



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Perfil de Digestión de Actinas
Aisladas de diferentes Estadios
de Taenia solium”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO

PRESENTA:
MARIO ARMHEL MORALES FLORES

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNANDEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

2005

m 347794



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Perfil de Digestión de Actinas Aisladas de diferentes Estadios de Taenia solium."

realizado por Mario Armhel Morales Flores

con número de cuenta 9508472-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Propietario

Biól. Olivia Alicia Reynoso Ducoing

Propietario

M. en IBB. Alette Ortega Gómez

Suplente

Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Suplente

Dra. Rosa Estela Navarro González

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Agradecimientos y Dedicatoria

Gracias a toda mi familia por haberme apoyado moral y económicamente a lo largo de mis estudios y en especial en el desarrollo de este proyecto de tesis. Le agradezco y dedico esta tesis a mis abuelas Sara Ramos Espinoza y Rebeca Flores Ramos así como a mi tío abuelo Venancio Ggarcía Bolaños quienes desafortunadamente se marcharon antes de que terminara, pero les dedico esta etapa de mi vida y si están en algún lugar y aún pueden leer ¡aquí la tienen!. Y ahora a los vivos: a mi madre Leticia Morales Flores, a mi padre Guillermo Flores Ramos, a mi querido hermano Elias Adhair Morales Flores, a mi segunda mamá Virginia Flores Ramos, a mi tía Elvia García Flores (¡gracias por la impresión tía Vita), a mi tío Ernesto Sánchez Flores, a mi tercer madre Liova Flores Ramos, a mi tío Gustavo Garcia Flores, a mi tía Claudia Mora Flores, mi tía Sandra Mora Flores y mis tíos María Luis Gonzáles de Garcia y Eleazar Sánchez Argüelles. También a mis primos: Sergio “gusano” Sánchez García, Grizel García Gonzáles, Lizbeth García Gonzáles, Cinthia Sánchez García, Fernanda “bananita” Melendez Mora y Ernesto Sánchez Jr.

Muchas gracias a mi asesora, maestra y amiga Q. F. B. Laura Gonzáles Malerva a quien le agradezco tremendamente casi todo el conocimiento que aprendí en el laboratorio, ¡mil gracias Lau!

Gracias a mis asesores, compañeros de laboratorio y amigos: Dr. Javier R. Ambrosio Hernández, Biól. Olivia A. Reynoso Ducoing, Q.F.B. Mayra Cruz Rivera, Q.F.B. David García Vilchis, Señor Efrén, Isabel, Señora Lucha, Q.F.B. Cristina Paredes Salomón.

Gracias a mi gran amigo del CCH Omar Granados Robles con quien he pasado y pienso seguir pasando grandiosos y divertidos momentos, agradeciendo especialmente también a Azu, Martita y tu hermano “Tuga”.

Gracias al buen Ing. Jesús Flores “el Güero” con quien he compartido múltiples noches de juerga y muchas cosas chidas de la vida, ¡gracias Yisus!.

Gracias al clan femenino de ciencias: Ana Vásquez Camacho, Laura Ruiz Martines, Marcela Del Villar, Paulina, Natalia, Nayeli y Gina.

Gracias al clan masculino de ciencias quienes son una bola de ebriozooarios: Ari Franco Cea, Carlos Mendoza Palmero, Oscar Flores Mucifo, Jaime Cisneros Quifones y Armando.

Gracias a mi gran amiga Q. F. B. Angelica Reyes Torres y a su compañero Ricardo quienes son unas personas maravillosas y con quienes he compartido grandes momentos y aprendido muchas cosas.

Esta tesis es especialmente dedicada a Elisa Salinas Rojas mi querido amor y a quien aprecio, admiro, estimo y definitivamente soy fan. Para ti corazón con mucho cariño y feliz por que estas conmigo justo ahora.

Gracias a mancha y a willy gato.

Abreviaturas

AA	Aminoácidos
AcMc	Anticuerpo monoclonal
ARP (en inglés)	Proteínas de enlace a actina
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamino tetracético
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodaltones
PM	Peso molecular
PVDF (en inglés)	Polivinil difluoruro
SDS (en inglés)	Dodecil sulfato de sodio
PAGE (en inglés)	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos

Recursos:

Este trabajo de investigación se realizó en el Lab. De Biología del Citoesqueleto en el Departamento de Microbiología y Parasitología ubicado en la Facultad de Medicina de la UNAM. Bajo la dirección del Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, con apoyo de DGAPA a los proyectos con No. IN203900, IN201003-3 y CONACYT 43629-M.

*Soles occidere et redire possunt
Nobis cum semel occidit brevis lux
Hoc est perpetua una dormenda
Da mi basia mille, donde, cetum
Dem mille altera, dein secunda cintum
Dunde us que altera mille, dinde setum
Dein cum milla multa feceremus*

E. S. R.

Contenido General

I. Resumen.	1
II. Antecedentes.	2
1. Actina en los sistemas musculares.	2
2. Formas de estudio de actinas.	4
3. Importancia biomédica del estudio de <i>T. solium</i> .	7
4. Sistemas musculares y actina estudiados en <i>T. solium</i> .	10
III. Hipótesis y Objetivos.	10
IV. Materiales y Métodos.	11
1. Obtención de parásitos.	11
2. Evaluación de marcadores comerciales de bajo peso molecular.	11
3. Obtención de actina muscular de diferentes estadios parasitarios de <i>T. solium</i> .	12
4. Evaluación de las actinas obtenidas mediante análisis electroforético.	12
5. Digestión proteolítica de actinas con quimotripsina.	12
6. Reconocimiento de los péptidos de actina por anticuerpos monoclonales antiactina comerciales.	13
7. Adquisición de imágenes y análisis de los péptidos producidos mediante equipo computacional.	13
V. Resultados.	13
1. Extracción de actina.	13
2. Recuperación de actinas desde los geles.	14
3. Criterios para la elección de marcadores comerciales de peso molecular, utilizados en la estimación del peso molecular de los péptidos de actina resultantes de la digestión enzimática.	15
4. Digestión proteolítica de actina con quimotripsina.	17
5. Determinación del reconocimiento de actina y sus péptidos por parte de un anticuerpo monoclonal antiactina comercial.	20
6. Comparación de la digestión enzimática experimental contra la teórica para la actina de cisticercos de <i>T. solium</i> .	20

VI. Discusión.	22
VII. Conclusiones.	26
VIII. Apéndice.	27
IX. Hemerobibliografía.	31

Indice de Figuras	página
1. Actina monomérica y filamentosa.	3
2. Fases parasitarias de <i>T. solium</i>	8
3. Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	9
4. Evaluación electroforética de la extracción de actina de cisticercos.	14
5. Visualización de actina mediante tinción negativa.	15
6. Comparación de estándares de peso molecular.	16
7. Patrones peptídicos de diferentes actinas.	18
8. Reactividad del anticuerpo monoclonal antiactina hacia actina comercial y de cisticercos.	20
9. Secuencia de aminoácidos de actina de cisticercos de <i>T. solium</i>.	25

Tablas.

1. Determinación del peso molecular de los péptidos de actina comercial con base en 3 diferentes marcadores de peso molecular preteñidos.	16
2. Peso molecular de bandas producto de fragmentación enzimática a los 120 minutos de incubación.	19
3. Péptidos de actina producidos por su digestión enzimática con quimotripsina teóricamente.	21

I. Resumen

La actina es una proteína ubicua, altamente conservada a través de la evolución y con múltiples funciones celulares; el movimiento celular y la contracción muscular, en organismos animales multicelulares, son de las funciones más importantes que tiene esta molécula. Aún cuando es una proteína que se presenta en todos los organismos, no es idéntica, presenta variaciones en su composición de aminoácidos y por lo consiguiente en su estructura primaria, lo cual ha generado la aparición de isoformas que tienen diferente localización en una misma célula o entre diferentes tejidos. Cuando la actina monomérica (actina G) interacciona con otras actinas semejantes, forman polímeros de actina filamentosa (actina F), la cual puede ensamblarse o desensamblarse gracias a la acción de otro tipo de proteínas de unión a la actina. Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de actina se han aplicado gran variedad de técnicas bioquímicas y de biología celular, entre las que se encuentran la purificación, la electroforesis uni y bidimensional en gel de poliacrilamida, el reconocimiento por anticuerpos específicos y la digestión química o con enzimas, como la tripsina y la quimotripsina. En los estudios efectuados en el presente trabajo de tesis, se efectuó la caracterización bioquímica de actina monomérica aislada de tres fases de desarrollo distintas del cestodo *Taenia solium*, la cual incluyó electroforesis en gel de poliacrilamida, digestión proteolítica con α -quimotripsina bovina, análisis de péptidos por el reconocimiento de un anticuerpo antiactina monoclonal (AcMc C4), la comparación de las huellas de los péptidos de cada fase parasitaria en estudio (y con actinas digeridas de vertebrados seleccionados) y la comparación de lo obtenido con lo publicado para los genes de actina de estos parásitos. Los patrones peptídicos obtenidos se obtuvieron a diferentes tiempos de digestión enzimática. Los resultados muestran que fue posible la obtención de patrones peptídicos de todas las actinas estudiadas, que a la comparación de los mismos hubo variaciones entre las diferentes fases parasitarias y de los vertebrados y que el AcMc C4 utilizado reconoció a la actina y un péptido de 33 kDa aparentemente relacionado con el "core" de las actinas. Según las comparaciones con las bases de datos, hay posibilidades de que se tenga una idea de la secuencia de aminoácidos involucrada en el reconocimiento de los AcMc C4. De acuerdo a los resultados podría haber relación entre la expresión de actina a nivel tisular en los sistemas musculares lisos de *T. solium* con la expresión de sus isoformas, además, existe la posibilidad de recuperar fragmentos peptídicos específicos de cada fase parasitaria estudiada para determinar su exacta composición y secuencia de aminoácidos interna. Lo obtenido en la presente tesis permite mejorar el conocimiento de una de las principales componentes del citoesqueleto de *T. solium* y como puede variar en su expresión durante el desarrollo de estos parásitos.

II. Antecedentes

1. Actina en los sistemas musculares.

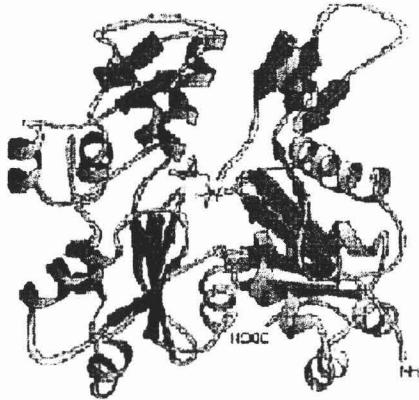
La actina es una de las principales proteínas estructurales de las células eucariontes con múltiples funciones. Participa principalmente en la contracción muscular y el movimiento celular (Khaitlina 1988, 2001; Mounier y Sparrow, 1997). Se presenta en dos formas: como actina globular o actina G (fig. 1a), que es la unidad monomérica y la actina filamentosa o actina F. La primera está constituida por un promedio de 375 aminoácidos que le producen, también en promedio, 43 kDa de masa molecular. Cada monómero de actina interacciona, para formar la actina F y por degradación del ATP a ADP, por medio de una región molecular que corresponde a la cabeza con la región, correspondiente a la cola, de otros dos monómeros (fig's. 1b y 1c). Los filamentos son fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro (Cooper, 2002) y una vez constituidos, participan en procesos celulares como la división celular, el cambio en la forma y el tamaño de la célula, la endocitosis, la fagocitosis, la exocitosis, la transducción de señales y la regulación de la actividad enzimática. Su función biológica en estos procesos celulares es diferente de la que se encuentra cuando participa en la contracción muscular como filamentos delgados de las miofibrillas de los diferentes sistemas musculares. Tanto en el citoesqueleto, como en los sistemas musculares, la dinámica de la actina F es dependiente del fenómeno de polimerización/despolimerización de los filamentos delgados (Khaitlina, 2001).

La actina es una proteína altamente conservada a través de la escala evolutiva en todas las especies. Existen isoformas de actina (isoactinas o isovariantes de actina) que se expresan según la especie, el tipo de tejido o el estado de desarrollo del organismo; en organismos vertebrados e invertebrados, las diferentes isoformas pueden ser clasificadas por su secuencia y su expresión génica tisular (Sheterline, Clayton y Sparrow 1998). Se les ha clasificado en dos tipos: 1. Actinas musculares α con cuatro isoformas; dos en el músculo estriado (esquelético y cardíaco) y dos en el músculo liso (entérico y vascular) y 2. Actinas no musculares con dos isoformas: β y γ . Estas últimas de localización citoplasmática. La diferencia entre las actinas musculares y las no musculares está basada en la cantidad y composición de aminoácidos que las forman, ya que las primeras contienen de 24 a 25 aminoácidos más del promedio de 375 que componen a estas proteínas. Cada una de las isoformas presenta una región saliente en el extremo amino terminal, región con la que las actinas interaccionan específicamente con miosina (Elzinga, 1975) al momento que se efectúan los fenómenos de contracción muscular. Para la realización de estos fenómenos se requiere de la interacción de isoformas específicas de miosina tipo II y de sus correspondientes actinas (Drew y Murphy, 1997). En las células no musculares, tanto el movimiento, como la división celular, dependen de la interacción de isoformas específicas tanto de actina como de miosina (Cooper, 2002).

