



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVIDENCIAS INMUNOBIOQUÍMICAS DE
UN INHIBIDOR DE TRIPSINA Y TRIPSINA
EN CISTICERCOS DE *Taenia solium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CARLOS OLVERA SALAZAR



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Tutor de Tesis: Dr. Agustín Plancarte Crespo

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del Jurado

Olvera
Salazar
Carlos
Tel. 59706152
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biólogo

Doctor
Agustín
Plancarte
Crespo

Doctor
Guillermo
Salgado
Maldonado

Maestra en Ciencias
Ana Lucia
Serenio
Uribe

Biólogo
Andrés
Martínez
Aquino

Biólogo
Luis Bernardo
Luna
Ulloa

Evidencias inmunobioquímicas de un inhibidor de tripsina y tripsina
en cisticercos de *taenia solium*.

65 paginas

2006

Dedicatoria.

A la memoria de mi padre Ignacio Olvera que de alguna manera siempre esta presente en esos momentos importantes de mi vida.

A mi madre Maria Guadalupe Salazar por su gran apoyo. Por tener la confianza de dejarme ser como soy y por la paciencia que siempre me ha tenido.

A mi hermana Angélica que muy a su manera me ha brindado su apoyo y su comprensión y sobre todo por aguantas todas mis loqueras.

A Gabrielita por ese gran apoyo, por esa gran compañía y sobre todo por animo que me diste, sin en cual este trabajo no hubiera sido posible muchas gracias.

A mi amigo de antaño Rubén, y las grandes borracheras que nos hemos puesto.

A mis cuadernos de la universidad: Victoria, Inti, Rudo, Mirziux, Carlillos, Sinueso los cuales siempre creyeron en mi e hicieron de las practicas de campo fueran históricas

Agradecimientos

Al Dr. Agustín Plancarte. Gracias por su asesoría a lo largo de este trabajo, por sus consejos, el apoyo, la enseñanza y la paciencia que me brindó.

A mis sinodales: Dr. Guillermo Salgado, M. en C. Ana, Biol. Andrés y Biol. Luis los cuales me brindaron sus consejos para la culminación de este trabajo.

A la UNAM Por darme la infraestructura y estar con lo mejor de lo mejor durante mi formación profesional, por la oportunidad de sentir ese amor a la camiseta y gran orgullo de ser universitario

A los compañeros del laboratorio con los cuales se compartieron una buenas chelillas uno que otro viernes

Índice:

1. Introducción.....	1
1.1. Ciclo Biológico.....	1
1.2 . Enfermedad.....	6
1.3. Epidemiología.....	7
1.4. Respuesta Inmune.....	8
1.5. Enzimas.....	12
1.6. Inhibidores.....	13
1.7 Resumen.....	14
2. Justificación del trabajo.....	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	17
4.1. Objetivo General.....	17
4.2. Objetivos Particulares.....	17
5. Materiales y Métodos... ..	18
5.1. Obtención de los cisticercos.....	18
5.2. Solubilización de los cisticercos.....	18
5.3. Cromatografía de intercambio Aniónico.....	19
5.4. Cromatografía de Afinidad de Sefarosa Con-A.....	19
5.5. Análisis de Inhibidor de Tripsina y Tripsina en gel.....	20
5.6. Ensayos enzimáticos.....	20
5.7. Producción de inmunógenos y anticuerpos.....	21

5.8. Evaluación de los anticuerpos por el ensayo inmunoenzimático en pozos (ELISA).....	23
5.9. Inmunoelectrotransferencia.....	24
5.10. Enfoque isoelectrico y electroforesis en geles en doble dimension.....	25
5.11. Ensayo enzimático en las tiras de nitrocelulosa.....	26
6. Resultados.....	27
6.1. Obtención de los cisticercos.....	27
6.2. Purificación del inhibidor de tripsina.....	27
6.3. Ensayos en solución del inhibidor de tripsina.....	34
6.4. ELISAs.....	37
6.5. Fracción 140-180 en inmunoblots de una dimension.....	39
6.6. Fracción 45-50 y 140-180 en doble dimension	41
6.7. Ensayos en solución para tripsina.....	43
6.8. Inmunoelectrotransferencia en búsqueda de tripsina del parásito.....	44
7. Discusión.....	46
8. Conclusiones.....	50
10. Apéndice.....	51
9. Bibliografía.....	59

1. INTRODUCCIÓN

Taenia solium es un gusano segmentado, parásito del hombre y del cerdo. Su clasificación biológica es la siguiente

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophylidea

Familia: Taenidae

Género: Taenia

Especie: *Taenia solium* (Linnaeus, 1758; Weisz, 1985).

1.1. CICLO BIOLÓGICO

Taenia solium presenta tres formas diferentes o estadios: el huevo, la larva y el adulto.

El huevo se encuentra en los proglotidos maduros, la forma adulta del cestodo. Éstos son arrojados al medio ambiente junto con el excremento por un individuo teniásico o huésped definitivo. Los huevos son esféricos de 30-40 μm de diámetro y poseen en su interior al embrión hexacanto. El embrión está rodeado por una membrana o pared radial, por encima de ella se encuentra el embrióforo, formado por bloques constituidos principalmente de queratina y unidos por una proteína cementante que la hace relativamente rígida y le otorga una protección a la oncosfera o embrión, principalmente mientras ésta se encuentra en el medio ambiente Fig.1 (Yoshino 1933).

Si el hombre o el cerdo ingieren huevos del parásito que han contaminado sus alimentos o bebidas, los huevos perderán sus cubiertas al entrar en contacto con el ácido clorhídrico, diversas enzimas presentes en el estómago y la bilis. De esta forma se liberan las oncosferas de sus cubiertas, y pueden atravesar la pared intestinal y alcanzar el torrente sanguíneo y/o linfático. Por medio de estos dos sistemas circulatorios se dispersan en los tejidos de sus huéspedes intermediarios donde evolucionan al estadio larvario o de cisticerco en aproximadamente 8

semanas. La denominación de hexacanto que se le da al embrión se debe a que presenta seis ganchos pero se consideran larvas una vez que salen del huevo y desarrollan su escolex con una doble corona de ganchos idéntica a la del parásito adulto (Carpio, 2002).

