como se indica en la figura. Posteriormente, los geles obtenidos de la digestión enzimática, fueron teñidos con nitrato de plata.

Una vez que la banda fue aislada y sometida a digestión enzimática, diferentes péptidos con pesos moleculares diversos, fueron obtenidos (B, figura 9); el número de péptidos y su aparente cantidad dependieron del tiempo de digestión de la proteína. Según la parte B de la figura 9, la digestión comenzó desde el tiempo 0, ya que fueron generados 12 péptidos situados entre los 237 y 40 kDa (ver tabla 1). Esto podría deberse a que la miosina originalmente situada en los ~250 kDa presenta una importante susceptibilidad a la enzima, aún cuando se emplearon condiciones de inhibición de la actividad enzimática como se describió en la parte correspondiente de materiales y métodos. Según los resultados presentados en la

tabla I, obtenidos de B en la figura 9, a los 0' fueron generados 13 péptidos; a los 30', 33; a los 60', 27 y a los 120', 19. En todos los tiempos, 17 péptidos permanecieron constantes a lo largo de la digestión enzimática: 33, 42, 45, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 60, 63, 66, 68, 70, 72, ~116 y ~125 kDa y destacan visualmente, por su concentración en los geles, 5 péptidos: 33, 40, 42, 60 y 125 kDa. Un péptido, el de 37 kDa, aparece a los 30' y 60', pero a los 120' en lugar de ese péptido, aparece otro con un peso molecular de 35 kDa. También, hay otro péptido, el de 40 kDa que aparece desde los 0', a los 30', se observa como una banda concentrada pero a los 60' disminuyó su intensidad y a los 120' desaparece. Esto fue contrario a lo que se encontró para el péptido de 42 kDa, el cual a los 30' fue apenas visible en el gel, mientras que, a los 60' y 120', estuvo presente de forma notoria. El péptido de 33 kDa no corresponde a la enzima utilizada en las digestiones, ya que la enzima presenta un peso molecular menor (~25 kDa) y los geles utilizados en los ensayos sólo permitieron la resolución de péptidos mayores a ~30 kDa. Por lo consiguiente, en estos ensayos no se pudo determinar la aparición o desaparición de péptidos menores a intervalo indicado. Los péptidos encontrados a los 30' de digestión, los cuales podrían no corresponder a los generados a los 0', fueron 23: 222, 209, 186, 137, 114, 107, 95, 88, 80, 75, 72, 68, 66, 65, 60, 57, 53, 51, 48, 45, 42, 37 y 33. A los 60' se encontró que desaparecieron todos los péptidos > a 126 kDa presentes en los 30' y sólo un péptido (el de 43 kDa) apareció de más con respecto a los 30'. La comparación de péptidos generados a los 120' y comparados con los de los 60', mostraron que 18 de ellos se mantuvieron, apareció uno con un peso molecular de 35 kDa, desaparecieron, el de 40. 65 kDa y 6 de ellos localizados entre 80 y 106 kDa.

El análisis del reconocimiento de los péptidos generados, los cuales fueron descritos en el párrafo anterior para la figura 9, mostró que tanto la banda correspondiente a la miosina, así como varios péptidos generados por la digestión, fueron reconocidos por el anticuerpo policlonal antimiosina de cisticercos de *T. solium* (Fig. 10). El revelado del reconocimiento de los anticuerpos por DAB (A, figura 10) y por quimioluminiscencia (B, figura 10) mostró que el número de bandas era semejante, aunque se encontraron diferencias con el reconocimiento