Durante la contracción y el movimiento del músculo liso, la molécula de miosina II interacciona cíclicamente con la actina filamentosa e hidroliza a otras moléculas de ATP que le inducen cambios conformacionales (Morano, 2003). La actina F permanece estable, durante dicha interacción, en las células musculares, gracias a proteínas de enlace a actina estabilizadoras, como la tropomiosina y la troponina. A nivel de células intestinales o que presenten proyecciones digitiformes, éstas son sostenidas por filamentos de actina integrados en forma de ramilletes, los cuales son estabilizados por proteínas de lígulo cruzado-paralelo como la vellosina y la fimbrina, o de cruce antiparalelo como la actinina- α y de cruce desordenado como la filamina. Todas estas proteínas están relacionadas en el

acoplamiento de la región terminal de los filamentos, para lo cual intervienen la gelsolina, y la talina, la cual es una proteína que permite el anclaje a la membrana plasmática. Otras proteínas, que están relacionadas con el acoplamiento o desacoplamiento de los monómeros, son las limosinas, las profilinas y las cofilinas (Sheterline, Clayton y Sparrow 1998). Estas proteínas presentan un papel importante para la formación continua de los filamentos delgados (fenómeno conocido como intercambio rotatorio, en el que en los extremos de los filamentos están siendo adicionados o separados los monómeros) durante el movimiento celular o cambio de forma de las células bajo las condiciones a las que estén sometidas.

a)



b)



c)



Figura 1. Actina monomérica y filamentosa. a) Modelo molecular de la actina globular (actina-G), b) modelo de actina-F con las subunidades de actina-G y c) imagen de microscopía electrónica de barrido que muestra a la actina filamentosa (actina-F) o polimerizada. (Tomado de Alberts, 2003).

2. Formas de estudio de actinas.

Cristalización y microscopía electrónica. El primer reporte de cocrystalización de actina con DNAsa I fue realizado en la década de 1970 (Dos Remedios *et al*, 2003) y trece años después se obtuvo la primera estructura de resolución atómica (Kabsch, 1990). Los primeros cristales de actina muscular fueron obtenidos a partir de su aislamiento con polietilenglicol y su análisis posterior con difracción de rayos X (Dos Remedios *et al*, 2003).

La actina F se ha estudiado desde los años 60 y se encontró que está formada como una estructura helicoidal a lo largo de los filamentos (Hanson y Lowy, 1963). Posteriormente, y partiendo del modelo molecular de actina propuesto por Holmes (1990), múltiples autores contribuyeron a la construcción del modelo actual con el empleo de diferentes tecnologías como la microscopía electrónica (Kabsch *et al*, 1990; Orlova y Egelman, 1995; Orlova *et al*, 1997; Dos Remedios *et al*, 2003), la cristalografía con rayos X (Schutt, 1993; Dos Remedios, 2003) y la reconstrucción tridimensional (Orlova y Egelman, 1995; Orlova *et al*, 1997; Dos Remedios *et al*, 2003). Debido a que los filamentos de actina tienen el tamaño suficiente para ser observados al microscopio electrónico, mediante tinción negativa, ello se ha explotado para observar la interacción que tienen con otras proteínas como la espectrina (Cohen, 1980).

Para efectuar la caracterización bioquímica de la actina F se han empleado a la citocalasina B y la faloidina. Estas sustancias provienen de hongos venenosos del género *Amanita* (Wieland, 1981; Cooper, 1987). La citocalasina B se une al extremo menos dinámico de los microfilamentos (región -) e inhibe la asociación y disociación de las subunidades de actina (Cooper, 1987). Por otra parte, debido a que la faloidina se acopla con mayor afinidad a los microfilamentos genera un equilibrio entre los filamentos y los monómeros y por ello hay una disminución de la concentración crítica de polimerización (Estes, 1981; Cooper, 1987) y ello estabiliza a los microfilamentos. Esto ha generado que se utilicen derivados fluorescentes de la faloidina con la finalidad de localizar a la actina F, tanto en células vivas como fijas (Wehland, 1981; Wulf, 1979), así como para visualizar y evaluar el movimiento de filamentos individuales *in vivo* (Yanagida, 1984). La utilidad de la faloidina marcada fluorescentemente ha sido muy utilizada para la localización de la actina filamentosa en tejidos. Por ejemplo, en los invertebrados y en especial en los platelmintos, se han identificado diferentes sistemas musculares con distribuciones tisulares definidas de los microfilamentos (Hooge, 2001). Esto mismo se ha hecho para la fase larvaria de *T. solium*, en donde se ha propuesto que en los diferentes sistemas musculares podrían existir diversas isoformas de actina filamentosa (Ambrosio *et al*, 2003), lo cual tendría relación con el hallazgo de que en estos parásitos también existen isoformas de miosina (Gonzalez-Malerva *et al*, 2004).

Purificación. En todos los casos, la actina muscular se obtiene de muestras de tejidos musculares sometidos a homogenización y/o sonicación en presencia de soluciones salinas con alta fuerza iónica seguidas por extracciones con soluciones salinas de baja fuerza iónica. En algunos casos, cuando las cantidades de actina muscular y sus propiedades lo permiten (por ejemplo, cuando se obtienen a partir de tejidos de músculo esquelético, se obtienen los denominados polvos cetónicos, los cuales pueden ser almacenados indefinidamente para posteriores estudios de actina (Sheterline *et al*, 1998). Por otro lado, cuando la actina es obtenida de músculo liso, como en el caso de los invertebrados, el

proceso de extracción está basado en la extracción salina de baja fuerza iónica como lo recomendado por Szent-Geörgyi (1971). Actualmente, la mayor parte del conocimiento de la estructura y función de la actina se ha llevado a cabo con la purificación de músculo esquelético de conejo. La actina es una de las proteínas más importantes de todos los tejidos musculares ya que comprende cerca del 20% del peso de las proteínas del músculo esquelético, por lo que se logran obtener buenos rendimientos durante su purificación (de 0.4 a 0.5 g de músculos de conejo). El análisis de la actina purificada se efectúa por electroforesis en gel de poliacrilamida o por el reconocimiento de la misma por anticuerpos antiactina específicos en ensayos de electrotransferencia. En estos casos, la banda correspondiente a actina se localiza en los geles en el intervalo de los 43 kDa como regla general (Sheterline *et al*, 1998).

Caracterización bioquímica de isoformas. La identificación y comparación de proteínas contráctiles de fibras musculares de músculo liso y estriado muestran que hay expresión de isoformas de actina y que son diferentes entre dichos músculos. La expresión de estas variantes es coordinada aunque difiere, aparte del tipo de músculo, durante el desarrollo, en estados de crecimiento alterados (cultivo celular o patológicamente), y hasta en células del mismo tejido. Las relaciones entre otras proteínas musculares como las miosinas y los filamentos delgados generan propiedades contráctiles únicas. Por lo consiguiente, la expresión diferencial de isoformas de actina representa la diversidad funcional de las diferentes células musculares (Drew y Murphy, 1997) e incluso en otras células no musculares (Khaitlina, 2001).

Experimentalmente, la demostración de las isoformas se ha logrado mediante el empleo del isoelectroenfoque y se han identificado diferentes isoformas de actina en músculos liso, cardíaco y estriado. Con el uso de programas de computadora generadores de gráficos moleculares se han producido modelos atómicos, tanto de actina F como G, lo cual ha permitido explicar su diversidad funcional respecto a los aminoácidos que diferencian a cada una de las isoformas expresadas (Drew y Murphy, 1997). El empleo de la doble dimensión para la caracterización de isoformas de actina ha sido una estrategia muy utilizada para otros tipos de tejidos como en el caso de hojas de frijol *Phaseolus vulgaris*, de músculo esquelético de conejo (Díaz-Camino y Villanueva, 1999), de semillas de frijol y músculo de pollo (Villanueva *et al*, 1999) y de cisticercos de *T. solium* (Ambrosio *et al*, 2003). En algunas de ellas se ha combinado dicho análisis con tinciones con plata e inmunoelectrotransferencia de las proteínas. Otras formas de estudio de las isoformas ha sido, luego de la identificación de los genes que codifican para las actinas, el uso de la tecnología de DNA recombinante y lo que se ha obtenido al respecto sugiere que dentro de las células musculares, las isoformas de actina pueden ser utilizadas para la formación de miofibrillas (Rubenstein, 1990). En lo que se refiere a *T. solium*, se ha encontrado que las variantes de actina están localizadas en un peso molecular de ~45 kDa y podrían corresponder a 7 isoformas (Ambrosio *et al*, 2003), lo cual indica que aún hay otros genes por descubrir de la actina (sólo han sido caracterizado dos de ellos: Campos *et al*, 1990) o que hay modificaciones postraduccionales implicadas en la expresión de las actinas en estos parásitos.

Fragmentación química o enzimática. Una de las formas de caracterización bioquímica de las proteínas es su fragmentación y la evaluación de sus péptidos. Esto se puede efectuar químicamente o mediante la acción de enzimas proteolíticas específicas directamente en las proteínas en solución o luego de su separación electroforética *in situ* (Cleveland *et al*, 1977). Posteriormente, los péptidos obtenidos son evaluados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y/o electrotransferencia a membranas de

nitrocelulosa o PVDF al que posteriormente se somete a un análisis de inmunoquímica en el que se emplean anticuerpos definidos. Luego, de los patrones electroforéticos o de la inmunoelectrotransferencia, los péptidos seleccionados pueden ser recuperados e identificados a través de su análisis espectrométrico o mediante microsecuenciación de EDMAN. Luego con los resultados obtenidos, se logra determinar el tipo de proteína o la secuencia de aminoácidos que contiene y con ello se abre la posibilidad de hacer la búsqueda de los genes que la codifican en bibliotecas genómicas o de cDNA, con lo que se logra mejorar el conocimiento de su estructura o función (Westemeier y Naven, 2002). La evaluación electroforética de los péptidos permite la obtención de mapas peptídicos (en inglés "fingerprints"), luego de su digestión enzimática controlada. Otras formas de análisis de los patrones resultantes de la digestión enzimática son la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa o por separación de doble dimensión sobre una delgada capa de celulosa. Luego, con el análisis de los mapas peptídicos se establece la comparación de la estructura primaria de las proteínas y desde ahí se sospecha si ellas son codificadas por los mismos genes o por otros relacionados. Durante la evaluación de los péptidos que hayan sido seleccionados, no sólo se determina la composición y su secuencia de aminoácidos, sino que además se puede determinar que residuos de aminoácidos son modificados postransduccionalmente e incluso, en estos mismos péptidos, se puede determinar la localización de los epítomos involucrados en el reconocimiento de anticuerpos específicos (Rosenberg, 1996).

En el caso de actina, con la finalidad de conocer su estructura primaria y su interacción con otras proteínas, como las miosinas, se le ha sometido a digestión enzimática con tripsina y proteasa de la cepa A-2 de *Escherichia coli* (Khaitlina, 1988); quimotripsina (Elzinga y Collins, 1975; Ono, 1999); carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, termolisina, subtilopeptidasa A y pronasa (Elzinga y Collins, 1975) y proteólisis química (Elzinga y Collins, 1975). Luego, con los mapas peptídicos obtenidos de la digestión de actina con tripsina y la proteasa bacteriana, se encontró que uno de los péptidos (~36 kDa) corresponde al sitio de enlace a la DNasa I, el cual es un sitio que protege a la actina contra la proteólisis enzimática. Se ha propuesto que este tipo de estrategia permite efectuar estudios de la estructura y el mecanismo de polimerización de actina (Khaitlina, 1988). Luego, para determinar la secuencia de aminoácidos interna, los péptidos obtenidos fueron analizados por microdegradación de Edman automatizada con el uso de un secuenciador de fase sólida (Elzinga y Collins, 1975). Cabe mencionar que este método de determinación de secuencias no es aplicable a todas las actinas, ya que en muchos casos, éstas se encuentran bloqueadas en la región amino terminal (Rubenstein, 1990; Vandekerckhove y Weber, 1978) y ello impide el determinar la secuencia, como lo encontrado durante los intentos de secuenciación de las actinas de *T. solium* (Reynoso-Ducoing, comunicación personal) y por ello se justifica la obtención de péptidos de la proteína para determinar su secuenciación interna.

Se ha determinado, al comparar la estructura primaria de actinas de diferentes especies eucariontes, que son pequeñas las diferencias de secuencias de aminoácidos, debido a lo que se generan isoformas de actina. Estas isoformas son tejido-específico y se les ha encontrado en varias zonas intracelulares que están relacionadas con fenómenos morfo-fisiológicos diferentes (Herman, 1993; Janmey and Chaponnier, 1995; Gunning *et al.*, 1997; Ono, 1999). Las principales diferencias entre la secuencia primaria de las actinas está localizada en las regiones amino terminal (Rubenstein, 1990; Vandekerckhove y Weber, 1978), pero ellas son suficientes para que las actinas tengan diferentes propiedades bioquímicas que permiten isoformas específicas dependientes de las etapas de desarrollo en una misma especie o en un mismo tejido.