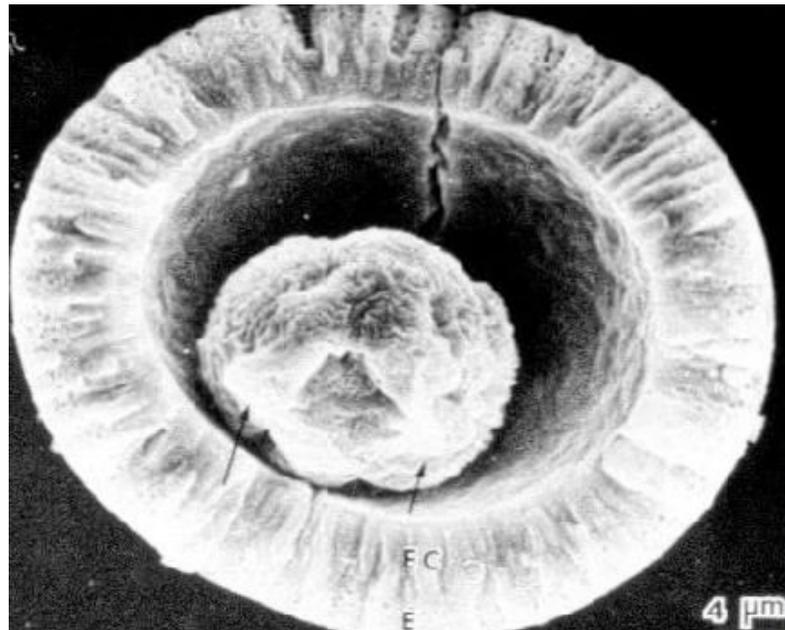


Fig. 1 Micrografía de un oncosfera ó huevo de *Taenia solium* rodeado por el embriofo (microscopio electrónico) Tomado de: Lacleite y col, 1982.

La larva o metacéstodo denominado también cisticerco, está formado por una vesícula ovalada de 0.5 a 1.5 cm de diámetro y un escolex en su interior debido a que se encuentra invaginado. Fig. 2 El escolex posee un rostelo armado formado de cuatro ventosas y una doble corona de ganchos que en número son de 22 a 28. El escolex se observa como una esfera blanca opaca suspendida dentro de la vesícula. La superficie externa del cisticerco, o pared vesicular es un tejido tegumentario con microvellosidades. La pared vesicular contiene también varios tipos de células de tejido conectivo y corpúsculos calcáreos que se mezclan entre ellas y están rodeadas por el fluido vesicular, el cual es más del 90% del contenido de la larva. Cuando el parásito muere, es reabsorbido lentamente dejando una concreción calcificada. Los cisticercos pueden encontrarse en cualquier tejido de

sus huéspedes y en el hombre es en el sistema nervioso central donde se presentan dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. El cisticerco celuloso mide de 0.5 a 2 cm de diámetro; está formado por una vesícula ovalada blanca o amarillenta con una pared translúcida llena de líquido a través de la cual se puede observar el escólex como un gránulo sólido. Estos cisticercos, frecuentemente están separados del tejido del huésped por una cápsula fina de colágena casi siempre se encuentran en los espacios subaracnoideos o se encapsulan dentro del tejido cerebral. Los cisticercos alojados en los humanos y en los cerdos, presentan características morfológicas similares (Rabiela et al, 1972; Aluja et al, 1987). A su vez el cisticerco racemoso tiene una vesícula grande, redondeada o lobulada, circunscrita por una pared delicada, o bien parecida a un racimo de uva. Estas formas parasitarias son muy grandes, pueden llegar a medir de 1 a 2 cm y contener hasta 6 ml de fluido (Berman et. al, 1981; Jung et. al, 1981), una de sus principales características es que carecen de escólex. En apariencia, el cisticerco inicia en algunos casos su desarrollo en el tejido cerebral, y el escólex degenera más tarde hasta desaparecer mientras la pared vesicular prosigue su crecimiento y su proliferación racemosa intermedia entre celuloso y racemoso que son bilobuladas las cuales poseen un escólex claramente visible, como los cisticercos celulosos y una vesícula muy grande, como los cisticercos racemosos (Rabiela 1982, 1985, 1989). Tanto los cisticercos racemosos como las formas intermedias se localizan en las cavidades ventriculares y entre las meninges de las cisternas basales (Rabiela 1989). Es muy posible que cuando los parásitos se localizan en áreas espaciosas, tienen la libertad de crecer y de transformarse finalmente en cisticercos de este tipo produciendo los principales problemas de salud (Rabiela, 1972; Escobar, 1983). En el cerdo los cisticercos musculares contribuyen principalmente a continuar el ciclo biológico del parásito, debido a la ingesta de la carne parasitada por parte del hombre (Barry y Kaldjian, 1993).

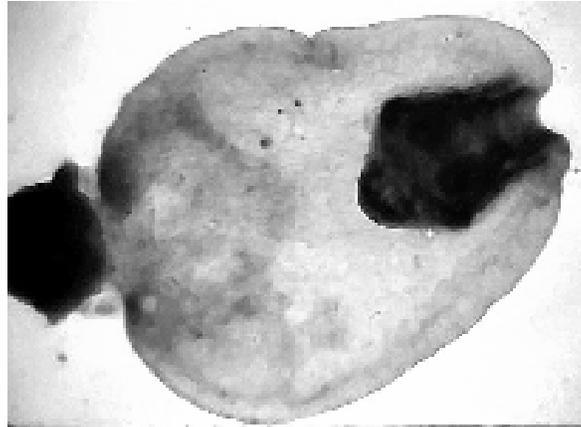


Fig 2. Cisticerco de *Taenia solium*. microscopio electrónico

Cuando un individuo ingiere carne de cerdo semicruda infectada con cisticercos, el escólex del parásito evagina por la estimulación de la bilis y de las enzimas digestivas del huésped. El escólex se fija al intestino delgado y el gusano continúa su desarrollo a la forma adulta la cual presenta tres regiones:

Escólex: Es un órgano de fijación a la mucosa intestinal, redondeado con acetábulos ovales o redondos, además de un rostelo armado de 22 a 32 ganchos que miden cada uno entre 0.11 y 0.18 mm de largo. El escolex del adulto es el mismo al de la etapa de cisticerco Fig 3.

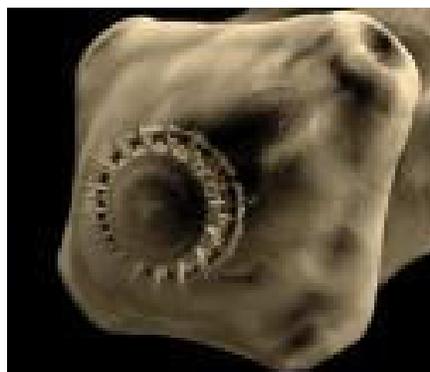


Fig 3. Escolex de *Taenia solium*. Tomado de: www.dr.dk/.../rubrik/3703/index.jpg

Cuello: Es la región de tejido indiferenciado situado inmediatamente después del escólex; es la zona no segmentada y produce por septación transversal a los proglótidos, que componen al estróbilo; de ahí que la infección persista mientras el escólex y el cuello permanezcan unidos a la pared del intestino del hospedero.