con quimioluminiscencia en donde se encontró una reactividad mayor, así como destacaron otros péptidos reconocidos. A los 0', con DAB, fue observado que la banda de miosina fue reconocida intensamente por los anticuerpos y otra banda situada en los 215 kDa fue reconocida con menor intensidad. Al revelado con quimioluminiscencia, esta última banda fue más notoria en su intensidad. A los 30', la quimioluminiscencia mostró que 22 péptidos fueron reconocidos por los anticuerpos; a los 60', 20 y a los 120', 10. Estos resultados muestran que el número de péptidos reconocidos por los anticuerpos disminuyó paulatinamente de acuerdo al tiempo de digestión enzimática y en los 120' se concentró el reconocimiento entre los péptidos de 30 a 70 kDa. Los péptidos específicamente reconocidos, descartando los mencionados a los 120', fueron a los 30', 10 péptidos: 73, 88, 98, 113, 125, 150, 185, 209, 245 y 269 y los de 60', fueron 7 péptidos: 84, 88, 92, 98, 105, 117 y 121. Los anticuerpos reconocieron 8 péptidos, de peso molecular semejante, que permanecieron de los 30' a los 120' de digestión: 30, 32, 44, 46, 48, 58, 61 y 70. Por lo consiguiente, es en estos péptidos en donde se encuentran los sitios específicos de reconocimiento de los anticuerpos policlonales anti miosina, los cuales se ha visto que solamente reconocen miosina de helmintos (Cruz-Rivera M, comunicación personal; González-Malerva L, comunicación personal; Kumar *et al*, 2003).

En lo que se refiere a la comparación de péptidos reconocidos por los anticuerpos antimiosina, comparados con los que fueron evidenciados por la tinción de plata a la que fueron sometidos los geles no utilizados para electrottransferencia, se encontraron diferencias en los péptidos reconocidos por los anticuerpos. A los 30', en los geles teñidos, 12 de los péptidos (42, 53, 55, 57, 65, 68, 75, 80, 83, 95, 107, 137 kDa) no tuvieron reacción con los anticuerpos; mientras que los anticuerpos si reconocieron un péptido de 30 kDa que aparentemente no fue revelado en los geles teñidos. A los 60', 10 péptidos (42, 43, 53, 55, 57, 65, 68, 72, 80 y 95 kDa) tampoco fueron reconocidos por los anticuerpos, mientras que tres fueron detectados (30, 34 y 92 kDa); uno de ellos, el de 30 kDa podría corresponder al reconocido por estos anticuerpos a los 30' y 120' y lo cual podría ser un indicativo de que este péptido mantiene el sitio de

reconocimiento de los anticuerpos a lo largo del proceso de digestión. A los 120', 10 péptidos (35, 41, 43, 52, 55, 66, 67, 72, 116 y 125 kDa) no fueron reconocidos por los anticuerpos y sólo el de 30 kDa fue el péptido que por el reconocimiento de los anticuerpos apareció en la inmunoelectrotransferencia.

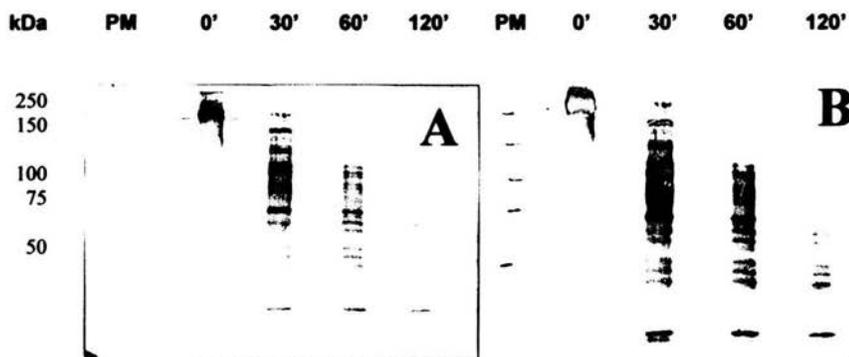


Figura 10. Evaluación del reconocimiento de péptidos de miosina por anticuerpos policlonales antimiosina. Las dos imágenes muestran geles procesados en condiciones idénticas luego de su separación electroforética e Inmunoelectrotransferencia a membranas de PVDF ; se hizo revelado con DAB y H_2O_2 (A) y por quimioluminiscencia (B). Se indican los pesos moleculares comerciales utilizados en los ensayos, mientras que en los siguientes carriles se muestran miosinas sometidas a digestión como se indicó en la figura 9 y hechas reaccionar con los anticuerpos policlonales antimiosina.