3. Importancia biomédica del estudio de *T. solium*.

T. solium es un parásito importante en la salud pública humana y presenta tres estadios de desarrollo el huevo (fig. 2a), la fase larvaria o cisticerco (fig. 2b) y la fase adulta o tenia (fig. 2c) (Flisser 1994). La fase larvaria produce cisticercosis y la fase adulta, teniosis. En las infecciones naturales, la cisticercosis afecta tanto a los seres humanos como a los cerdos, mientras que la teniosis es exclusiva del hombre (Flisser, 1997). En condiciones experimentales, la teniosis puede ser inducida en hámsteres dorados inmunosuprimidos y posteriormente infectados con cisticercos recuperados de carne de cerdo infectada naturalmente (Allan et al, 1993). El ciclo de vida del parásito (fig. 3) se presenta de la forma como se describe a continuación: Los huevos, contenidos en los segmentos denominados proglótidos grávidos que forman la cadena estrobilar distal de los parásitos adultos, son liberados hacia el exterior y contaminan la materia fecal humana. Ellos pueden llegar a ser ingeridos accidentalmente por cerdos o por humanos y una vez que alcanzan el estómago, las condiciones microambientales que ahí prevalecen (el jugo gástrico a nivel estomacal, primero, y el jugo intestinal posteriormente) son inductores para que los huevos pierdan su envoltura y eclosionen los embriones hexacanto formándose las oncosferas (Cheng, 1978). Posteriormente, estas oncosferas penetran la pared intestinal y alcanzan los capilares linfáticos y sanguíneos por cuya corriente son transportadas a cualquier tejido del organismo hospedero. Entre 60 y 70 días después, las oncosferas se transforman en cisticercos y los parásitos se establecen principalmente en el sistema nervioso central, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo, lo cual provoca la cisticercosis tanto en cerdos como en humanos (Flisser, 1999). Cuando el ser humano ingiere carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida infestada de cisticercos la digestión de la carne de cerdo y los cisticercos vivos son activados por las enzimas digestivas pepsina y tripsina, así como por las sales biliares, lo que ocasiona la evaginación de su escólex. Posteriormente, la porción cefálica tiene libre tanto las ventosas como los ganchos, esto permite que el parásito se fije, por las ventosas, a la mucosa intestinal y que ello induzca a que salgan los ganchos y se sujeten a la submucosa, favoreciendo la fijación firme del parásito al intestino (Cañedo, 1982). Una vez que los parásitos se han fijado con su porción cefálica, se empieza a desarrollar la cadena estrobilar. Durante este proceso, los proglótidos formados se diferencian y los que resultan grávidos, por contener miles de huevos, pueden ser liberados en la materia fecal del hospedero o bien, romperse dentro del intestino y favorecer que los huevos salgan junto con la materia fecal del hospedero y que el ciclo biológico de *T. solium* se cierre.

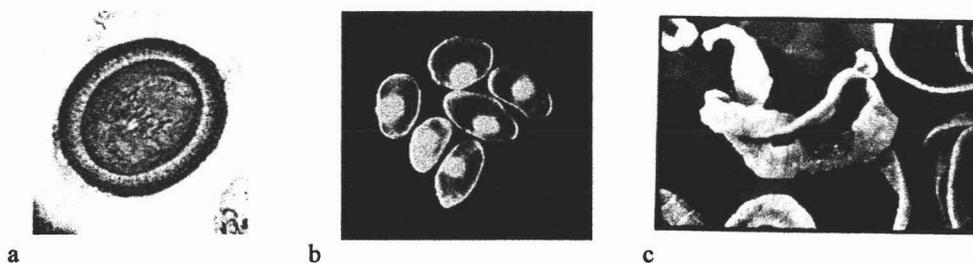


Figura 2. Fases parasitarias de *T. solium* a) Huevo. El embrión hexacanto, del cual se distinguen sus ganchos al centro del huevo, está protegido por una capa de material cementante refringente (Imagen tomada de <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/tael.jpg>). b) Cisticercos. Se muestran parásitos recién recuperados de la carne de cerdo infectado naturalmente. Se observa la forma vesicular de los parásitos, los cuales en su interior albergan al escólex invaginado. Dentro de las vesículas y rodeando al escólex, se encuentra el fluido vesicular que da volumen a los parásitos. c) Tenia. Se observa una porción de la cadena estrobilar de una tenia recuperada de una persona infectada. Se logran distinguir los diferentes segmentos, correspondientes a los proglótidos, los cuales dependiendo del sitio en los parásitos presentan diferentes tamaños.

La presencia del parásito adulto en el intestino es conocida como teniosis y el individuo que presenta la enfermedad es conocido como un portador de *T. solium*. Dado que esta infección no produce alteración importante en la salud del hombre infectado, ello se convierte en un vehículo ideal que permite la diseminación de la cisticercosis humana y porcina y los individuos son portadores asintomáticos. Debido a ello es que la identificación de individuos con teniosis es de suma importancia en la salud pública, su detección y tratamiento son de efecto inmediato en la prevención de la cisticercosis y la teniosis. Actualmente, a pesar de los conocimientos que se tienen de los parásitos, no existe una adecuada identificación de portadores por lo que su erradicación no es eficiente. Estas causas han motivado a que se mantengan los estudios bioquímicos, de biología molecular, biología celular y fisiología de los parásitos con los cuales se espera conocer mas y mejor a los parásitos y con lo que, se logren establecer mejores formas de detectarlos, tratarlos y controlarlos para mejorar la salud de los individuos afectados.

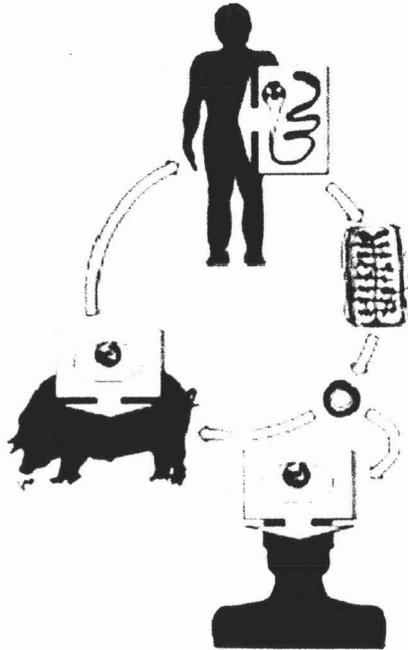


Figura 3. Ciclo de vida de *T. solium*. (Tomado de Flisser *et al*, 1997).

4. Sistemas musculares y actina estudiados en *T. solium*.

Se ha considerado que la sobrevivencia de los gusanos endoparásitos requiere de un sistema muscular bien desarrollado, el cual no sólo es requerido para la locomoción sino también tiene un papel importante en el desarrollo de órganos especializados para el anclaje al huésped y otros aspectos biológicos como la reproducción (Kumar *et al*, 2003).

Los miofilamentos del músculo liso de los invertebrados no tiene diferencias significativas con respecto a la composición de las fibras del músculo esquelético de los vertebrados (Huxley, 1957; Lumsden y Biram III, 1967), lo que se ha hecho evidente al identificar varios genes y proteínas asociadas a músculo en turbelarios, trematodos y cestodos. Entre estas se encuentra la actina (Campos *et al*, 1990; Matsumoto *et al*, 1988; Pascolini *et al* 1992, da Silva *et al*, 1993; Oliveira y Kemp, 1995; Wahlberg y Johnson, 1997; Ambrosio *et al*, 2003) y la miosina (Grossman *et al*, 1990; Ambrosio *et al*, 1997; Cebria *et al*, 1997; Kobayashi *et al*, 1998; Kumar *et al*, 2003). Los sistemas musculares en los cisticercos de *T. solium* se encuentran con una distribución diferente respecto a los cestodos adultos (Lumsden y Byram III 1967; Wahlberg, 1998), ya que se encuentran fibras de diferentes tipos: circulares (en rosetelo y en ventosa); circulares, longitudinales y transversales (tejido tegumental) y de red subcuticular (en el canal espiral invaginado). En *T. solium* algunas de estas fibras se ha encontrado actina presente en miofilamentos delgados y que participa en la contracción muscular de cestodos (Ambrosio *et al*, 2003).

III. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis.

Existen diferencias en el perfil peptídico de la digestión con quimotripsina, de las actinas musculares aisladas de diferentes fases de *T. solium*. El patrón peptídico de estas actinas es diferente al de los vertebrados.

Objetivo General.

Determinar los perfiles peptídicos de actinas musculares de cisticerco, cisticerco evaginado *in vitro* y adulto de *T. solium*, compararlos entre sí y contra otros perfiles de actinas de vertebrados.

Objetivos Particulares.

- Aislar actina de cisticercos, cisticercos evaginados *in vitro*, adultos y de vertebrados.
- Obtener el perfil peptídico de actina de cada fase de desarrollo estudiados y de vertebrados.

4. Sistemas musculares y actina estudiados en *T. solium*.

Se ha considerado que la sobrevivencia de los gusanos endoparásitos requiere de un sistema muscular bien desarrollado, el cual no sólo es requerido para la locomoción sino también tiene un papel importante en el desarrollo de órganos especializados para el anclaje al huésped y otros aspectos biológicos como la reproducción (Kumar *et al*, 2003).

Los miofilamentos del músculo liso de los invertebrados no tiene diferencias significativas con respecto a la composición de las fibras del músculo esquelético de los vertebrados (Huxley, 1957; Lumnsden y Biram III, 1967), lo que se ha hecho evidente al identificar varios genes y proteínas asociadas a músculo en turbelarios, trematodos y cestodos. Entre estas se encuentra la actina (Campos *et al*, 1990; Matsumoto *et al*, 1988; Pascolini *et al* 1992, da Silva *et al*, 1993; Oliveira y Kemp, 1995; Wahlberg y Johnson, 1997; Ambrosio *et al*, 2003) y la miosina (Grossman *et al*, 1990; Ambrosio *et al*, 1997; Cebria *et al*, 1997; Kobayashi *et al*, 1998; Kumar *et al*, 2003). Los sistemas musculares en los cisticercos de *T. solium* se encuentran con una distribución diferente respecto a los cestodos adultos (Lumsden y Byram III 1967; Wahlberg, 1998), ya que se encuentran fibras de diferentes tipos: circulares (en rosetelo y en ventosa); circulares, longitudinales y transversales (tejido tegumental) y de red subcuticular (en el canal espiral invaginado). En *T. solium* algunas de estas fibras se ha encontrado actina presente en miofilamentos delgados y que participa en la contracción muscular de cestodos (Ambrosio *et al*, 2003).

III. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis.

Existen diferencias en el perfil peptídico de la digestión con quimotripsina, de las actinas musculares aisladas de diferentes fases de *T. solium*. El patrón peptídico de estas actinas es diferente al de los vertebrados.

Objetivo General.

Determinar los perfiles peptídicos de actinas musculares de cisticerco, cisticerco evaginado *in vitro* y adulto de *T. solium*, compararlos entre sí y contra otros perfiles de actinas de vertebrados.

Objetivos Particulares.

- Aislar actina de cisticercos, cisticercos evaginados *in vitro*, adultos y de vertebrados.
- Obtener el perfil peptídico de actina de cada fase de desarrollo estudiados y de vertebrados.

- Analizar y comparar los perfiles de actinas, así como establecer las diferencias.
- Establecer que péptidos podrían ser candidatos para determinar su secuencia de aminoácidos.

IV. Materiales y Métodos.

1. Obtención de parásitos.

Cisticercos. Los parásitos se obtuvieron a la necropsia de cerdos infectados de manera natural, se les disectó cuidadosamente de los músculos para evitar que se contaminaran con tejido del hospedero. Una vez aislados se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Cisticercos evaginados. Los cisticercos se incubaron a 37°C en tripsina bovina (Sigma número de catálogo C-3142) 0.1% en SSAF. En el momento que los cisticercos evaginaron (40 a 60 minutos), se lavaron con SSAF y congelaron hasta su utilización.

Parásitos adultos. La obtención de adultos se realizó mediante el empleo del modelo experimental de teniosis en hámster dorado (*Mesocricetus aureatus*) como lo describieron Maravilla *et al* en 1998. Previo a la infección experimental, los animales fueron desparasitados con Albendazol (5 mg/150g peso) durante tres días consecutivos y a los ocho días se les infectó por vía oral con 8 cisticercos recién obtenidos de la carne de cerdo y al mismo tiempo se inmunosuprimió con acetato de metil prednisolona (Depo-Medrol, Upjhon), 2 mg/animal, por vía intramuscular y después cada 15 días hasta la recuperación de las tenias dentro del intestino delgado del hámster, se lavaron con SSAF y se congelaron hasta su utilización.

2. Evaluación de marcadores comerciales de bajo peso molecular.

Debido a la imprecisión de la estimación del peso molecular de los péptidos obtenidos, mediante marcadores comerciales de rango amplio según el fabricante (BioLabs número de catálogo P7708S 175 a 6.5 kDa), hubo necesidad de estandarizar la determinación del peso mediante marcadores de peso molecular estándar (Bio-Rad número de catálogo 161-0373 250 a 10 kDa e InVitroGen número de catálogo 10748-010 190 a 10 kDa) y se encontró que sólo con éstos últimos marcadores se obtenían estimaciones más precisas de los pesos moleculares de los péptidos de menor peso molecular a los 15 kDa.

El patrón de comparación elegido para identificar el peso molecular de los péptidos obtenidos, fue el de los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); la elección de este tipo de marcador fue el resultado de la comparación entre otros productos de diferentes marcas. Evaluados mediante geles de poliacrilamida al 14% junto a actina comercial de conejo (Worthington). Las bandas obtenidas para corrimientos electroforéticos de actina comercial fueron deshidratadas y sometidas a digestión a 37°C (relación Enzima/Sustrato: 1:20) con α -Quimotripsina bovina de alta especificidad (Sigma número de catálogo C-3142), en presencia de una solución amortiguadora de NH_4HCO_3 10 mM ajustada a pH 8.0. Fue empleado un tiempo de digestión: 120 minutos y en el proceso se realizó la evaluación de la actina sin digerir como control negativo del ensayo. Junto a

- Analizar y comparar los perfiles de actinas, así como establecer las diferencias.
- Establecer que péptidos podrían ser candidatos para determinar su secuencia de aminoácidos.