Estróbilo: Formado por un número variable de segmentos llamados proglótidos, que aumentan su grado de madurez a medida que se alejan del cuello. En el extremo más próximo al cuello se encuentran los proglótidos inmaduros, en los que apenas se distinguen las formas celulares que originan los órganos genitales masculinos y femeninos dentro de cada proglótido, dado que son parásitos hermafroditos. A continuación se encuentran los proglótidos maduros, de forma cuadrangular, en los que se observan órganos reproductores completamente desarrollados con 150 a 200 testículos. En la porción final del estróbilo se localizan los proglótidos grávidos de forma rectangular, ocupados casi en su totalidad por el útero que presenta entre siete y trece ramas como rasgo específico para *T. solium*, y con los órganos sexuales atrofiados y llenos de huevos Fig. 4 (Silverman, 1954; Cordero, 1990).



Fig. 4 *T. solium* vista de una tenia completa, en el extremo mas delgado se encuentra el escólex. Tomado de: www.medizin.de/.../low/2442-bandwurm.jpg

1.2.2. Cisticercosis

La cisticercosis en el hombre ocurre como consecuencia de la ingestión de huevos de *T. solium*, por medio del agua y alimentos contaminados. Dando lugar a cisticercosis muscular, ocular, o del sistema nervioso central, ésta última se conoce como neurocisticercosis (NC). Esta enfermedad es la parasitosis más común registrada para el sistema nervioso central (SNC), la cual puede presentar síntomas como dolor de cabeza, desequilibrio neurológico, parálisis en uno o varios miembros, epilepsia, ceguera, hidrocefalia, demencia, déficit neurológico focal e incluso la muerte (Barry y Kaldjian, 1993). Cabe destacar que gran parte de los individuos que presentan NC no desarrollan síntomas clínicos, incluso algunos de estos individuos pasan toda su vida sin saber que alojan en sus tejidos este tipo de parásitos (Arriaga, 1997).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Se calcula que a nivel mundial unas cincuenta mil personas mueren anualmente debido a la cisticercosis. Cabe destacar que hay cierta dificultad para determinar adecuadamente la magnitud de la cisticercosis debido a la tendencia de minimizar el problema por parte de las dependencias gubernamentales de salud (Fisser, 1986). Sin embargo las frecuencias globales reportadas en algunos países latinoamericanos son muy elevadas, hasta un 3.4% en México y 3.15% en Brasil. (Alarcón et al, 1999; Sarti y Gutierrez, 1986). En México los estados con la más alta la frecuencia de neurocisticercosis en los años 1983 a 1985 fueron Guerrero (24.4%), Michoacán (12.7%), Estado de México (12%), San Luis Potosí (7.8%) y Puebla (7.1%). La alta prevalencia de la cisticercosis corrobora con las notificaciones para teniasis humana y cisticercosis porcina, como se observa en Morelos (11.4%), Distrito Federal (8.7%), Guanajuato (7.8%), Michoacán (7.1%) (Sarti, 1989).

En los últimos 20 años, se ha incrementado la reincidencia de cisticercosis en países desarrollados. La migración de poblaciones de países con alta frecuencia de *T. solium* es la causa principal (Evans, et al., 1997).

La migración de individuos infectados con *Taenia solium* a países desarrollados es la causa principal de la dispersión de la enfermedad (Alarcón, 1999).

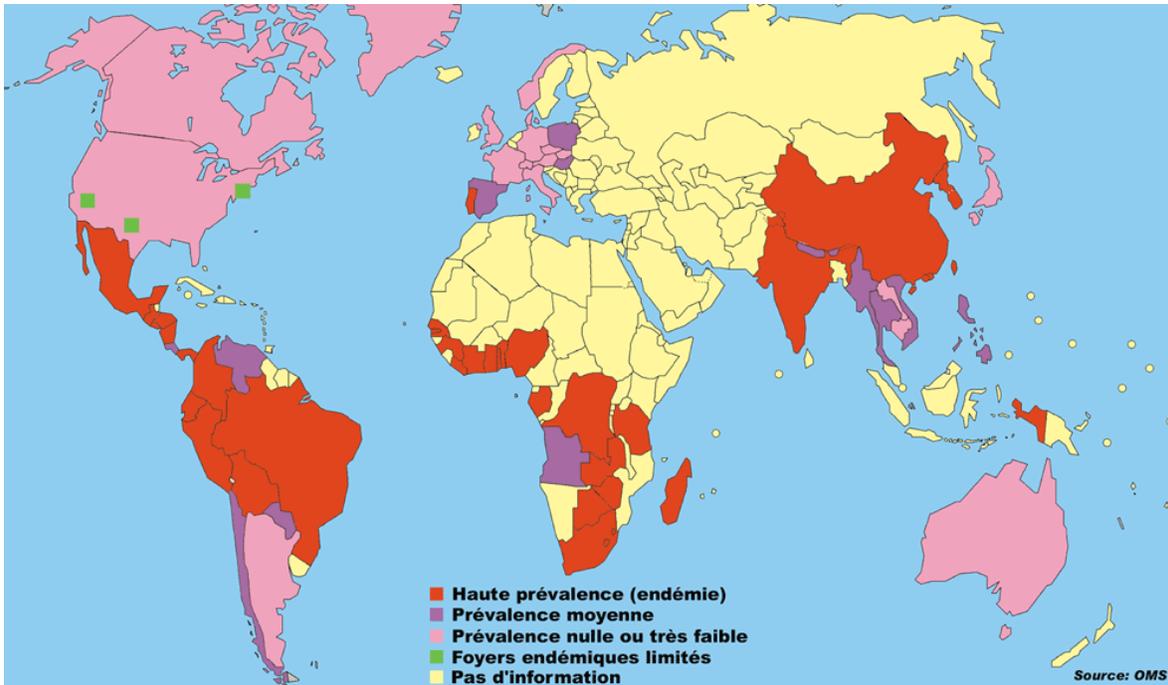


Fig. 6 Países con registros sobre la presencia de cisticercosis. Tomado de:
Organización Mundial de la Salud.