En los análisis de los péptidos reconocidos por los anticuerpos, se encontró que en diferentes tiempos de digestión hubo reactividad hacia determinados péptidos, pero que en el siguiente tiempo de digestión la reactividad desapareció. También se presentó el caso de que, en determinado tiempo, no había reactividad pero al siguiente tiempo de digestión ya apareció un péptido: P.ej. El péptido de 73 kDa, detectado en los 30', ya no fue encontrado en los 60' y 120'. Un péptido de 56 kDa fue reconocido a los 120', pero en los 30' y 60' no hubo reactividad de los anticuerpos hacia él. Un péptido de 92 kDa que apareció a los 60', no fue detectado ni a los 30' ni a los 120'. Los péptidos de 37 y 41 kDa presentes a los

30' y 60' se presentaron con intensidad débil y a los 120' ya no fueron detectados. Varias causas pueden dar origen a la aparición y desaparición del reconocimiento de los péptidos mencionados: Una de ellas podría deberse a la calidad de la resolución de la tinción de los geles ya que ello podría provocar que algunos péptidos no fueran claramente detectados en la tinción, pero si detectados por los anticuerpos. En el caso de las reactividades de los anticuerpos, las causas podrían estar relacionadas con pérdida del sitio de reconocimiento por el mismo proceso de digestión o aparición del mismo por, también, la digestión de las proteínas. De acuerdo a estos argumentos, es posible que estos péptidos en los que aparece o desaparece un epítipo podrían tener dentro de la constitución de sus aminoácidos a otros tales como la tirosina, el triptófano y la fenilalanina los cuales son los sitios de actividad enzimática de la quimotripsina. (Lehninger, 1981).

4. Análisis inmunohistoquímico y computacional de parásitos enteros y de sus cortes en congelación.

La figura 11, muestra la reacción inmunofluorescente de los anticuerpos policlonales antimiosina tanto en cisticercos completos y permeabilizados, como en sus cortes congelados. Debido a que las observaciones fueron realizadas con un microscopio confocal equipado con sistemas de registro de fluorescencia, se observó como la marca fluorescente estaba dirigida en el interior de los cisticercos, la cual fue obtenida por seccionamientos, a intervalos de 1 μm ; en la figura 11; A y B se muestran dos cortes realizados a diferente profundidad y observados a diferentes aumentos. Como se observa, la marca fluorescente estuvo asociada a fibras musculares internas tanto longitudinales como transversales, las cuales en algunas ocasiones parecieron formar parte de una red de fibras que no varió por la profundidad de observación. En el caso de los cortes congelados (Fig. 11; C, D y E), observados a diferentes aumentos, se encontró que la mayor intensidad del marcaje fluorescente estuvo asociada a la pared tegumental de los cisticercos como se observa en el aumento de 20 x (Fig. 11; C y D). A mayor aumento, 40 x, la marca fluorescente encontrada en esta región

estuvo asociada a una gran cantidad de fibras musculares de tamaño pequeño y lo cual era diferente de las fibras marcadas y observadas por abajo del tegumento como se observa mejor en la imagen C de la misma figura. Estas fibras musculares presentaron un mayor tamaño que las encontradas en el tegumento y no presentaron una distribución ordenada a diferencia de las del tegumento. En la imagen E de la figura 11 se observa que las fibras musculares aparentemente se distribuyen en forma de empalizada principalmente por abajo del tegumento y que, dentro de la zona del tegumento, las fibras están estructuradas conforme a los pliegues que presenta el tejido. La diferencia de la distribución de las fibras musculares observada para los parásitos completos y para los tejidos, es que mientras en los primeros las fibras fluorescentes presentan una distribución longitudinal acorde al cuerpo del parásito, en los segundos éstas están asociadas a la conformación del tejido observado. La intensidad de la marca fluorescente, en los tejidos, se observa que va de mayor a menor de tegumento hacia la región correspondiente a donde se encuentra el fluido vesicular. Siendo, en esta última región, en donde desaparece la marca fluorescente asociada a fibras musculares.