IV. Materiales y Métodos.

1. Obtención de parásitos.

Cisticercos. Los parásitos se obtuvieron a la necropsia de cerdos infectados de manera natural, se les disectó cuidadosamente de los músculos para evitar que se contaminaran con tejido del hospedero. Una vez aislados se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Cisticercos evaginados. Los cisticercos se incubaron a 37°C en tripsina bovina (Sigma número de catálogo C-3142) 0.1% en SSAF. En el momento que los cisticercosevaginaron (40 a 60 minutos), se lavaron con SSAF y congelaron hasta su utilización.

Parásitos adultos. La obtención de adultos se realizó mediante el empleo del modelo experimental de teniosis en hámster dorado (*Mesocricetus aureatus*) como lo describieron Maravilla *et al* en 1998. Previo a la infección experimental, los animales fueron desparasitados con Albendazol (5 mg/150g peso) durante tres días consecutivos y a los ocho días se les infectó por vía oral con 8 cisticercos recién obtenidos de la carne de cerdo y al mismo tiempo se inmunosuprimió con acetato de metil prednisolona (Depo-Medrol, Upjhon), 2 mg/animal, por vía intramuscular y después cada 15 días hasta la recuperación de las tenias dentro del intestino delgado del hámster, se lavaron con SSAF y se congelaron hasta su utilización.

2. Evaluación de marcadores comerciales de bajo peso molecular.

Debido a la imprecisión de la estimación del peso molecular de los péptidos obtenidos, mediante marcadores comerciales de rango amplio según el fabricante (BioLabs número de catálogo P7708S 175 a 6.5 kDa), hubo necesidad de estandarizar la determinación del peso mediante marcadores de peso molecular estándar (Bio-Rad número de catálogo 161-0373 250 a 10 kDa e InVitroGen número de catálogo 10748-010 190 a 10 kDa) y se encontró que sólo con éstos últimos marcadores se obtenían estimaciones más precisas de los pesos moleculares de los péptidos de menor peso molecular a los 15 kDa.

El patrón de comparación elegido para identificar el peso molecular de los péptidos obtenidos, fue el de los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); la elección de este tipo de marcador fue el resultado de la comparación entre otros productos de diferentes marcas. Evaluados mediante geles de poliacrilamida al 14% junto a actina comercial de conejo (Worthington). Las bandas obtenidas para corrimientos electroforéticos de actina comercial fueron deshidratadas y sometidas a digestión a 37°C (relación Enzima/Sustrato: 1:20) con α -Quimotripsina bovina de alta especificidad (Sigma número de catálogo C-3142), en presencia de una solución amortiguadora de NH_4HCO_3 10 mM ajustada a pH 8.0. Fue empleado un tiempo de digestión: 120 minutos y en el proceso se realizó la evaluación de la actina sin digerir como control negativo del ensayo. Junto a

estos dos tratamientos se colocó la cantidad de marcadores, mencionados anteriormente, indicada por el fabricante.

3. Obtención de actina muscular de diferentes estadios de *T. solium*.

Las actinas de estos parásitos se obtuvieron de acuerdo a lo publicado por Ambrosio *et al* en 2003: Los parásitos se homogenizaron con un homogenizador de tejidos (Brinkman Instruments) relación 1:2 en una solución compuesta de Fosfatos 6.7 mM a pH 7.4, MgCl₂ 1 mM, KCl 40 mM (solución A) con inhibidores de proteasas libres de EDTA. El homogenizado se filtro por gasa, se centrifugó 10,000g por 5 min en una Centrifuga Sorvall RT 64. La pastilla fue homogenizada y centrifugada nuevamente dos veces más. El último precipitado fue homogenizado en una solución B a base de Fosfatos 6.7 mM a pH 6.0, KCl 50 mM y MgCl₂ 1 mM. A la suspensión resultante se le adicionó EDTA 1 mM, ATP 5 mM e inhibidores de proteasas con EDTA. La suspensión se incubó a 4°C por 5-10 minutos, se centrifugó a 80,000g (Centrifuga Beckman); el sobrenadante obtenido contenía el 60 % de la actina total. Se homogenizó el botón una vez más y el sobrenadante contenía del 20 al 30 % de la actina restante.

Las actinas purificadas de molleja de pollo y músculo esquelético de conejo fueron gentilmente donadas por la Q. F. B. Laura G. González Malerva y la Biol. Olivia A. Reynoso Ducoing.

4. Evaluación de las actinas obtenidas mediante análisis electroforético

Durante todo el proceso de obtención de la actina se guardaron muestras de cada paso con la finalidad de evaluar el procedimiento de extracción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % (Ver Apéndice 1) y tinción de los mismos con azul de Coomassie.

5. Digestión proteolítica con quimotripsina de actinas.

Para la purificación de actina la banda correspondiente a aproximadamente 45 kDa se cortó a partir de geles de poliacrilamida. Los geles de la electroforesis se tiñeron reversiblemente con una solución de Zn-Imidazol (Ver Apéndice 3) y la banda de actina se cortó y proceso para digestión con quimotripsina. Las bandas obtenidas fueron deshidratadas (Ver Apéndice 2) y sometidas a digestión a 37°C (relación Enzima/Sustrato: 1:20) con α -Quimotripsina bovina de alta especificidad (Sigma), en presencia de una solución amortiguadora de NH₄HCO₃ 10 mM ajustada a pH 8.0. Se emplearon tres diferentes tiempos de digestión: 90, 120 y 180 minutos; en el proceso se realizó la evaluación de la actina sin digerir como control negativo del ensayo. Al control negativo se adicionó la Quimotripsina en la solución amortiguadora mencionada, la diferencia con las muestras tratadas para su digestión es que la enzima fue desnaturalizada, previo a los ensayos por adición de 20 μ l de solución amortiguadora de muestras (Bio-Rad) 2X y ebullición de la muestra (90°C, 2 minutos).

En todos los tratamientos, posterior a la digestión de la actina, la inactivación de la enzima fue hecha de la misma manera como se indicó para el control negativo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con la enzima, las bandas se recuperaron y colocaron en geles de poliacrilamida al 14%. El gel se corrió a 120V durante 95 minutos. Transcurrido el tiempo de electroforesis, los geles fueron recuperados y teñidos con AgNO₃

(Ver Apéndice 3) para visualizar los patrones de digestión de actina obtenidos. La determinación de los pesos moleculares de cada uno de los péptidos obtenidos se hizo por comparación con marcadores comerciales (Bio-Rad marcadores preteñidos), los cuales fueron seleccionados (como se indica posteriormente) luego de un análisis de los mejores marcadores a ser empleados en este tipo de ensayos.

6. Reconocimiento de los péptidos por anticuerpos monoclonales antiactina comerciales.

Una vez que la proteína fue fraccionada electroforéticamente en gel de poliacrilamida al 14%, se transfirió a 12 V durante 27 minutos a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF, Millipore) previamente activada con metanol y se empleó el equipo Trans-Blot SD (Bio-Rad). Para la identificación de la actina y sus productos de digestión la membrana fue incubada (a temperatura ambiente, 1h) con anticuerpo anti-pollo monoclonal (AcMc C4) producido contra actina de molleja de pollo (Chemicon Internacional Inc.), diluido 1:1000 en 1% de albúmina de suero bovino disuelta en SSAF-3% Tween-20 (buffer de bloqueo). Después de dos pasos de lavado la membrana fue incubada durante 1 h con anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed) diluido 1:1000 en buffer de bloqueo, después se lavo con SSAF y SSAF-Tween. La reacción final se llevo a cabo utilizando un kit comercial para sustrato quimioluminiscente (Supersignal, Pierce). En algunos casos, la misma membrana revelada por quimioluminiscencia, se trato para posterior revelado con diaminobencidina (DAB). La membrana fue incubada con Tris-HCl pH 6.8, SDS 2% y 100 mM de β -mercaptoetanol, durante 30 minutos a 50°C en agitación cada 5 minutos y luego fue lavada con SSAF y SSAF-Tween. La membrana fue incubada a temperatura ambiente, 1h con anticuerpo anti-pollo monoclonal (AcMc C4) producido contra actina de molleja de pollo., diluido 1:1000 en 1% de albúmina de suero bovino disuelta en SSAF-3% Tween-20 (buffer de bloqueo). Después de dos pasos de lavado la membrana fue incubada durante 1 h con anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en buffer de bloqueo, después se lavo con SSAF y SSAF-Tween finalmente, se hizo un revelado con DAB (0.5 mg/ml) con 30% (v/v) H_2O_2 . La reacción se detuvo con H_2O destilada.

7. Adquisición de imágenes y análisis de los péptidos producidos mediante equipo computacional.

Los análisis y la captura de imágenes fueron realizados mediante el sistema de análisis e imagen de laboratorio UVP, utilizando el programa de cómputo Lab Works Analysis Software v.3.0.02.00. Los valores obtenidos después de la captura de los geles fueron cuantificados mediante un valor arbitrario definido como unidad densitométrica; la cual es determinada por el programa al detectar las zonas que presentan reactividad al teñir el gel.

V. Resultados.

1. Extracción de actina. El gel al 8% teñido por azul de Coomassie en el que se evaluó el proceso de extracción de actina de cisticercos se muestra en la fig. 4, en el caso de

(Ver Apéndice 3) para visualizar los patrones de digestión de actina obtenidos. La determinación de los pesos moleculares de cada uno de los péptidos obtenidos se hizo por comparación con marcadores comerciales (Bio-Rad marcadores preteñidos), los cuales fueron seleccionados (como se indica posteriormente) luego de un análisis de los mejores marcadores a ser empleados en este tipo de ensayos.

6. Reconocimiento de los péptidos por anticuerpos monoclonales antiactina comerciales.

Una vez que la proteína fue fraccionada electroforéticamente en gel de poliacrilamida al 14%, se transfirió a 12 V durante 27 minutos a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF, Millipore) previamente activada con metanol y se empleo el equipo Trans-Blot SD (Bio-Rad). Para la identificación de la actina y sus productos de digestión la membrana fue incubada (a temperatura ambiente, 1h) con anticuerpo anti-pollo monoclonal (AcMc C4) producido contra actina de molleja de pollo (Chemicon Internacional Inc.), diluido 1:1000 en 1% de albúmina de suero bovino disuelta en SSAF-3% Tween-20 (buffer de bloqueo). Después de dos pasos de lavado la membrana fue incubada durante 1 h con anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed) diluido 1:1000 en buffer de bloqueo, después se lavo con SSAF y SSAF-Tween. La reacción final se llevo a cabo utilizando un kit comercial para sustrato quimioluminiscente (Supersignal, Pierce). En algunos casos, la misma membrana revelada por quimioluminiscencia, se trato para posterior revelado con diaminobencidina (DAB). La membrana fue incubada con Tris-HCl pH 6.8, SDS 2% y 100 mM de β -mercaptoetanol, durante 30 minutos a 50°C en agitación cada 5 minutos y luego fue lavada con SSAF y SSAF-Tween. La membrana fue incubada a temperatura ambiente, 1h con anticuerpo anti-pollo monoclonal (AcMc C4) producido contra actina de molleja de pollo., diluido 1:1000 en 1% de albúmina de suero bovino disuelta en SSAF-3% Tween-20 (buffer de bloqueo). Después de dos pasos de lavado la membrana fue incubada durante 1 h con anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en buffer de bloqueo, después se lavo con SSAF y SSAF-Tween finalmente, se hizo un revelado con DAB (0.5 mg/ml) con 30% (v/v) H_2O_2 . La reacción se detuvo con H_2O destilada.

7. Adquisición de imágenes y análisis de los péptidos producidos mediante equipo computacional.

Los análisis y la captura de imágenes fueron realizados mediante el sistema de análisis e imagen de laboratorio UVP, utilizando el programa de cómputo Lab Works Analysis Software v.3.0.02.00. Los valores obtenidos después de la captura de los geles fueron cuantificados mediante un valor arbitrario definido como unidad densitométrica; la cual es determinada por el programa al detectar las zonas que presentan reactividad al teñir el gel.

V. Resultados.

1. Extracción de actina. El gel al 8% teñido por azul de Coomassie en el que se evaluó el proceso de extracción de actina de cisticercos se muestra en la fig. 4, en el caso de

cisticercos evaginados y tenias se llevo a cabo el mismo seguimiento hasta la visualización de la banda correspondiente a actina purificada según su peso molecular.