1.4. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es un proceso complejo regulado por actividades que afectan a varios tipos celulares. La respuesta inmune se desencadena cuando un antígeno ingresa al cuerpo y encuentra una clase especializada de células llamadas células presentadoras de antígeno (CPA). Las CPA pueden capturar una cantidad diminuta de antígeno y lo exhiben de manera que pueda ser reconocido por linfocitos T cooperadores. Las células T cooperadoras se activan y, a su vez, promueven la activación de otros tipos de células inflamatorias y linfocitos, como las células B o las células T citotóxicas. Después, los linfocitos activados proliferan y realizan sus funciones secretoras específicas; en la mayor parte de los casos, éstos inactivan o eliminan exitosamente al antígeno. En cada etapa de este

proceso, los linfocitos y las CPA se comunican entre sí a través de contacto directo o mediante la secreción de citocinas reguladoras (Abul et al., 1995).

La respuesta inmune puede ser localizada o sistémica, casi siempre son específicas, y centran su fuerza contra el antígeno mientras originan poco o ningún daño a los tejidos normales del huésped. Estas respuestas también se controlan de manera precisa y terminan normalmente poco después de que se elimina el antígeno en cuestión (Janeway et al., 2000).

En el sentido estricto, un antígeno se refiere a la propiedad que tiene una molécula de ser reconocida por una inmunoglobulina o receptor de célula T, de esta manera actúa como blanco de una respuesta. En términos generales, las proteínas son los inmunógenos más potentes. Otros tipos de moléculas como lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, con frecuencia se vuelven blanco de las respuestas inmunitarias cuando se enlazan a una proteína inmunógena, como en el caso de las lipoproteínas, glucoproteínas y complejos de nucleoproteínas (Stites et al., 1998).

Los anticuerpos: son conocidos como inmunoglobulinas las cuales son elementos fundamentales en cada etapa de una respuesta inmunitaria humoral. Cuando los anticuerpos se expresan sobre la superficie de linfocitos B en reposo, actúan como receptores que pueden detectar y distinguir entre la gran variedad de posibles antígenos que se encuentran en el ambiente. Al fijar sus antígenos, las inmunoglobulinas pueden iniciar una cascada de procesos de señalización que quizá culmine con la activación de la célula B, proliferación clonal y generación de células plasmáticas. Las inmunoglobulinas que son secretadas como resultado de esta activación funcionan entonces como anticuerpos (Stites et al., 1998).

La respuesta por parte de los inmunógenos proteínicos (anticuerpos) puede empezar solo cuando el inmunógeno es capturado, procesado y presentado por una CPA, y el motivo de esto es que las células T sólo reconocen inmunógenos unidos a proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células. Hay dos clases diferentes de proteínas de MHC, cada una de las cuales es reconocida por uno de los dos subgrupos principales de linfocitos T. Las proteínas del MHC clase I se expresan en prácticamente todos

los tipos de células somáticas y se usan para presentar sustancias a las células T CD 8 que son citotóxicas. Por lo que, casi toda célula puede presentar antígenos a las células T citotóxicas y en consecuencia actuar como un blanco de una respuesta citotóxica. Por otra parte, las proteínas del MHC clase II se expresan únicamente por macrófagos y por algunos otros tipos celulares; contribuyendo en la presentación del antígeno a las células T CD 4, subgrupo que incluye la mayor parte de las células cooperadoras (Stites et al., 1998).

Los mecanismos de la respuesta inmune provocada contra el cisticerco de *T. solium* en individuos parasitados presentan una respuesta inmune humoral heterogénea, los cisticercos vivos pueden causar una infección asintomática a través de mecanismos de evasión activa y supresión de la inmunidad (evasión de la respuesta inmune) (Molinari, 1983). En estudios histológicos se ha mostrado tanto en humanos como en cerdos que los cisticercos viables muestran poca o nula inflamación en su alrededor. En contraste con los cisticercos en degeneración, los cuales presentan una reacción inflamatoria alrededor, lo cual puede ocasionar una enfermedad sintomática. La respuesta inmunológica del huésped puede ser dividida en humoral y celular. La respuesta inmune humoral a antígenos del cisticerco de *T. solium* incluye muchas clases de inmunoglobulinas son producidas como anticuerpos específicos contra el parásito. La respuesta inmune contra los cisticercos de *T. solium* tiene componentes Th1 y Th2 aunque los mecanismos subsecuentes no están bien definidos. Es probable que la muerte del parásito se deba a los eosinófilos que son atraídos al sitio por las células linfoides. Se asume que este tipo de respuesta es mediada por citosinas Th2. La respuesta inflamatoria que conduce a la muerte del parásito y a la resolución con fibrosis parece estar mediada por citosinas Th1 (Abul et al., 1995; Stites et al., 1998).

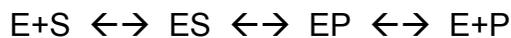
La evasión de la respuesta inmune del huésped por el parásito, es un proceso inmunológico en el cual existe un equilibrio estable huésped-parásito. Esto da como resultado que el parásito sea capaz de sobrevivir dentro del huésped por periodos largos. El sitio donde las oncoesferas se asientan y la naturaleza de su relación con el huésped que las encapsuló pueden contribuir a evitar el ataque

inmune hacia los parásitos. La distribución desigual de los cisticercos a través de los tejidos del cuerpo podría resultar de una invasión selectiva por el parásito o una supervivencia diferente de la larva en sitios inmunológicamente privilegiados. Algunos estudios sugieren que los cisticercos se desarrollan mejor en el ojo y en el sistema nervioso central que en otros tejidos u órganos. Un mecanismo inmunitario concomitante ha sido propuesto también en relación con la protección conferida por parásitos ya establecidos contra parásitos de la misma especie. Esta idea implica que una infección previa protege contra una nueva infección. Aunque esto no ha sido completamente comprobado, la síntesis de antígenos similares a los del huésped por el parásito puede ser uno de los mecanismos involucrados en la evasión inmune (Delves y Roitt, 2000). Por otro lado tanto la tripsina como su inhibidor tienen papeles relevantes en la activación del complemento. El complemento presenta tres vías de activación, la clásica inducida por anticuerpos, la de la lectina y la alterna. Las dos primeras se activan por medio de serinas proteasas, la C1r y C1s participan en la vía clásica y las MAPS 1, 2 y 3, (siglas en inglés que significan: serinas proteasas activadas por manosa) en la vía de las lectinas. Las MAPS 1, 2 y 3 son equivalentes a las C1r y C1s, sin detallar los mecanismos de activación del complemento se sabe que C1s y MAPS 2 y 3 tienen como sustrato a C4 y cuando actúan sobre él permiten continuar la cascada del complemento. En el caso de la tripsina al ser una enzima perteneciente a la familia de las Serinas proteasas esta puede activar al complemento. La tripsina también actúa en mamíferos en los procesos de coagulación y digestión (Delves y Roitt, 2000; Leid, 1987).