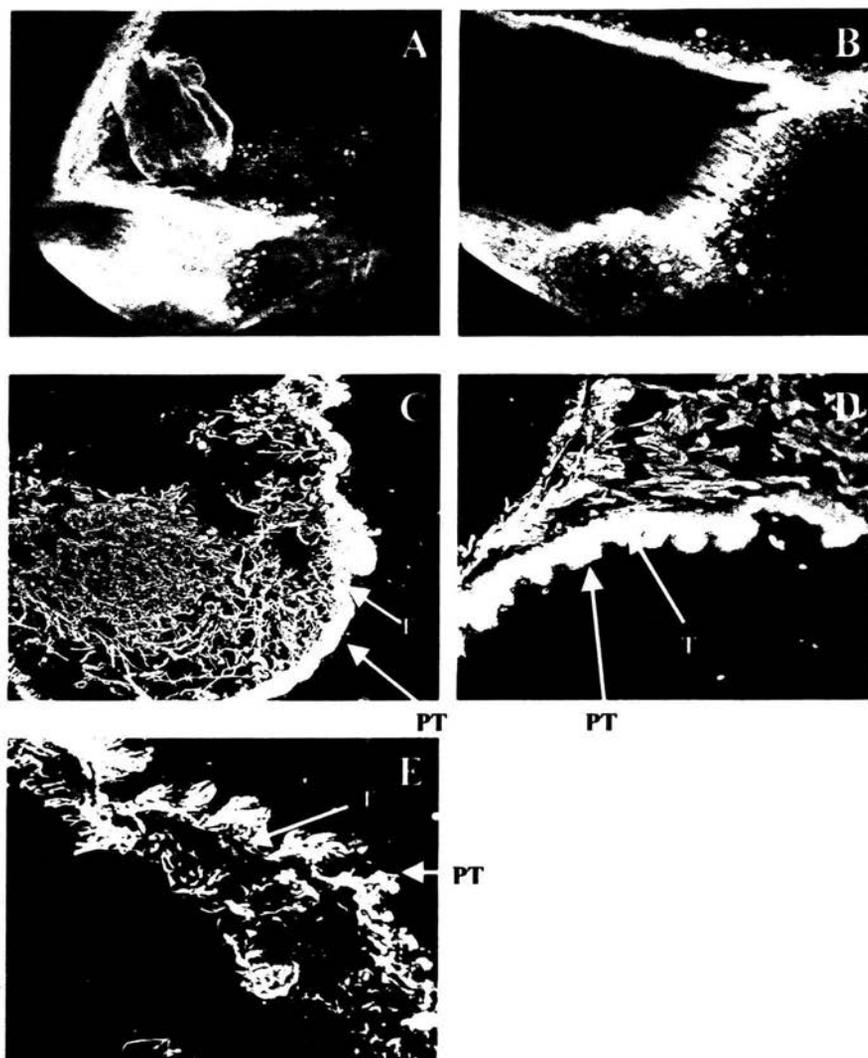


Figura 11. Inmunofluorescencia de anticuerpos policlonales antimiosina en cisticercos. Muestras observadas mediante microscopía confocal. Parásito entero observado a 10 x y 20x (A y B). Cortes de cisticercos observados a 20 x (C y D) y a 40 x (E). Los anticuerpos policlonales fueron hechos reaccionar con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados a avidina y con biotina conjugada a rodamina. Las observaciones se hicieron utilizando una fuente de emisión de rayos láser para rodamina. PT: Pared tegumental, T: Tegumento.