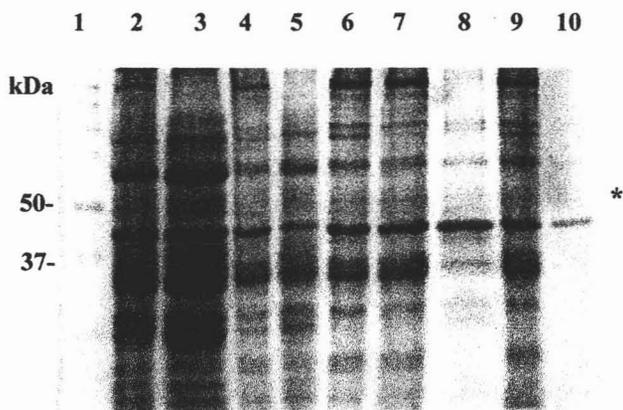


Figura 4. Evaluación electroforética de la extracción de actina de cisticercos. Muestras de proteínas (20 μ g de proteína en el carril 10) obtenidas durante los diferentes pasos de la obtención de actina (Carriles 2-9) fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%, bajo condiciones reductoras y teñidas con azul de Coomassie Brillante. En el primer carril se muestran los marcadores comerciales de alto peso molecular, de los que se indican sólo dos de ellos. En el carril 10, con un asterisco, se indica la banda correspondiente de actina purificada.

2. Recuperación de actinas desde los geles. Posterior a la separación electroforética, los geles fueron teñidos con Zinc-Imidazol (Ver apéndice 3) y luego de la identificación de las bandas situadas al nivel de la actina (\sim 43 kDa; fig. 5), éstas fueron separadas del gel y sometidas a digestión enzimática. Para los análisis de digestión, las estimaciones de la cantidad de proteína en cada banda se efectuó mediante el empleo de un gel de poliacrilamida con diferentes concentraciones de actina comercial (0.5-10 μ g) revelado también con tinción negativa. Las estimaciones de la concentración de proteína, por cada banda aislada, indicaron que las proteínas se encontraron en un intervalo de 2 a 6 μ .

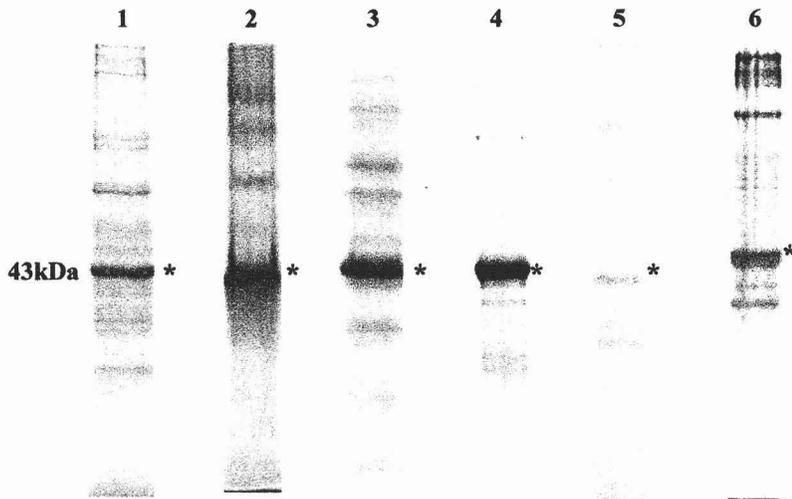


Figura 5. Visualización de actina mediante tinción negativa. Luego de la separación electroforética de las muestras de actina como se muestra en la figura 4, de los carriles correspondientes a la actina semipurificada se recuperaron las bandas correspondientes a la proteína luego de su tinción con Zinc-Imidazol. Las bandas correspondientes a actina de todos los carriles, señaladas con un asterisco, fueron separadas de los geles y procesadas para su digestión enzimática. Actinas de *T. solium* (Carriles 1-3): 1. de cisticercos, 2. de cisticercos evaginados, 3. de adultos. Actinas de vertebrados: 4. Comercial, 5. de músculo esquelético de conejo y 6. de músculo liso de molleja de pollo.

3. Criterios para la elección de marcadores comerciales de peso molecular, utilizados en la estimación del peso molecular de los péptidos de actina resultantes de la digestión enzimática.

Se observaron diferencias en la estimación de los pesos moleculares obtenidos al comparar los patrones peptídicos de la actina comercial digerida, en el caso de los marcadores de BioLabs hubo errores importantes en la estimación. Aparentemente, los valores de peso molecular de los estándares del fabricante referido son erróneos, no así para los otros que se utilizaron. Esto se determinó mediante separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida en las que se compararon los diferentes marcadores comerciales utilizados en el presente proyecto (fig. 6). El problema más serio se dio en la estimación de péptidos de pesos moleculares menores a los 19 kDa (tabla 1), a diferencia de los otros marcadores (los cuales no son considerados de bajo rango de peso molecular).

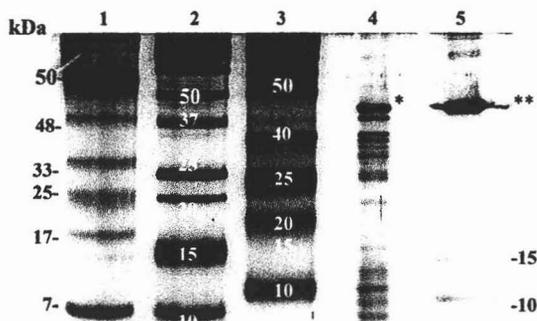


Figura 6. Comparación de estándares de peso molecular. Gel de poliacrilamida al 14% teñido con plata en la cual se separaron los diferentes marcadores comerciales de peso molecular. Carril 1, BioLabs (175, 83, 62, 48, 33, 25, 17 y 7 kDa); carril 2, Bio-Rad (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa); carril 3, Invitrogen Benchmark (190, 120, 85, 60, 50, 40, 25, 20, 15 y 10 kDa); carril 4, actina comercial digerida (*) y carril 5, actina comercial (**) en presencia de quimotripsina de la que se observan sus subunidades de 15 y 11 kDa respectivamente..

Biolabs (kDa)	Bio-Rad (kDa)	Invitrogen Benchmark (kDa)
44	44	43
40	39	40
35	34	34
33	33	32
31	31	30
30	29	27
28	27	25
26	25	23
23	22	21
20	20	19
19	19	18
<i>16</i>	<i>18</i>	<i>17</i>
<i>14</i>	<i>16</i>	<i>15</i>
<i>13</i>	<i>15</i>	<i>14</i>
<i>9</i>	<i>13</i>	<i>12</i>
<i>7</i>	<i>12</i>	<i>11</i>
<i>5</i>	<i>11</i>	<i>10.5</i>
<i>3</i>	<i>10</i>	<i>10</i>

Tabla 1. Determinación del peso molecular de los péptidos de actina comercial con base en 3 diferentes marcadores de peso molecular preteñidos. El peso molecular que muestra variación en los péptidos analizados esta se presenta en gris e itálicas.

4. Digestión proteolítica de actina con quimotripsina. La banda correspondiente a actina digerida con quimotripsina y el patrón peptídico a los tres diferentes tiempos resueltos en gel de poliacrilamida se muestra en la fig. 7, en ella se observa: cisticero (A), cisticerco evaginado (B), adulto (C), actina comercial (D), músculo esquelético de conejo (E) y músculo liso de pollo (F). El peso molecular de las bandas de los péptidos producidos fue obtenido mediante el programa para computadora mencionado mediante un valor arbitrario definido como unidad densitométrica y su comparación muestra en la tabla 2, en gris se muestra las bandas presentes en *T. solium* y no así en los vertebrados, en negritas las bandas presentes en algún estadio del parásito y en vertebrados. La banda de actina en los tres estadios de *T. solium* tuvo un peso molecular de 43 kDa, la actina comercial y la de músculo esquelético de conejo tuvo un peso de 47 kDa y la de músculo liso de pollo de 46 kDa. El análisis mostró que el resultado de la digestión de actina a 120 minutos en cisticerco fue de 14 péptidos, mientras que para cisticerco evaginado y adulto fue de 12 péptidos; la actina comercial mostró 16 péptidos totales. La actina de músculo esquelético de conejo mostró 16 péptidos, y la actina de músculo liso de pollo 12. En todos los tratamientos los péptidos se localizaron entre 38 y 9 kDa. En el patrón de digestión de cisticerco se localizo un péptido no presente en los demás estadios cuyo peso molecular fue de 33 kDa.

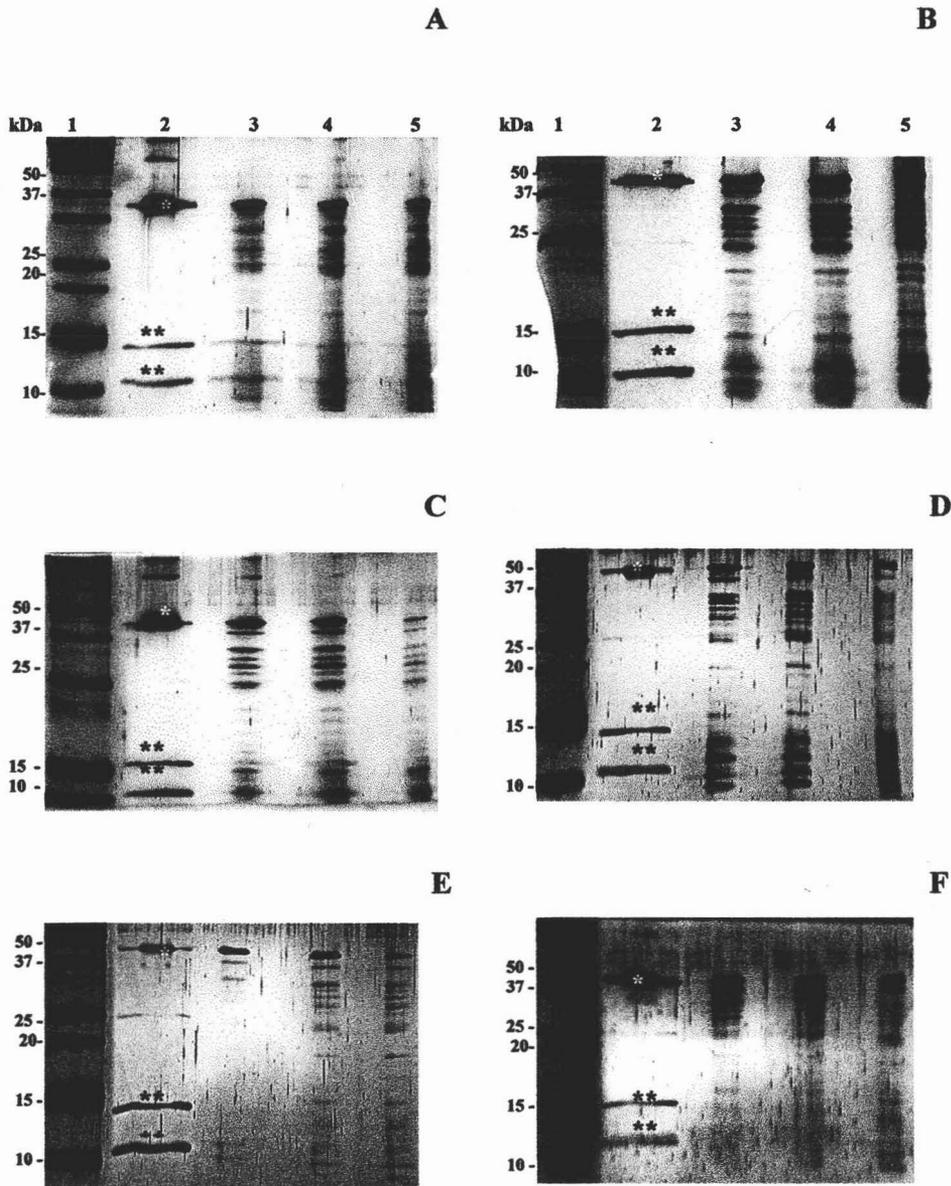


Figura 7. Patrones peptídicos de diferentes actinas. Una vez que las bandas de actinas fueron separadas de los gels y sometidas a digestión enzimática *in situ*, el revelado final de las electroforesis mostró que las actinas fueron digeridas parcialmente y, mediante electroforesis en PAGE al 14% se logró la separación de los péptidos. Esta separación permitió obtener diferentes patrones peptídicos, productos de digestión con quimotripsina. Con la finalidad de detectar el mayor número de bandas, los gels fueron teñidos con AgNO_3 . Cada carril muestra diferentes tiempos de digestión enzimática: Actina sin digerir, carril 2; 90 (3), 120' (4) y 180' (5). Los marcadores comerciales de peso molecular se muestran en el carril 1. Luego, para la comparación de los diferentes mapas peptídicos se analizaron las actinas de cisticercos (A), cisticercos evaginados (B), tenias (C), actina comercial (D), músculo esquelético de conejo (E) y músculo liso de pollo (F). Bajo las condiciones presentes de electroforesis, todas las actinas estuvieron localizadas entre los 50 y 37 kDa. Las bandas de actina sin digerir están marcadas con asteriscos, los dobles asteriscos indican la localización de las subunidades de la quimotripsina.

cisticerco (kDa)	cisticerco evaginado (kDa)	adulto (kDa)	comercial (kDa)	músculo esquelético de conejo (kDa)	músculo liso de pollo (kDa)
38	38	38	38	38	38
34	34	34	34	34	34
33	-	-	-	-	-
31	31	31	31	31	31
29	29	29	29	29	29
27	27	27	27	27	27
25	25	25	25	25	
20	20	20	20	20	20
19	19	19	-	-	-
-	-	-	18	18	-
-	-	-	17	17	17
16	-	-	16	16	16
14	14	14	14	14	14
-	-	13	13	13	-
-	-	12	-	-	-
11	11	11	11	11	11
10	-	-	10	10	10
9	9	9	9	9	9

Tabla 2. Peso molecular de bandas producto de fragmentación enzimática a los 120 minutos de incubación.