Por otro lado, la vía clásica del complemento es inhibida por el inhibidor de C1q. El C1q es una serpina, es decir un inhibidor de serinas proteasas, de tal forma que el inhibidor de tripsina es una serpina con capacidad potencial de inhibir la vía clásica del complemento. En *Taenia taeniaeformis* este inhibidor denominado Teniastatina también es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos activados por lectinas.

1.5. ENZIMAS

El rasgo distintivo de una acción catalizada enzimáticamente es que tiene lugar en el sitio activo de la enzima. La molécula que se fija al sitio activo se denomina sustrato del cual se obtendrá un producto. Así mismo, las enzimas tienen un pH óptimo y estas se mantienen activas en un pequeño rango de este parámetro, por ejemplo la tripsina que secreta el páncreas humano que tiene un pH óptimo de 8. Una reacción enzimática presenta dos etapas: 1) La formación de un complejo entre enzima y sustrato; 2) La activación catalítica de una reacción en el lugar del complejo. Esta debe ser una reacción orientada y específica por la estructura del mismo complejo lo que nos da como resultado la enzima y el producto. La cual se puede expresar de la siguiente manera: (Monod, 1963).



En donde E es la enzima, S es el sustrato y P es el producto.

La velocidad de formación y descomposición del complejo ES están dadas por constantes de velocidad llamadas k_1 (formación) y $k_{-1} + k_2$ (descomposición) de tal manera que tenemos que la velocidad de formación es: $\frac{d(ES)}{dt} = k_1[(E_t) - (ES)](S)$ y la velocidad de descomposición es: $\frac{d(ES)}{dt} = k_{-1}(ES) + k_2(ES)$, esto nos da el supuesto de que la velocidad inicial de reacción refleja un estado estacionario en el que la velocidad de formación de (ES) es igual a la velocidad de descomposición, denominado suposición de estado estacionario lo que nos da como resultado que $k_1[(E_t) - (ES)](S) = k_{-1}(ES) + k_2(ES)$ lo que después de varios despejes de esta ecuación nos da como resultado: $(ES) = \frac{(E_t)(S)}{(S) + (k_2 + k_{-1})/k_1}$ donde $(k_2 + k_{-1})/k_1$ es la constante de Michaelis-Menten de tal manera que si la simplificamos nos da $(ES) = \frac{(E_t)(S)}{K_m + (S)}$. Ahora si V_0 esta en función de (ES) nuestra ecuación $(ES) = \frac{(E_t)(S)}{K_m + (S)}$ puede ser utilizada para V_0 dándonos como resultado que $V_0 = k_2(E_t)(S) / K_m + (S)$ dado que la velocidad máxima (V_{max}) se obtiene cuando la enzima esta saturada y $(ES) = (E_t)$, por lo que se puede definir V_{max} como $k_2(E_t)$ de tal manera que se puede sustituir por: $V_0 = \frac{V_{max} (S)}{K_m + (S)}$ la cual representa la ecuación de Michaelis-Menten.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar algebraicamente en formas que son útiles en la determinación práctica para determinar K_m y V_{max} , como en el caso del análisis de los inhibidores llamados también doble recíproco (Lehninger et. al, 1995).

1.6. INHIBIDORES

Los inhibidores de enzimas se pueden clasificar como reversible e irreversible y en el caso de la inhibición reversible esta se puede dividir en competitiva y no competitiva. En la competitiva el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima y de esta manera puede interaccionar con ella. En este caso el inhibidor suele ser estructuralmente similar al sustrato. Esta reacción se puede analizar cuantitativamente ya que el inhibidor se une de manera reversible y puede cambiar el sentido de la competición a favor del sustrato añadiendo más de éste, de tal manera que cuando hay suficiente sustrato se minimiza la probabilidad de que se fije una molécula del inhibidor a la enzima lo que nos da una V_{max} normal.

En el caso de la inhibición no competitiva el inhibidor se une a la enzima en un lugar que no es el sitio activo de la enzima, de tal manera que la enzima se inactiva debido a que esta unión cambia su estructura, de tal forma que su sitio activo no puede unirse al sustrato aun cuando este se encuentre presente. El inhibidor disminuye de manera efectiva el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima por lo que disminuye la V_{max} , pero no así la afinidad entre ambos, por lo tanto el efecto sobre K_m es nulo o casi nulo. En el caso de la inhibición irreversible el inhibidor se combina con un grupo funcional de la enzima, por lo general formando un enlace covalente de tal manera que la desactiva o incluso la puede destruir de manera permanente (Lehninger et. al, 1995).

Resumen

En este trabajo se desarrollaron diversas técnicas inmunobioquímicas con el objetivo de determinar la presencia de la tripsina y su inhibidor en los tejidos de los cisticercos de *Taenia solium*. Fracciones semipuras y diferentes entre sí, obtenidas de las cromatografías de Sefarosa Q y Sefarosa Con-A presentaron tanto actividad inhibitoria hacia la tripsina así como actividad hacia la tripsina. Ambas fracciones fueron aniónicas y no interaccionaron con la Concanavalina A. Las fracciones mencionadas reaccionaron con anticuerpos específicos contra el inhibidor de tripsina, las que presentaron esta actividad, y la tripsina, las que hidrolizaron el sustrato de la tripsina (TAME). Por geles de acrilamida de una dimensión la banda que reaccionó con anticuerpos anti inhibidor de tripsina presentó un peso molecular de ~30 kDa. Sin embargo por doble dimensión se observó en esta fracción al menos una proteína de ~20 kDa con un punto Isoelectrico de 5.0. También se pudo demostrar la reacción inmunológica cruzada entre la tripsina de vertebrados y diferentes sueros de conejos inmunizados con diferentes lotes de extractos crudos de cisticercos de *T. solium*.

Las evidencias demostradas en Este trabajo sugieren la presencia tanto de un inhibidor de tripsina como de tripsina. Sin embargo, debido a la escasa actividad inhibitoria e hidrólisis para el TAME en los ensayos en solución, podrían indicar que estas dos proteínas están pobremente representadas en el parásito.

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Se han documentado casos en donde los cisticercos de *T. solium* pueden sobrevivir periodos prolongados en sus huéspedes sin ocasionarles prácticamente algún daño. Es decir se sabe que el inicio de síntomas neurológicos en el hombre por la presencia de los cisticercos puede ocurrir hasta 30 años después de la infección, aunque lo mas frecuente es que suceda a los cuatro años (Dixon y Lipscomb, 1961). Adicionalmente, hallazgos fortuitos del parásito en casos de autopsias, donde la causa de muerte no fue la neurocisticercosis muestran las estructuras del parásito sin presentar algún daño (Rabiela et. al, 1972). La posible manera en que los cisticercos intactos deben de evitar la respuesta inmune es el desarrollar mecanismos de evasión inmune.