VII. CONCLUSIONES.

Según los resultados obtenidos, el éxito en la obtención de miosina II tuvo como base la variación de la fuerza iónica del medio de extracción como se observó en la figura 6. Otras proteínas fueron copurificadas durante el proceso, entre las que destacan una de peso molecular aproximado a los 98 kDa, la cual podría corresponder a paramiosina y otras 2 o 3 (dependientes de la etapa de purificación) situadas por arriba de la de miosina (> a 250 kDa). El reconocimiento de los anticuerpos policlonales antimiosina, utilizados en el presente estudio, hacia todas estas proteínas, es un indicativo de que las proteínas son miosinas o comparten epítopes con estas proteínas y las que se encuentran situadas por arriba de los 250 kDa corresponden a sus isoformas. Estos anticuerpos se ha demostrado que reconocen miosina II de diferentes estadios parasitarios de *T. solium* (Cruz-Rivera M, Comunicación personal) y de adultos de *Fasciola hepática* (Kumar *et al*, 2003). Cabe la posibilidad de que la proteína de 98 kDa sea paramiosina como se demostró utilizando, en extractos crudos de cisticercos de *T. solium*, un anticuerpo monoclonal antimiosina II de *T. solium* (Ambrosio *et al*, 1997). Se ha demostrado que en las fibras musculares de invertebrados se encuentran coexistiendo tanto miosina II como paramiosina y que ambas proteínas copurifican durante su extracción (Epstein *et al*, 1985; Madeiros *et al*, 1998; Szent-Gyorgy *et al*, 1971). La paramiosina presenta determinantes antigénicos semejantes a la miosina II que se encuentran en la región carboxilo terminal de ambas proteínas (Cohen y Parry, 1998). La confirmación de que las bandas situadas por arriba de la miosina II y reconocidas por los anticuerpos son sus isoformas tendrá que ser definido mediante análisis electroforético para este tipo de proteínas (Pickard *et al*, 1999; Talmadge y Roy, 1993), lo cual permitirá su adecuada separación e identificación luego del uso de inmunolectrotransferencia revelada con anticuerpos antimiosina específicos.

Aparentemente, la susceptibilidad de la miosina II aislada de *T. crassiceps* es mayor que la presentada a la misma enzima quimotripsina en comparación, al tiempo 0', con la de miosina de *T. solium* (González-Malerva L, Comunicación personal). Esto implica que las proteínas, aún cuando son miosinas II, tienen una

diferente constitución de aminoácidos en ciertas regiones de las moléculas, lo cual se fortalece durante la comparación de los perfiles de digestión enzimática (a los mismos tiempos) para ambos tipos de miosina (datos no mostrados). Durante la digestión enzimática de miosina II de *T. crassiceps* se encontraron que algunos péptidos eran semejantes en peso molecular a los identificados y reportados por King *et al* (1995) durante la digestión enzimática de miosina II de molleja de pollo. Es posible que los péptidos encontrados entre 125 y 130 kDa correspondan al tallo, mientras que la región S1 o cabeza podría corresponder al de 98 kDa, la meromiosina ligera (LMM) a los de 88 kDa y finalmente, el subfragmento S2 podría corresponder al péptido encontrado a los 40 kDa y cabe destacar que estos péptidos han sido descritos durante el análisis de péptidos obtenidos durante la digestión de miosinas de músculo liso (Eddinger y Murphy 1988; King *et al*, 1995; Tashiro *et al*, 1985). La reactividad de los anticuerpos policlonales antimiosina se presentó contra todos los péptidos mencionados, lo cual es un indicativo de que en estos péptidos se encuentran sus sitios de reconocimiento específico, ya que se tienen evidencias de que estos anticuerpos sólo reconocen miosinas II de helmintos (Cruz-Rivera M, Comunicación personal; Kumar *et al*, 2003). Durante los diferentes tiempos de la digestión enzimática, varios péptidos obtenidos por debajo de los 72 kDa se mantuvieron sin variación alguna y su mayoría fue reconocida por los anticuerpos policlonales. Estos resultados son un indicativo de que estos péptidos representan los límites de la digestión enzimática de la miosina de *T. crassiceps* y podrían ser útiles para definir la composición y secuencia de sus aminoácidos específicos. Por ejemplo, el péptido de 32 kDa no varió durante el proceso de digestión, fue reconocido siempre por los anticuerpos y siempre se mantuvo en mayor concentración que los otros péptidos detectados. Dicha separación y determinación de aminoácidos podría llevarse a cabo mediante cromatografía de alta afinidad (HPLC) en combinación con microsecuenciación de degradación de Edman (Voet, 1992)