5. Determinación del reconocimiento de actina y sus productos de digestión por un anticuerpo monoclonal antiactina comercial. Con la finalidad de confirmar que la actina era reconocida por un anticuerpo específico (Ambrosio *et al*, 2003) a ella y definir si alguno de los péptidos, obtenidos de la digestión enzimática durante 120 de incubación mostraba reactividad al anticuerpo; después de la electrotransferencia, las muestras de actina (tanto comercial como de cisticercos) y los péptidos de ellas fueron hechas reaccionar con el anticuerpo anti-actina como se muestra en la figura 8. Se observa en esta figura a las actinas (fig. 8 A y B, carriles 2 y 4) que fueron reconocidas por el anticuerpo, incluyendo a lo que quedaba de actina sin digerir (fig. 8 A y B carriles 3 y 5). Sólo en el caso del revelado de la membrana, de la inmunoelectrotransferencia, en el que se utilizó la quimioluminiscencia (fig. 8A), se encontró reactividad del anticuerpo hacia otra banda de peso molecular menor (39kDa) la cual también fue encontrada junto con la actina de cisticercos sin digerir (fig. 8A, carril 3), pero no en la actina comercial (fig 8A, carril 4). El revelado de las membranas con DAB solo mostró la reactividad del anticuerpo monoclonal hacia las actinas contenidas en las muestras (fig 8 B).

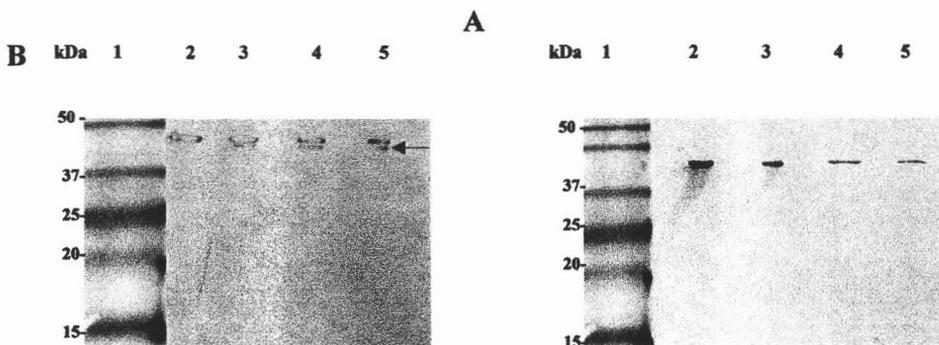


Figura 8. Reactividad del anticuerpo monoclonal antiactina hacia actina comercial y de cisticercos. Posterior a su separación electroforética, las actinas de cisticercos (carril 2) y comercial (carril 4); así como sus productos de su digestión (carriles 3 y 5) fueron electrotransferidas a membranas de PVDF y hechas reaccionar con el AcMc C4. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (A), procesadas y vueltas a revelar con DAB (raspado) (B). La flecha indica la banda de 39 kDa correspondiente al producto de digestión.

6. Comparación de la digestión enzimática experimental contra la teórica para la actina de cisticercos de *T. solium*. Con la finalidad de determinar si hay diferencias en la estimación de los péptidos obtenidos de una digestión enzimática experimental, como la que se hizo en la presente tesis, con una teórica para la misma enzima y proteína. Se trató de estimar el número y el peso molecular de cada uno de los péptidos. Para ello, se hizo una digestión teórica con α -quimotripsina de alta especificidad a la secuencia de aminoácidos primaria deducida de la secuencia génica de actina de *T. solium* (P14227). Para lo cual se utilizó el programa de PeptideCutter de ExPASy (<http://expasy.proteome.org.au/tools/>). Según las condiciones seleccionadas para la digestión teórica, la digestión podría producir hasta 21 péptidos de diferentes pesos moleculares que variaron de 0.1 a 4.7 kDa y que

generan un total de 42.22 kDa de la actina (ver tabla 3). Un análisis, no mostrado, de digestión teórica con la misma enzima pero de baja especificidad mostró que el número de péptidos obtenidos era mayor (75 péptidos de pesos moleculares mas pequeños). La comparación de la digestión teórica con la experimental, donde se empleó al patrón peptídico de actina digerida a los 120 minutos, aparentemente mostró que en la experimental aún falta proteína por se digerida, aunque parece que los mismos sitios de corte generan péptidos de pesos moleculares semejantes como se muestra en la tabla 2.

Secuencia de péptidos obtenidos Hipotéticamente	Número de aminoácidos	kDa
MGDEEVQALVVDNGSGMCKAGF	22	2.2
AGDDAPRAVFPISVGRPRHQGV MVGMGQKDSY	32	3.3
VGDEAQSKRGILTLKYP I EHGIVTNW	26	2.9
DDMEKIW	7	0.9
HHTF	4	0.5
V	1	0.2
NELRVAP E EHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	33	3.8
ETF	3	0.4
NTPAMY	6	0.7
VGIQAVLSLY	10	0.1
ASGRITGIVLDSGDGVTHSVPIY	23	2.3
EGY	3	0.4
ALPHAILRLDLAGRDLTDY	19	2.1
LMKILTERGY	10	1.2
SF	2	0.3
TTTAEREIVRDIKEKLCY	18	2.1
VALDF	5	0.6
EQEMATAASSSSLEKSY	17	1.8
ELPDGQVITIGNERF	15	1.7
RCPESLF	7	0.9
QPSF	4	0.5
LGME SAGIH ESTF	13	1.4
NAIMKCDVDIRKDLY	15	1.8
ANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKIVAPPERKY	43	4.7
SVW	3	0.4
IGGSILASLSTF	12	1.2
QQMW	4	0.6
ISKQEY	6	0.8
DESGPGIVHRKCF	3	1.4

Tabla 3. Péptidos de actina que teóricamente son producidos por la digestión enzimática con quimotripsina.

VI. Discusión.

La actina es una de las proteínas más conservadas entre las especies a lo largo de su evolución, sin embargo, hay las variaciones de ella que están asociadas con su composición y secuencia de aminoácidos. Estos cambios inducen a que las variantes que se expresan presenten diferencias importantes en su funcionalidad (Mounier y Sparrow, 1997). La expresión de las variantes es distinta entre las células o los tejidos de una misma especie o entre los tejidos de diferentes especies (Khaitlina, 2001). Las formas mediante las que se han identificado las variaciones de la composición de aminoácidos de muchas proteínas son la identificación y la secuenciación de los genes que las codifican, el aislamiento y la secuenciación de las proteínas luego de su digestión enzimática. En este último caso, los péptidos obtenidos pueden ser analizados y se les puede determinar la composición de sus aminoácidos mediante microsecuenciación de EDMAN o análisis espectrométrico de proteínas. Cualquier proteína, dependiendo de la composición de sus aminoácidos, presenta un patrón de digestión característico, lo que permite identificarla precisamente. Esto se debe a que es posible determinar la secuencia de AA de los péptidos y con ello la secuencia interna de las proteínas. Luego, si se trata de una proteína muy estudiada, se puede hacer la comparación (por bioinformática) de la secuencia obtenida con otras de proteínas semejantes y al final se deduce la composición y secuencia total de la proteína en estudio (Liebler, 2002; Westermeier y Naven, 2002). En lo que se refiere a la actina, aún cuando se conoce bastante bien su composición y secuencia de AA en varios organismos, llama la atención que casi no hay estudios que muestren sus perfiles peptídicos por digestión enzimática controlada; sólo se ha llevado a cabo la proteólisis limitada con una proteasa bacteriana específica con la finalidad de determinar la estructura primaria de la actina de músculo esquelético de conejo (Khaitlina, 1988) y, con la utilización de tripsina y quimotripsina, se ha logrado determinar las estructuras primaria y secundaria de la actina de músculo esquelético (Hozumi, 1988). Otras proteínas filamentosas, como las miosinas, han sido estudiadas bajo este tipo de estrategias de caracterización bioquímica y se ha logrado establecer su perfil peptídico con diferentes enzimas (Eddinger y Murphy, 1988; Madeiros y Reese, 1998). La quimotripsina y la tripsina han sido las enzimas más utilizadas para encontrar diferencias entre los perfiles peptídicos de diferentes miosinas; En nuestro laboratorio, con el empleo de quimotripsina, se han logrado determinar las diferencias entre los patrones peptídicos de miosinas tipo II musculares en diferentes fases de desarrollo de *T. solium* (González-Malerva *et al*, 2004). Por estas causas se consideró que podría utilizarse una estrategia semejante para el análisis bioquímico de la actina aislada de diferentes fases de desarrollo del mismo parásito.

Se sabe que las actinas de *T. solium*, para la fase larvaria o de cisticerco, presentan un PM de ~ 45 kDa y hay aproximadamente 7 isoformas, las cuales han sido evidenciadas por geles bidimensionales e inmunoelectroforesis utilizando un anticuerpo monoclonal anti-actina comercial (Ambrosio *et al*, 2003). Según los resultados, tres de las isoformas encontradas se expresan predominantemente en este estadio parasitario. Otros resultados preliminares obtenidos por el análisis de las actinas de cisticercos evaginados y adultos, otras fases parasitarias de desarrollo de *T. solium*, muestran que hay patrón de expresión diferencial de isoformas, que ciertas isoformas predominan dependiendo de la fase de desarrollo y que otras se mantienen constantes durante la crecimiento de los parásitos (Reynoso-Ducoing, datos no publicados). Esta expresión diferencial de isoformas de actina

no es exclusiva de *T. solium*, ya que otro céstodo: *Diphyllobotrium dendriticum* tiene una expresión diferencial tisular, demostrada por hibridización *in situ*, de 6 genes de actina (Wahlberg *et al*, 1997). En otros helmintos como *Echinococcus granulosus* (daSilva *et al*, 1993) y *Schistosoma mansoni* (Oliveira *et al*, 1995) se han identificado y caracterizado sus genes de actina pero no se ha demostrado su expresión proteica. En el caso de *T. solium*, dos genes han sido plenamente identificados y caracterizados (Campos *et al*, 1990) y el análisis teórico, de la secuencia de los posibles aminoácidos codificados por estos genes, indica que las proteínas tienen un pI=5.3 y que posiblemente ella sea una de las isoformas demostradas (Ambrosio *et al*, 2003). Si esto es así, aún todavía no hay identificación y caracterización de otros genes de actina que pudieran corresponder a las otras isoactinas detectadas o como los genes identificados en *D. dendriticum* (Wahlberg *et al*, 1997).

Aún cuando con lo anterior se ha demostrado que hay expresión diferencial de isoformas de actina en los parásitos, aún se necesitan ampliar los estudios de caracterización de las proteínas para determinar cuales de ellas son producto de modificaciones postraduccionales y cuales son codificadas por su gen respectivo. Aunque, lo mas simple de haber hecho con la actina purificada hubiera sido determinar su secuencia de aminoácidos por microdegradación de EDMAN en presencia de tripsina; esto proceso no fue posible de realizar dado que aparentemente la región amino terminal está bloqueada (Ambrosio J, comunicación personal) y lo cual también es un indicativo de que hay alguna modificación postraducciona durante la expresión de las actinas. Estos otros hallazgos, para las actinas de *T. solium*, también fueron usados como argumentos para establecer el patrón peptídico de las actinas digeridas por quimotripsina. Se consideró que esta caracterización bioquímica de las actinas de estos parásitos permitiría la identificación y posible recuperación de al menos un péptido específico para establecer su secuencia interna de aminoácidos y con ello, evitar el bloqueo encontrado durante su secuenciación.

Según los resultados de análisis de comparación de los patrones peptídicos obtenidos en el presente trabajo de tesis para las actinas de *T. solium*, presentados en la tabla I, la variación entre los patrones de diferentes fases de desarrollo fue mínima. Sólo unos cuantos péptidos diferentes pudieron ser encontrados. Las diferencias resultantes de la comparación son elementos de apoyo adicionales a lo encontrado para los estudios de expresión de isoformas durante el desarrollo de *T. solium* (Reynoso-Ducoing, datos no publicados), en donde hay diferencias entre las fases estudiadas. Mientras que un péptido de 33 kDa fué encontrado en la actina de cisticercos; otro, de 16 kDa en tenias. Este último, aparentemente, es semejante a uno encontrado de peso molecular similar en las actinas de vertebrados evaluadas en el presente proyecto de tesis. Dos péptidos, uno de 10 y otro de 14 kDa, fueron semejantes entre las actinas de cisticercos y los vertebrados y éstos no fueron encontrados ni en cisticercos evaginados ni en adultos. Aparentemente, sólo un péptido de 19 kDa se encontró en todas las actinas de *T. solium* y éste no está en la actina muscular de vertebrados. Por lo consiguiente, a pesar de que las actinas son semejantes, los perfiles peptídicos permiten encontrar diferencias entre todas las que han sido estudiadas en el presente trabajo de tesis. Por lo que los péptidos aparentemente específicos para diferenciar actinas de *T. solium* son candidatos ideales para determinar la secuencia de aminoácidos interna de cada actina. La determinación de los aminoácidos tendrá que ser efectuada, por cuestiones de rendimiento y aislamiento de los péptidos, mediante espectrometría de masas de proteínas (Beynon y Bond, 2001), aunque previamente habrá que efectuar digestiones enzimáticas de las actinas con tripsina.