Por otro lado se sabe que tanto el inhibidor de tripsina como la tripsina tienen papeles relevantes en diversos efectores de la respuesta inmune, como en las dos vías de activación del complemento, y es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos activados por lectinas. La tripsina también actúa en el sistema del complemento y particularmente en mamíferos en los procesos de coagulación y digestión.

3. HIPOTEIS

Si se demuestra la presencia de un inhibidor de tripsina y tripsina en los tejidos de los cisticercos de *T. solium*, podrían estas moléculas relacionarse con algún mecanismo de evasión inmune.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia de la enzima tripsina y su inhibidor en cisticercos de *T. solium*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Desarrollar procedimientos bioquímicos para detectar tanto al inhibidor de tripsina como a la tripsina en el parásito.

Desarrollar procedimientos inmunológicos para detectar tanto al inhibidor de tripsina como a la tripsina en el parásito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. OBTENCIÓN DE LOS CISTICERCOS

Los cisticercos se obtuvieron de diferentes cerdos infectados en forma natural. Los cerdos provenían de los estados de Morelos y Guerrero y se sacrificaron en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Posteriormente, se disecciono el músculo de estos animales se extrajeron los parásitos libres del tejido del huésped, se lavaron con solución salina fisiológica amortiguadora con 100 mM de fosfato de sodio a un pH 7.2 (PBS) y se almacenaron a -70° C hasta su uso.

5.2. SOLUBILIZACIÓN DE CISTICERCOS

Se homogenizaron 20 g de cisticercos en 45 ml de Tris-HCl 10 mM y KCl 3M pH 8.0 (1:2.25 p / v), empleando un homogenizador de tejidos (Brinkman Instruments, New York, USA). La suspensión parasitaria fue sometida a pulsos de 10,000 g durante 1 min con intervalos de descanso de 30 segundos, en un número tal que permitiese la destrucción total de los parásitos. Posteriormente el homogenizado se dejo en agitación lenta a 4° C toda la noche. El homogenizado se centrifugó a 45,000 g durante 30 min. a 4° C, se dializó exhaustivamente con Tris-HCl 10mM pH 8.0 y se centrifugó a 105,000 g durante una hora a 4°C para obtener el sobrenadante 1 (Sn 1).

Este procedimiento se repitió dos veces más, incrementando la cantidad de cisticercos en una de ellas a 40 y en la otra a 80 gr. manteniendo la proporción (p/v) mencionada.

5.3. CROMATOGRAFÍAS DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Trescientos miligramos del Sn1 se pasaron en una columna de cromatografía líquida de Sefarosa-Q (2.5 cm x 40 cm) equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 8.0. El flujo de la columna fue de 2 ml / min; se colectaron fracciones de 3 ml. El comportamiento de las proteínas obtenidas de la cromatografía se registró a 280 nm. Después de obtener las proteínas que se excluyeron de la columna, se lavó exhaustivamente la resina, se eluyeron las proteínas adsorbidas a la resina por medio de 300 ml de un gradiente de NaCl 0-0.5 M en Tris-HCl 10 mM pH 8.0. El incremento de la fuerza iónica del gradiente se cuantificó con un conductímetro YSI modelo 3200. Se colectaron fracciones de 3 ml y se les evaluó su capacidad para inhibir la actividad enzimática de la tripsina, así como la presencia de tripsina. Las fracciones con actividad inhibitoria hacia la tripsina por un lado, y las que presentaron actividad de tripsina se juntaron por separado y concentraron por ultrafiltración en un sistema Amicon, empleando una membrana YM-5. Cromatografías similares a la descrita se llevaron a cabo con 540 mg y 1080 mg de Sn1, correspondientes a las otras 2 cantidades (40 y 80 g) de cisticercos mencionadas. Todas las cromatografías en Sefarosa-Q fueron realizadas bajo las mismas condiciones excepto el empleo de diferentes cantidades de masa parasitaria en cada una de ellas (Rossomando, 1990).

5.4. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE SEFAROSA-Con A

Las fracciones eluidas de las columnas de Sefarosa-Q ya sea con actividad inhibitoria hacia la tripsina y/o actividad de tripsina se pasaron sin ningún tratamiento previo por cromatografías líquidas de afinidad tipo Sefarosa Concanavalina-A (1.5 cm x 11 cm). Las columnas se equilibraron con Tris-HCl 20 mM pH 8.0. El flujo de las corridas fue de 0.23 ml / min, se colectaron fracciones de 1.37 ml, después de salir las proteínas excluidas y lavar exhaustivamente la columna, las proteínas adsorbidas a la resina se eluyeron con 120 ml de Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, CaCl 1 mM, MnCl 1 mM y 200 mM de α -metilmanosa. Se

colectaron fracciones de 1.5 ml y se les determinó la actividad para el inhibidor de tripsina y la tripsina. Las fracciones con actividad del inhibidor de tripsina y actividad de tripsina se juntaron por separado, concentraron como se mencionó anteriormente y se guardaron en alícuotas para ser analizadas (Ostrove, 1990).

5.5. ANÁLISIS DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA Y TRIPSINA EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE).

Para el análisis de la cromatografía Sefarosa-Q se tomaron 72 µg del Sn 1, 86 µg de la fracción 31-96, 87 µg de la fracción 140-180, 76.8 µg de la fracción 181-228, y como referencia se usaron 4 µl de control de peso molecular Gibco BLR 26041-020. En el análisis de la cromatografía Sefarosa Con-A Se tomaron 144 µg de Sn1, 86 µg de la fracción 31-96, 87 µg de la fracción 140-180, 76.8 µg de la fracción 181-228 y 4 µl de control de peso molecular Gibco BLR 26041-020. En el análisis del segundo lote de parásitos de la cromatografía de Sefarosa-Q se emplearon 112 µg de Sn1, 135 µg de la fracción 24-110, 135 µg de la fracción 169-175, 149 µg de Fr.176-206, 122 µg de Fr.207-240. Lo empleado para este lote en la cromatografía de Sefarosa Con-A fueron 15 µl Fr. 10-36, 15 µl Fr. 99-159, 15 µl Fr. 43-62, 15 µl Fr. 6-23, y en el análisis del tercer lote se colocó tanto la cromatografía de Sef.-Q como la Sef.Con-A, de Sn1 162 µg, 20 µg de Fr. 30-114, 102 µg de Fr.160-230, en Con-A 156 µg Fr. 27-36 µg se agregó el mismo volumen que tenía cada alícuota de mezcla desnaturizante, se homogenizaron calentaron a 100°C durante 5 minutos, al enfriarse se colocaron en sus respectivos pozos. La preparación de los geles se describe detalladamente en el apéndice (Laemmli, 1970; Meyer 1965).