El marcaje fluorescente que se observó, tanto en parásitos completos como en sus cortes, está asociado a fibras musculares en las que se encuentra la miosina II. Esta aseveración se hace en función de que previamente ha sido

demostrado que estos mismos anticuerpos policlonales reaccionaron con este tipo de miosina presente en fibras aisladas, así como en extractos de proteínas filamentosas del tremátodo *F. hepática* (Kumar *et al*, 2003) y en miosina II aislada de *T. solium* (Cruz-Rivera M, comunicación personal; González-Malerva L, Comunicación personal). Aparentemente, la distribución de las fibras musculares, que contienen a la miosina II en los cisticercos completos, adopta la forma de los parásitos y en los cortes de los mismos, la miosina parece estar localizada de tal manera que podría estar asociada con los movimientos que el tejido requiere. Esta distribución tisular es diferente de la que adopta la miosina II, localizada por un anticuerpo monoclonal denominado 4B3, en las fibras musculares de tejidos de cisticercos de *T. solium* (Ambrosio *et al*, 1997).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis muestran que ha sido posible el aislamiento y caracterización parcial de miosina II de cisticercos de *T. crassiceps* y la cual, aparentemente, es específica de estos parásitos cuando se les compara con lo estudiado en cisticercos de *T. solium* (Ambrosio *et al*, 1997; 2001; Cruz-Rivera M, Comunicación personal; González-Malerva L, Comunicación personal), con cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa WFU (Mendoza A, comunicación personal) e incluso, con adultos de *F. hepática* (Kumar *et al*, 2003). Asimismo, se plantea la posibilidad de que otras isoformas de miosina II y paramiosina estén siendo expresadas en los parásitos estudiados, como también ha sido evidenciado con *T. solium* (Cruz-Rivera M, Comunicación personal; González-Malerva L, Comunicación personal) lo cual podría ser posteriormente estudiado.

VIII. REFERENCIAS.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Molecular biology of the Cell. Fourth edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. Capitulo 16. The cytoskeleton: Molecular motors. 2002. pp. 949-952

AMBROSIO J, CRUZ-RIVERA M Y, ALLAN J, MORÁN E, ERSFELD L, FLISSER A. Partial characterisation of a myosin-like protein of *Taenia solium* parasites. *Parasitology* 1997. 14(6):545-553.

AMBROSIO J. Identificación, aislamiento y caracterización parcial de miosina tipo II en *Taenia solium*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. Noviembre de 2001.

CLEVELAND D, FISCHER S, KIRSCHNER M, LAEMMLI U. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biology Chemistry*. 1977. 252:1102-1106.

COHEN C. Matching molecules in the catch mechanism. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 1982. 79: 3176-3178.

COHEN C, PARRY D. A conserved C-Terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *Journal of Structural Biology*. 1998. 122:180-187.

DOWBEN RM. General Physiology. A molecular approach. Harper & Row Publishers, Inc. USA. Cpitulo 9. Contractility. 1969. pp. 483.

EDDINGER TJ, MUYPHY RA. Two smooth muscle myosin heavy chains differ in their light meromyosin fragment. *Biochemistry*. 1988. 27:3807-3811.

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.

FERNÁNDEZ-PATRON C, HARDY E, SOSA A, SEOANE J, CASTELLANOS L. Double staining of Coomassie blue stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of Coomassie blue undetected proteins. *Analytic Biochemistry*. 1995. 224:263-269.