Uno de los problemas mas serios que se encontraron durante el desarrollo de la parte experimental de la tesis fue la determinación del tamaño molecular de los péptidos. Inicialmente se consideró que los estándares comerciales de bajo rango, para el cálculo del

peso molecular, podrían ser los mejores para estimar pesos menores a los 26 kDa. Sin embargo, los cálculos no cotejaban con lo que se observaba en los geles y se tuvo que hacer una calibración con diferentes marcadores comerciales como se indicó. Los resultados obtenidos muestran la importancia que se debe tener en cuenta, al momento de estimar el peso molecular de proteínas o péptidos, de selección de marcadores comerciales.

Los resultados obtenidos, indudablemente, aportan elementos nuevos en el conocimiento de la biología de una proteína muscular importante y ubicua como la actina en los organismos estudiados, tal y como se ha hecho en otros parásitos. Hay diferencias entre las actinas musculares de vertebrados e invertebrados, como lo establecen durante la comparación de la actividad de DNAsa I bovina del nemátodo *Caenorhabditis elegans* contra la de músculo esquelético de conejo (Ono, 1999). El hecho de que existan diferentes isoformas de proteínas musculares en *T. solium*, como la miosina (Gonzalez-Malerva *et al*, 2004) y la actina (Ambrosio *et al*, 2003), podría relacionarse con las necesidades de los parásitos para efectuar movimientos musculares de contracción y relajación que les permita desarrollarse, adaptarse y sobrevivir exitosamente dentro de su hospedero y producirles la infección.

Gracias al reconocimiento específico del AcMc C4 hacia la actina de cisticerco purificada, la cual fue utilizada en los presentes estudios, se confirmó que siempre se evaluó a la actina, aún digerida enzimáticamente, como lo demostrado por Ambrosio *et al* (2003). Es de llamar la atención de que de todos los péptidos obtenidos por la digestión enzimática y revelados por tinciones de Plata, sólo uno de ellos, aparte de la actina, reaccionó con dichos anticuerpos y lo cual es un indicativo de que en dicho péptido se conservó el epítipo reconocido. Con base a estas evidencias experimentales y una vez que se comparó con lo descrito el fabricante, se consideró que podría llevarse a cabo una deducción (sumado a lo obtenido de bases de datos) de los posibles aminoácidos involucrados en el reconocimiento de los anticuerpos hacia la secuencia deducida de actina de *T. solium*; el AcMc C4 reacciona específicamente cerca de los dos tercios de la región amino terminal (posiblemente cerca de los residuos 50-70 de la secuencia primaria de la actina) y el cual, al parecer, es un sitio expuesto luego de los 120 minutos de la digestión enzimática. Luego, como el fabricante indica que el reconocimiento del anticuerpo es mayor hacia músculo liso ya que fue evaluado en molleja de pollo y menor hacia músculo cardíaco y esquelético, la deducción del sitio de reconocimiento se ajusta a lo que se evaluó en *T. solium*, ya que estos parásitos tienen sistemas musculares de tipo liso (Lumsden and Byram III, 1967).

La quimotripsina es una enzima que digiere a las proteínas como proteasa de serina que hidroliza desde la región carboxilo terminal hacia los enlaces peptídicos que contienen aminoácidos con cadenas laterales aromáticas o muy hidrofóbicas (tales como: Y, W, F y M). Por lo consiguiente, dado que el AcMc C4 reconoció un péptido de 33 kDa se intentó inferir la secuencia a partir de los genes de actina pAT5 y pAT6 de cisticercos (clave de GenBank: P14227): Se dividió la secuencia (fig. 9) en tres tercios y se descartó, por lo descrito anteriormente, el último tercio para ubicar el posible fragmento peptídico implicado en el reconocimiento. Luego como la digestión generó un péptido de 33 kDa el cual fue reconocido por el AcMc C4 y este péptido tenía el peso molecular semejante a uno de los péptidos obtenidos por la digestión teórica, del cual se sabe su posible secuencia de aminoácidos, se dedujo que esta secuencia podría estar implicada en dicho reconocimiento. Con el conocimiento de la secuencia de estos AA se identificaron los AA situados entre los residuos 50 y 70 (AQSKRGILTLKYPIEHGIVT, sombreado en negritas) en los cuales podría recaer el reconocimiento de los anticuerpos. Este péptido de 33 kDa ha sido identificado como el primero que se obtiene luego de la digestión enzimática con

quimotripsina y subtilisina B de la actina de músculo esquelético de conejo y se le considera como el “core” o fragmento implicado en el pegado a DNAsa I característica de muchas actinas (Khaitlina, 1988).

1-N-MGDEEVOALV VDMGSGMCKA GFAGDDAPRA VFPOGVMVGM GOKDSYVGDE
AQSKRGILTL KYPIEHGIVT MWDDMEKIWH HTFYMELRVA PEEHPVLLTE APLNPKANRE
KMTOIMFETF NTPAMYVGIQ AVLSLYASGR TTGIVLDSGD GVTHRSVPIY EGYALPHAIL
RLDAGRDLTD
YLMKILTERG YSFTTTAERE IVRDIKEKLC YVALDFEDEM ATAASSSSLE KSYELPDGOV
ITIGNERF RC PESLFQPSFL GNESAGIHES TFNAIMKCDV DIRKDLYANT VLSGGTTMYP
GIADRMQKEI TS LAPSTNKI KIVAPPERK SVWIGGSILA SLSTFQQMWI SKQEYDESGP
 GIVHRKCF-C-348

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de actina de cisticercos de *T. solium*. La secuencia fue tomada de la inferencia a partir de la secuencia génica reportada para actina (Gene Bank, P14227). Los aminoácidos subrayados corresponden a los ubicados en los primeros tercios de la secuencia completa. Los aminoácidos en negritas podrían corresponder al segmento involucrado en el reconocimiento de los AcMc C4 específicos de actina.

En lo que se refiere a la comparación de patrones de digestión experimental con lo obtenido teóricamente, se encontró que mientras que en la experimental se obtuvieron 14 péptidos con un intervalo de PM de 9 a 38 kDa, luego de 10 horas de digestión (datos no mostrados en la presente tesis, porque el patrón de digestión no se modificó en los tiempos de digestión utilizados); en el procesamiento teórico, se obtuvieron 29 péptidos con un PM en el intervalo de 0.1 a 4.7 kDa. Las diferencias pudieran deberse a que mientras la digestión teórica involucra una hidrólisis total de la proteína (el PM de todos los fragmentos corresponde a lo que pesa una proteína monomérica: 42 kDa), la digestión experimental podría no haber sido completa aún luego de 10 horas de digestión y por lo consiguiente hubo menor cantidad de péptidos. Ha sido establecido que la quimotripsina, aún cuando tiene especificidad por los residuos mencionados anteriormente y que teóricamente deben estar involucrados en la digestión enzimática como lo predicen los programas computacionales, esto no es real en la práctica como lo presentado en el trabajo de tesis que se ha efectuado (Beynon y Bond, 2001). Sin embargo, el ejercicio realizado para identificar el péptido involucrado en el reconocimiento del AcMc C4 coincide con lo planteado por el fabricante y lo obtenido teórica y experimentalmente. Esto tendría que ser confirmado con la determinación de la secuencia de aminoácidos del péptido de 33 kDa reconocido por los AcMc C4.

VII. Conclusiones

Aparentemente, la actina de los músculos de las diferentes fases de desarrollo de *T. solium*, estudiados en el presente trabajo de tesis, es semejante en cuanto al patrón de péptidos que se obtiene de su digestión por quimotripsina. Sin embargo, la comparación del mismo tipo de digestión con los péptidos obtenidos para actinas de músculo esquelético de dos vertebrados (pollo y conejo), mostró que hay diferencias en los patrones obtenidos. Estas diferencias corresponden al número de péptidos que fueron obtenidos bajo las mismas circunstancias. Ciertos péptidos están presentes en los patrones peptídicos de las tres fases parasitarias estudiadas y no aparecen en los patrones de la actina digerida de músculo esquelético de vertebrados. De la misma forma, algunos péptidos presentes en el patrón de vertebrados, no se encuentran en los patrones peptídicos de *T. solium*. Son los péptidos de los parásitos los candidatos a los que se les debe determinar su composición, su secuencia de AA y su comparación con las secuencias de actinas de bases de datos existentes.

El patrón peptídico obtenido experimentalmente por la digestión enzimática de actina con quimotripsina difiere del obtenido teóricamente, al menos para lo hecho con la secuencia de aminoácidos de actina de cisticerco de *T. solium*.

El anticuerpo monoclonal antiactina comercial reconoció tanto a la actina sin digerir como a uno de los péptidos resultantes de la digestión de la proteína, aparentemente, este péptido se mantuvo a pesar de la digestión el determinante antigénico reconocido por el AcM C4, mientras que los demás péptidos resultantes lo perdieron durante la digestión. Por ello y por lo recomendado por el fabricante es posible que la secuencia teórica del epítipo reconocido podría corresponder a la presentada.

Es necesario, cuando se hagan análisis de mapas peptídicos, el utilizar los marcadores comerciales de PM mas adecuados con base a una calibración experimental de acuerdo a las condiciones de los estudios.

La diferencia de los péptidos de actina de *T. solium* producidos, abre la posibilidad de realizar una determinación completa de la secuencia de aminoácidos de actina de estos parásitos mediante la aplicación de la tecnología de análisis proteómico para péptidos.

Perspectivas.

Continuar con la caracterización bioquímica e inmunoquímica de las actinas de *T. solium* que permitan identificar, al nivel de secuencia de AA, las diferencias entre las isoformas de un mismo estadio parasitario o entre los estadios parasitarios que se estudien. Estos estudios podrían permitir continuar con la identificación de los tejidos en los que se encuentran expresando las proteínas y la manera en que varían durante el desarrollo de los parásitos. Este tipo de análisis permitirá obtener las secuencias de aminoácidos de los distintos péptidos que caracterizan el patrón peptídico de las diferentes actinas de *T. solium* y lo cual permitirá determinar la estructura primaria de estas proteínas musculares, incrementar el conocimiento de proteínas importantes en la fisiología de los parásitos y el evaluar como son afectadas por la influencia ambiental a la que son sometidos los parásitos.

VIII. Apéndice.

Apéndice 1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis es la migración de partículas cargadas en un campo eléctrico. Componentes variados migran con diferentes velocidades y forman zonas separadas. Las partículas, organelos celulares, células o proteínas son separadas con respecto a sus cargas dentro de una solución acuosa. El medio en el que comúnmente migran las proteínas es el SDS-PAGE, el cual es un gel formado por moléculas de acrilamida y bisacrilamida. La acrilamida y la bisacrilamida forman enlaces que estructuran una red de poros a través de los cuales migran las proteínas; el tamaño de los poros se define con la relación y la concentración de las moléculas de acrilamida y bisacrilamida. El SDS desnaturaliza a las proteínas y le confiere una carga neta negativa, la cual forma un complejo que migra a lo largo del campo eléctrico formado por el Buffer del sistema (Walker, 1994).

Equipo para electroforesis: Se utilizó una cámara para electroforesis marca Bio-Rad Mini-PROTEAN 3, una fuente de poder Bio-Rad power-pack 3000, y los aditamentos recomendados por el fabricante.

Preparación de geles y fraccionamiento:

1. Armar el molde para la preparación del gel según lo estipulado por el fabricante (en este caso Bio-Rad).
2. Preparar la solución del gel separador a la concentración deseada. Añadir al final el TEMED y el persulfato de amonio al 10%. Verter la solución en el molde hasta antes de 1 cm del borde superior del vidrio corto.
3. Agregar en la parte superior del gel 300µl de H₂O para formar una capa y evitar burbujas de aire y pliegues en el gel.
4. Dejar gelificar y posteriormente decantar y eliminar el resto de agua con papel filtro.
5. Repetir el paso 2 para el gel concentrador (gel al 4%). Después de añadir la solución sobre el gel principal y colocar el peine, en este caso se utilizaron peines de entre 5 y 10 carriles con capacidad hasta para 100µl de muestra, eliminar las burbujas que se hayan formado con una aguja. El gel se puede utilizar inmediatamente o se mantiene a 4°C en solución de almacenaje.
6. Preparación de muestras. Las muestras experimentales se mezclan con buffer de Laemmli 1X 1:1 bajo condiciones reductoras (β-mercaptoetanol). Se colocan a 95°C durante 3 minutos.
7. Colocar las muestras y el patrón de pesos moleculares preteñidos en el carril correspondiente.
8. Correr el gel a 50V durante 10 minutos (si es necesario se detiene la corrida y se recarga el carril con muestra) elevar el voltaje a 120 V (30mA) durante 90 minutos a temperatura ambiente y hasta que el frente de la muestra llegue al final del gel.
9. Teñir el gel con Ag NO₃.

Apéndice 2. PROCESAMIENTO DE BANDAS DE PROTEÍNAS PARA SU ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO.

Una vez realizada la purificación de proteína, las bandas obtenidas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida el fragmento de gel que contiene la proteína de interés es deshidratado utilizando lavados sucesivos de acetonitrilo y un secado sucesivo bajo vacío (Westermeyer, R. 2002).

1. Destefir bandas de gel con EDTA y lavar con H₂O destilada 2 veces
2. Lavar las bandas con 300µl de acetonitrilo 50% durante 5 minutos.
3. Lavar bandas con 300µl de acetonitrilo 50% /50mM NH₄HCO₃ pH 8, durante 30 minutos.
4. Lavar bandas con 300µl de acetonitrilo 50% /10mM NH₄HCO₃ pH 8, durante 30 minutos.
5. Eliminar la solución y secar en Speedback durante 40 minutos.