5.6. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

La actividad biológica de *T. solium* para desarrollar la inhibición de la tripsina pancreática bovina (EC 3.4.21.4) se comprobó por su capacidad de bloquear la estérolisis del éster metilado de Tosil arginina (TAME). Alícuotas de 100 µl de las

fracciones obtenidas tanto en las cromatografías de intercambió iónico como de afinidad se mezclaron con 2.7 ml de amortiguador de Tris-HCl 46 mM, CaCl₂ 11.5 mM pH 8.1 y 2µg de tripsina pancreática. Esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Al final de la incubación se adicionaron 200 µl de solución de TAME 10 mM a cada tubo y se incubó a 37°C por 8 minutos. Al final de la incubación las muestras se leyeron a 247 nm. El grado de inhibición se determinó al comparar los tubos incubados sin la presencia del inhibidor. Una unidad del inhibidor de tripsina es definida como la cantidad del inhibidor del parásito que inhibe el 50% la actividad de la tripsina (Hummel, 1959; Birk, 1976).

5.7. PRODUCCIÓN DE INMUNÓGENOS Y ANTICUERPOS

Diversos conejos New Zealand fueron inmunizados intramuscularmente con 300 µg de inhibidor de tripsina de pavo tipo II (Sigma T-4385) ó tripsina pancreática de cerdo tipo IX-S (Sigma T-0303). Cada proteína se disolvió en 100 µl de amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.0) y se le adicionó 100µl de hidróxido de aluminio como adyuvante. Cada conejo recibió 3 estímulos inmunogénicos, preparados de la manera mencionada. El intervalo de tiempo transcurrido entre la administración de cada estímulo fue de 15 y 8 días. Después del último estímulo los conejos se sangraron a blanco. Como suero control negativo se utilizó una muestra de cada uno de los conejos, obtenida antes de efectuar el primer estímulo.

Otros tres conejos fueron inmunizados, cada uno con una proteína diferente de *T. solium* obtenidas de las fracciones 145 a 194 eluidas de Sefarosa-Q.

Esta fracción se separó en sus diferentes componentes proteicos en geles de poliacrilamida-SDS preparativos al 12 %, 75 x 1.5 mm (Laemmli, 1970). Al finalizar la electroforesis el gel se sumergió en un recipiente de vidrio transparente que contenía una solución recién preparada de acetato de sodio 4M. Varios minutos después, con la ayuda de una lámpara de luz blanca dirigida desde abajo del gel y en un cuarto oscuro, se observaron las bandas de proteínas transparentes contrastando con un fondo blanquizco indicativo de la ausencia de proteínas. De

esta forma se obtuvieron proteínas aisladas de componentes proteicos semipurificados para inmunizar a los conejos. Para determinar la cantidad de proteína que existió en cada tira de PAGE preparativo se corrió, en un gel analítico una curva patrón de albúmina sérica humana (HSA), (tabla 1) y las bandas se visualizaron con azul de Coomassie.

Tabla 1. Reacción entre diferentes concentraciones de albúmina sérica humana y la posición de los pozos en un PAGE.

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu\text{g HSA/ 0.8mm}$	0.1	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20

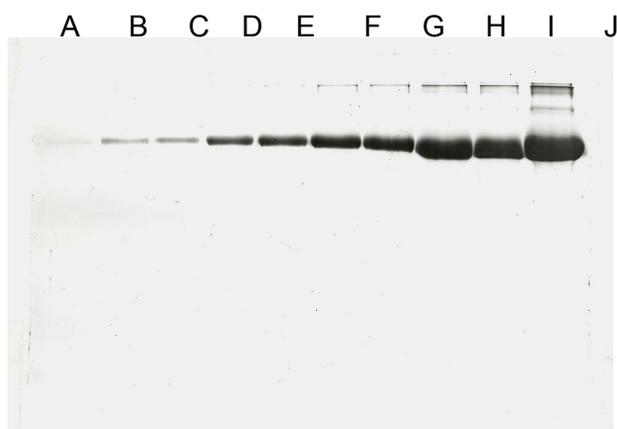


Fig. 7 Imagen de referencia de concentración de proteína en un PAGE al 12% reductor. En cada pozo del gel se colocaron diferentes cantidades de albúmina sérica humana (ASH) y al final de la electrofóresis se tiño el gel con azul de commassie. Estas bandas se emplearon para compararlas con las obtenidas de las diversas fracciones de purificación y estimar de esta forma su concentración proteica.

La curva patrón de proteína en PAGE, 12%, 0.75 mm de grosor, cada pozo tuvo una longitud de 0.8 mm. Para obtener la cantidad de proteína por mm de gel se dividió el total de proteína de cada pozo entre 0.8 mm. Al comparar el grado de tinción de la banda de 30 kDa de la fr e-SefQ con el de la banda de 2 µg de la curva patrón de HSA, ésta fue la más semejante entre ellas. Al multiplicar 0.25 µg por 88 mm (longitud total del gel donde existió proteína) resultó 22 µg de la banda de 30 kDa de la fr e-SefQ por tira de PAGE preparativo. Para preparar el inmunógeno de 30 kDa de la fr e-SefQ, se usaron 3 tiras de PAGE preparativos conteniendo esta proteína (66 µg de proteína en total) y se les adicionó 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente se maceraron al pasarlas de una jeringa de 10 ml a otra varias, veces sin aguja y, posteriormente con agujas de 1.2 x 40 mm.

Se inmunizó intramuscularmente a un conejo con 66 µg por estímulo del inmunógeno de 30 kDa de la fr e-SefQ, siguiendo el protocolo de inmunización previamente descrito al inicio de este capítulo. La sangre de todos los conejos inmunizados, después de ser sacrificados, se dejó 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 1200 g 15 min. a temperatura ambiente. Se separó el suero y en alícuotas se guardó a -20°C hasta su uso.

5.8. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS POR EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN POZOS (ELISA).

Se utilizaron placas de 96 pozos de la marca Nunc, Inhibidor de tripsina y tripsina comercial como antígenos similares a los empleados para inmunizar a los conejos así como los sueros de los conejos inmunizados. El diseño consistió en hacer reaccionar cada antígeno en diferentes cantidades frente a diferentes diluciones, tanto del suero homólogo como del conjugado.