GONZÁLEZ MALERVA L. Análisis del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales que reconocen miosina de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura (Q.F.B.). Escuela de Química, Universidad La Salle. Agosto de 1998.

HALTON DW, MAULE AG, MAIR GR, SHAW C. Monogenean neuromusculature: some structural and functional correlates. *International Journal for Parasitology* 1998. 28:1609-1623.

KING L, JIANG MJ, HUANG TS, SHEU GC. Protease susceptible sites and properties of fragments of aortic smooth-muscle myosin. *Biochemistry Journal*. 1995. 312: 511-518.

KUMAR D, FAIRWEATHER I, McGEOWN JG, REYNOSO-DUCOING O, AMBROSIO J. Observations on the musculature and isolated muscle fibers of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 2003. 127:457-473.

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.

LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227:680-685.

LARRY S. ROBERTS, JOHN JANOVY, JR. Foundations of Parasitology. Sixth Edition. Mc-Graw-Hill Higher Education. Capítulo 20. Cestoidea: Form, Function, and Classification of the Tapeworms. 2000. pp. 299-320.

LEHNINGER, ALBERT. Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. 2nd. Edition. New York. Capítulo 5. proteins: covalent backbone and amino acid sequence. 1981. pp. 106.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, SL., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, Molecular Cell Biology. Fourth Edition. Media Connected. Capítulo 18. Cell Motility and Shape I: Microfilaments. 2000.pag. 769.

LOWY J, HANSON J. The ultrastructure of invertebrate smooth muscles. *Physiological Reviews*. 1962. 42:34-47.

LUMSDEN RD, BYRAM III J. The ultrastructure of invertebrate smooth muscles. *Physiological Reviews*. 1962. 42:34-47.

LUMSDEN RD, HILDRETH MB. The fine structure of adult tapeworms. In *Biology of the Eucestoda*. (Arme C, Pappas PW editors). *Academic Press* New York. 1983.1: 190-205.

MAIR GR, MAULE AG, SHAW C, HALTON DW. Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitology Today* 1998.14 (2):73-76.

MEDEIROS NA, REESE TS, JAFFE TH, DEGIORGIS JA, BEARER EL. Primary peptide sequences from squid muscle and optic lobe myosin IIs: strategy to identify and organelle myosin. *Cell Biology International*. 1998. 22:161-173.

MEYER, TS. & LAMBERTS, BL. Use of Coomassie brilliant blue R-250 for electrophoresis of micrgram quantites of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biophysica Acta*. 1965. 107:144-145.

MERRIL CR., GOLDMAN D, VAN KEUREN ML. Gel protein stains: silver stain. *Methods Enzymology*. 1984. 104:441-7.

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.

PICARD B, BARBOIRON C, DURIS MP, GAGNIERE H, JURIE C, GEAY Y. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science*. 1999. 53: 1-7.

ROMANO MC, VALDEZ RA, CARTAS AL, GOMEZ Y, LARRALDE C. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. 85(2-3):221-225.

RÜEG JC. Muscle. In *human Physiology*. Schmidt RF, Thews G editors. Springer-Verlag, Berlin. 1989.

SELLERS JR. *Myosins*. 1999. Second Edition. Oxford University Press, New York.

SZENT-GYÖRGYI A, 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.

SMYTH JD, McMANUS DP. The physiology and biochemistry of cestode. *Cambridge University Press*. Capítulo 2. The adult cestode: special structural features relevant to its physiology. 1989. pp 5-34.

STITT AW, FAIRWEATHER I, TRUDGETT AG, JOHNSTON CF, ANDERSON SML. *Parasitology Research*. 1992. 78:96-102.

TALMADGE, ROBERT J., AND ROY RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Journal of Applied Physiology*. 1993. 75(5):2337-2340.