Apéndice 3. TINCIONES DE GELES.

1. Tinción con $AgNO_3$.

La tinción con plata consta de varios pasos de lavado y la fijación irreversible de la proteína en el gel de poliacrilamida. Después de varios pasos de lavado y fijación, el gel es inmerso en una solución de nitrato de plata durante cierto periodo de tiempo. Una vez que termino este periodo se coloca en solución de formaldehído /carbonato de sodio. A este valor de pH tan alto el formaldehído reduce el nitrato de plata a plata metálica, la cual adquiere un color café oscuro a negro. El gel de poliacrilamida invierte el balance REDOX haciendo que no haya una reacción de tinción de fondo. Al final la reacción es detenida sumergiendo el gel en una solución ácida, de ácido acético muy diluido.

1. Fijar por 30 minutos en MeOH 50% / ácido acético 10%
2. Incubar 15 minutos en MeOH 5% / ácido acético 1%
3. Lavar con H_2O_{mq} tres veces por 5 minutos
4. Incubar 90 segundos en $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
5. Lavar con H_2O_{mq} tres veces por 30 segundos
6. Incubar 25 minutos en $AgNO_3$ 0.2%
7. Lavar con H_2O_{mq} tres veces por 60 segundos
8. Revelar con $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 2ml/100ml + Na_2CO_3 6%+ HCHO 37% 50 μ l/ 100ml
9. Detener reacción con ácido acético 6%

La preparación de todos los reactivos utilizados en este tipo de tinción debe de realizarse con agua bidestilada, y sin tocar ninguna parte del gel.

2. Tinción con Azul de Coomassie.

Primero se prepara la solución stock de azul de Coomassie (0.2% peso/volumen Coomassie Blue R350 en 60% metanol) se disuelve una tableta de Phast Blue R en 80 ml de H_2O destilada, se agita de 5 a 10 minutos; posteriormente se adiciona 120 ml de MeOH y se agita hasta que el colorante se disuelva. La solución se filtra y se puede mantener de 3 a 4 semanas a 4°C. Antes de realizar la tinción se prepara una solución 0.02% de tinción: mezclar 1 parte de la solución stock filtrada más 9 partes de MeOH:HOAc: H_2O destilada (3:1:6). El gel se coloca en esta solución durante un periodo de 30 minutos a 2 horas, después se revela con una solución de ácido acético 10%-Metanol 50% (Chrmbach, 1967, Fernandez.Patron, 1995).

3. Tinción con Zinc-Imidazol.

La utilización de sales de metales pesados (zinc, cobre) para tinción de geles de poliacrilamida radica en la precipitación selectiva de estos metales en la matriz del gel dejando a la proteína sin teñir y transparente. Este método de tinción es muy sensible (10 ng de proteína por banda), sencillo (dos pasos) y rápido (15 a 20 minutos). Además la tinción es reversible y es aplicable a sistemas que contienen SDS (Fernandez-Patron et al, 1995).

La tinción se realiza inmediatamente después de SDS-PAGE.

1. Incubar de 15 a 20 minutos con Imidazol-SDS 0.2 N / 0.1%.
2. Lavar rápidamente con H₂O destilada.
3. Incubar con ZnSO₄ 0.2 N hasta visualizar las proteínas.

IX. Hemerobibliografía.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Ra. M, Roberts K, Walter P. The cytoskeleton. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science; 2001. p. 916.

Allan JC, Mencos F, Garcia Noval J, Sarti E, Flisser A, Wang Y, Liu D, Craig P. Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia coproantigen*s in humans. Parasitology 1993; 107: 79-85.

Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Moran E, Ersfield 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; 114: 545-53.

Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms Cell Biol Intl 2003; 27: 727-33.

Beynon R. and Bond J. Proteolytic Enzymes. Oxford (New York). Oxford University Press. 2001. p. 208.

Bonder E M. Mooseker, M S. Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament. J Cell Biol 1986; 102: 282-88.

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). Mol Biochem Parasitol 1990; 40:87-93.

Cañedo L. Laclette JP, Morales E. Evagination of metacystode of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F, editors. Cysticercosis: present states knowledge and perspectives. New York. (USA). Academic Press. 1982. p. 363-64.

Cebria F, Vispo M, Newmatk P. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planaria *Giardia tigrina*. Develop genes Evol 1997; 207: 306-16.

Cheng C. T. Parasitología General. España: Editorial Delta A. C. 1978. p. 234-46.

Chrambach A. Reisfeld M. Wyckoff M. Zaccari, J. A procedure for rapid and sensitive staining of protein by polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 1967 20: 150-54.

Cleveland D W. Stuart G. Fischer M W. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J Biol Chem 1977; 262 (3): 1102-06.

Cohen CM, Tyler JM, Branton D. Spectrin-actin associations studied by electron microscopy of shadowed preparations. Cell 1980; 21(3): 875-73.

Cooper J A 1987. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. J Cell Biol 1987 105: 1473-78.

Cooper G M. La célula. Madrid, España: Ed. Marbán Libros S. L. 2002; 421-426.

da Silva M D, Ferreira H B, Picón M, Gorfinkiel N, Ehrlich R, Zaha A. Molecular cloning and characterization and actin genes from *Echinococcus granulosus*. Mol Biochem Parasitol 1993 ; 60: 209-20.

Díaz-Camino C, Villanueva M A. Purification of multiple functional leaf-actin isoforms from *Phaseolus vulgaris* L. Biochem J 1999; 343: 597-602.

Dos Remedios C G, Chhabra D, Kekic M, Desova I V, Tsubakihara D A, Nosworthy N J. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. Physiol Rev 2003; 83 (2): 433-73.

Drew J S, Murphy R A. Actin isoform expression, cellular heterogeneity, and contractile function in smooth muscle. Can J Physiol Pharmacol 1997; 75: 869-77.

Eddinger TJ, Murphy RA. Two smooth muscle myosin heavy chains differ in their light meromyosin fragment. Biochemistry 1988 May 17;27(10):3807-11.

Estes J E, Selden L A, Gershman, L C. Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. Biochemistry 1981; 20: 708-12.

Elzinga M Collins H. The Primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. J Biol Chem 1975; 250 (15): 5897-905).

Fernandez-Patron C, Hardy E, Sosa A. Double stained of Coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium-dodecyl-sulfate-zinc-staining: sensitive detection of Coomassie blue undetected proteins. Anal Biochem. 1995; 224. 263-69.

Flisser A. Taeniasis and Cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Sun Tsiech, editor. Progress in Clinical Parasitology. CRC Press, Inc; 1994.

Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis Humana. México, D. F: Ed. Manual Moderno 1997. p. 5-17.

Gonzales-Malerva L, Cruz-Rivera M, Reynoso-Ducoing O, Retamal C, Flisser A, Ambrosio J. Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda). Cell Biol Intel 2004; 28: 885-94.

Grossman Z Ram D Markovics A. *Schistosoma mansoni*: stage-specific expression of muscle-specific genes. Exp Parasitol 1990; 70: 62-71.

Gunning P. Weinberger R. Jeffrey P. Actin and Tropomyosin Isoforms in Morphogenesis. Anat Embryol (Ber)1997; 195: 311-15.

Hanson J Lowy J. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. J Mol Biol 1963; 6: 46-60.

Herman IM. Actin Isoforms. Curr Opin Cell Biol 1993; 5: 48-55.

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, and Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature* 1990; 347: 44-49.

Hooge MD. Evolution of Body-Wall Musculature in the Platyhelminthes (Acoelomorpha, Catenulida, Rhabditophora). *J Morphol* 2001; 249: 171-94.

Huxley HE. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J Biophys Biochem Cytol* 1957; 3: 631-47.

Hozumi T. Structural aspects of skeletal muscle G-actin molecule as studied by proteolytic digestion: effect of nucleotide. *Biochem Int* 1988 Jul;17(1):171-8.

Janmey PA, Chaponnier C. Medical Aspects of the Actin Cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 111-17.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, and Holmes KC. Atomic structure of the actin-DNase I complex. *Nature* 1990;347: 37-44.

Kellner R, Lottspeich F, Meyer HM. 1999. *Microcharacterization of Proteins*. Wiley-VCH. New York 1999; 325.

Khaitlina SY, Smirnova TD. Limited proteolysis of actin by a specific bacterial protease. *FEBS Lett* 1988; 228(1): 172-4.

Khaitlina SY. Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol* 2001;202: 35-98.

Kobayashi C, Kobayashi S, Orii H. Identification of two distinct muscles in the planarian *Dugesia japonica* by their expression of myosin heavy chain genes. *Zool science* 1998; 15: 861-69.

Kumar D, McGeown JG, Reynoso-Ducoing O. Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 2003; 127: 457-73.

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85.

Liebler DC. *Introduction to proteomics Tools for the New Biology*. Totowa, NJ (USA). Humana Press. 2002. p. 83-87.

Lumnsden RD, Byram III J. The ultrastructure of cestode muscle. *J Parasitology* 1967; 53(2). 326-42.

MacLean-Fletcher S, Pollard TD. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* 1980; 20: 329-41.

Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol* 1998; 84:882-6.

Morano I. Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. *J Mol Med* 2003; 81: 481-87.

Mounier N, Sparrow J. Structural comparisons of muscle and nonmuscle actins give insight into the evolution of their functional difference. *J Mol Evol* 1997; 44: 89-97.

Matsumoto Y, Perry G, Levine RJC. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature*, London 1998; 333, 76-78.

Murphy RA. Do the cytoplasmic and muscle-specific isoformas of actin and myosin heavy and light chains serve different functions in smooth muscle?. *Jpn J Pharmacol* 1992; 58 (supl. II): 67P-74P.

Murphy RA, Walker JS, Strauss JD. Myosin isoformas and functional diversity in vertebrate smooth muscle. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 1997; 117: 51-60.

Ono S. Purification and Biochemical Characterization of Actin From *Caenorhabditis elegans*: Its Difference from Rabbit Muscle Actin in the interaction With Nematode ADF/Cofilin. *Cell Motil Cyt* 1999; 43:128-36.

Oliveira GC, Kemp WM. Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Mol Bioche Parasitol* 1995; 75: 119-22.

Orlova A, and Egelman EH. Structural dynamics of F-actin. I. Changes in the C terminus. *J Mol Biol* 1995; 245: 582-97.

Orlova A, Chen X, Rubenstein PA, Egelman EH. Modulation of yeast F-actin structure by a mutation in the nucleotide-binding cleft. *J Mol Biol* 1997; 271: 235-43.

Pascolini R, Panara F, DiRosa I. Characterization and fine structural localization of actin- and fibronectin-like proteins in planaria (*Dugesia lugubris* s. l.). *Cell Tissue Res* 1992; 267: 499-506.

Prochniewicz E, Strzelecka-Golaszewska H. Chicken-Gizzard Actin *Eur J Biochem*. 1980; 106: 305-312.

Rubenstein, P A. The functional importance of multiple actin isoforms. *BioEssays*. 1990; 12 (7): 309-315.

Rosenberg IM. *Protein Analysis and Purification*. Boston (USA): Birkhäuser 1996. p. 183.

Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Gooneskere N, Lindberg U. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 1993; 365: 810-816, 1993

Somlyo AP. Myosin isoformas in smooth muscle: how may they affect function and structure. *J. Muscle Res Cell Motil* 1993; 14: 557-63.

Sheterline P, Clayton J, Sparrow JC. *Protein Profile: Actin*. Oxford New York: Oxford University Press, 1998. p. 11-23.

Spudich JA, Watt S. The regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction. *J Biol Chem* 1971; 246 (15). 4866-871.

Szent-Geörgyi A, Cohen C, Kendrick-Jones J. Paramyosin and the filaments of molluscan catch muscle. II Native filaments: isolation and characterization. *J Mol Biol* 1971; 56: 239-58.

Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 1978; 126(4):783-802.

Vandekerckhove J, Weber K. Comparison of the amino acid sequences of three tissue-specific cytoplasmic actins with rabbit skeletal muscle actin [proceedings] *Arch Int Physiol Biochem* 1978; 86(4):891-2.

Vandekerckhove J, Weber K. Actin amino-acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin. *Eur J Biochem* 1978;90(3):451-62.

Villanueva MA, Campos F, Díaz C, Colmenero-Flores JM, Dantán E. Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 1999; 207: 582-9.

Wahlberg MH, Johnson MS. Isolation and characterization of five actin cDNAs from the cestode *Diphylobothrium dendriticum*: a phylogenetic study of the multigene family. *J Mol Evol* 1997; 44: 159-68.

Walker JM. *Methods in molecular biology: Basic protein and peptide protocols* (volume 32) New Jersey (USA): Humana Press. 1994. p. 246.

Wehland J, Weber K. Actin rearrangement in living cells revealed by microinjection of a fluorescent phalloidin derivative. *Eur J Cell Biol* 1981; 24: 176-83.

Westermeyer R, Naven T. *Proteomics in Practice*. Germany: Wiley VCH 2002. p. 186-187.

Wieland T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem* 1978; 5: 185-260.

Wulf E, Deboen FA, Bautz H, Wieland T. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4498-502.

Yanagida T M, Jakase K, Oosawa F. Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature (Lond)* 1984; 307: 58-60.

Zechel K, Weber K. Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 1978; 89. 105-112.