TASHIRO Y, KUMON A, YASUDA S, MURAKAMI N, MATSUMURA S. Two chymotrypsin-susceptible sites of myosin rod from chicken gizzard. *European Journal Biochemistry*. 1985. 148:521-528.

VOET D, VOET J. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. Capítulo 28. Estructuras y manipulación de los ácidos nucleicos. 1992. pp. 876-878.

IX. APÉNDICES.

1. Preparación de soluciones.

1.1 Soluciones para lavados.

SSAF 10X 2.62g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11.5g de Na_2HPO_4 , 87.5g de NaCl en 1000mL de agua destilada.

SSAF 1X Tomar 100mL de SSAF 10X y aforar a 1000mL con agua destilada.

SSAF-Tween Tomar 100mL de SSAF 10X y antes de aforar a 1000mL con agua destilada, agregarle 3mL de tween.

1.2 Soluciones para aislamiento de miosina.

Solución X $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2M.

Solución Y Na_2HPO_4 0.2M.

Mezcla A 19mL de solución X más 81mL de solución Y y aforar a 200mL.

Mezcla B 87.7mL de solución X más 12.3mL de solución Y y aforar a 200mL.

Solución A 0.04M KCl + 1mM MgCl_2 + 6.7mM de buffer de fosfatos (33.5mL de la mezcla A), pH 7.4.

Solución B 0.05M KCl + 1mM MgCl₂ + 6.7mM de buffer de fosfatos
(33.5mL de la mezcla B), pH 6.0.

Solución B' 0.05M KCl + 6.7mM de buffer de fosfatos (33.5mL de la
mezcla B), pH 6.0.

2. Tablas.

Tabla 1. Péptidos generados durante la digestión enzimática de miosina aislada.

PM (kDa)	0'	30'	60'	120'
(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)
250	252	252		
	237			
		222		
	204	209		
		186		
150	173			
	148	150		
		137		
	131			
100		128	126	125
		114	117	116
		107	106	
	98	98	98	
		95	95	
75		88	88	
	83	83	83	
		80	80	
		75		
		72	72	72
50	70	70	70	
		68	68	70
		66	66	67
		65	65	66
	63	63	63	63
		60	60	
		57		59
			57	56
	55	55	55	55
		53	53	
37		51	51	52
				50
		48	48	
				47
	46	46	46	
		45	45	45
				44
			43	
	42	42	43	
37	40	40	40	
				41
		37		
			37	
				35
Péptidos totales		33	33	32
	13	33	27	19

Tabla 2. Péptidos de miosina reconocidos por anticuerpos policlonales antimiosina y revelados con DAB luego de su transferencia a membrana de PVDF.

PM (kDa)	0'	30'	60'	120'
(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)
		268		
250	253	246		
	216	210		
		186		
153		150		
		125		
			121	
		113	112	
			105	
100				
		95	96	
			91	
		88		
			84	
75				
		73	73	
				71
			70	
		66	66	66
		62	62	
				61
		59	59	
				58
		52	52	
50				51
		49	48	
				48
		46	46	
				45
		45	44	44
		42		
			41	
		38	38	
37				
			36	
		33	33	32
		31	31	31
Péptidos totales	2	21	20	10

Tabla 3. Péptidos de miosina reconocidos por anticuerpos policlonales antimiosina y revelados por quimioluminiscencia luego de su transferencia a membrana de PVDF.

PM (kDa)	0'	30'	60'	120'
(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)	(mol.w.)
		269		
250	253			
		245		
	215	209		
		185		
150		150		
		125		
			121	
			117	
		113		
			105	
100			98	
		98		
			92	
		88	88	
			84	
75				
		73		
		70	70	
				70
		66	66	
				62
		61	61	
		58	58	58
				56
		52		
			61	
50				
				49
		48	48	
				47
		46		
			45	
		44	44	44
				43
		41		
			40	
		37		
37			37	
			34	
		32	32	
				32
		30	30	30
Péptidos totales	2	22	20	10