Cada antígeno se evaluó en forma independiente. El ensayo se inició incubando por pozo 10 µg, 1 µg, ó 0.1µg de antígeno disuelto en 100 µl de amortiguador de carbonatos (0.159 g. de Na₂CO₃, 0.239 g. NaHCO₃ y 0.02 g. de NaN₃ en 50 ml de agua destilada) por 30 min a 37°C. Posteriormente se lavaron los pozos tres veces

durante 5 minutos cada una, con una solución de NaCl 150 mM, fosfato de sodio 100 mM mas 0.5% Tween-20 pH7.2. Inmediatamente después se colocó 100 µl del suero de conejo por pozo en diferentes diluciones seriadas de 1:100 a 1:16,000 e incubó a 37° durante 30 minutos. Al término de este tiempo se volvieron a lavar los pozos de manera similar y se continuó con la incubación, de manera ya mencionada, de 100 µl de anti-IgG de conejo en rata conjugado con peroxidasa por pozo. Las diluciones del conjugado fueron 1/100 y 1/500 en solución de lavado, luego se lavaron los pozos de forma ya descrita y se revelaron las reacciones con Orto-fenil diamina en amortiguador de citratos. La reacción se paró con hidróxido de sodio 1 M y posteriormente se leyó a 405 nanómetros (Engvall y Perlman. 1972).

5.9. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Este método combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia o ausencia de detergentes como dodecil sulfato de sodio (SDS), con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida (Towbin 1979). En el primer caso bajo las condiciones empleadas, las proteínas se separan de acuerdo a sus pesos moleculares, lo que permite su identificación; en el isoelectroenfoque se separan de acuerdo a su punto isoelectrico (Towbin y Gordon, 1984).

La primera parte del método consistió en correr las muestras proteicas en geles preparativos de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% los cuales se corrieron a 100 volts. con las fracciones obtenidas de la cromatografía de Sefarosa Q y Con-A. Posteriormente, estas proteínas separadas son electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) o de PVDF, quedando así inmovilizadas y expuestas a la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes, estas fueron incubadas por una hora con PBS-Twen con 5% de leche para bloquear los sitios reactivos del papel que quedaron libres(Brúñete, 1981), adicionando el suero normal, el suero anti-tripsina, el suero anti-inhibidor de tripsina y los sueros obtenidos de las fracciones 145-194.

Estas tiras se revelaron incubando por una hora con estos sueros a diferentes diluciones (1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000) en PBS con 0.3% de Tween-20 y leche al 5%, después se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS Tween, posteriormente se incubaron una hora con el suero anticonejo conjugado a peroxidasa a diferentes diluciones (1:100 y 1:1000) luego se hicieron 3 lavados con PBS Tween-20 y 3 lavados con PBS cada uno por 3 minutos después se reveló con DAB y peróxido, esta reacción se detiene con agua destilada (Peferoen, 1982, Tsang et. al, 1989).

5.10. ENFOQUE ISOELÉCTRICO Y ELECTROFORESIS EN GELES EN DOBLE DIMENSIÓN

La primera dimensión se realizó mediante tubos capilares los cuales contienen geles con 4% de acrilamida, 2% de triton X-100, 1.6% de anfolitos 5/7, 0.4% de anfolitos 3/10, 0.01% de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. En un tubo capilar se colocó 5 µg de la fracción de Sefarosa Q y en otro la misma cantidad de la fracción de Sefarosa Con-A. Posteriormente los geles se corrieron con un catolito de NaOH 100 mM en la cámara superior y de anolito H₃PO₄ 10 mM en la cámara inferior. Al sistema se le hizo pasar un voltaje de 500 V los primeros 30 minutos y de 750 V otros 150 minutos. De esta manera en la parte inferior de los tubos capilares obtuvimos un pH 3.5 y por el otro un pH de 10. Posteriormente se corrió la segunda dimensión para separar por peso molecular las proteínas (O'Farrel, 1975).

Al finalizar la segunda dimensión las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, como se describió anteriormente. Las proteínas trasferidas se visualizaron tiñendo la membrana de PVDF con azul de Comassie. También las proteínas transferidas fueron reveladas con anticuerpos de conejo específicos contra antígenos tanto del parásito, así como comerciales contra tripsina y su inhibidor.

5.11. ELECTOTRANSFERENCIA EN TIRAS DE NITRO CELULOSA (NC)

En cajas de 8 canales, se colocó en cada canal 0.5 ml de amortiguador de fosfatos-salina (PBS) 0.3% de Tween 20, 5% de leche descremada y suero normal de conejo o de algún conejo inmunizado con un antígeno mencionado en la parte de producción de anticuerpos. Los sueros se diluyeron 1:500 con solución de lavado que es la anteriormente mencionada pero sin leche descremada. Inmediatamente a esto, se sumergió una tira de NC en cada canal y en agitación lenta se mantuvieron así durante 1 hr. a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las tiras con solución de lavado haciendo 3 cambios de la misma con intervalos de 5 min cada uno. En seguida, por cada tira se incubó durante 1 h a temperatura ambiente 0.5 ml de anti-IgG de chivo contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa, diluida 1:1000 en amortiguador de lavado. Al término del periodo de incubación las tiras se lavaron como se describió anteriormente y se reveló la reacción antígeno-anticuerpo con 0.5 ml por tira de una solución de 3,3'-diaminobenzidina (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate [DAB], 97% pura Aldrich Chemical Co) al 5% en agua destilada y 0.5 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se paró con agua destilada. Para su análisis, las tiras se dejan secar sobre una hoja de acetato, se fijan a la misma pegándolas por un extremo e incluyendo la tira de NC que contiene los pesos moleculares y se cubren con otra hoja de acetato.

6. RESULTADOS

6.1. OBTENCIÓN DE LOS CISTICERCOS

En total se obtuvieron 250 g de cisticercos de 3 diferentes cerdos comprados en el estado de Morelos y Guerrero, México. Sin embargo no se supo ni el sitio ni la fecha de infección. Todos los parásitos mostraron la misma apariencia bajo observaciones macroscópicas, dimensiones de 0.5 mm, color rosado y ninguna calcificación.

6.2. PURIFICACIÓN DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA

Cromatografía de intercambio aniónico

Las figuras 8-10 muestran los valores de absorbancia a 280 nm indicaron que el primer pico, en cada una de ellas, correspondió a las proteínas excluidas porque no interactuaron con la resina. La magnitud de los picos de exclusión de las cromatografías con 20 y 40 g de parásitos fue similar, ya que sus valores máximos fueron de 0.182 y 0.118 nm respectivamente. Sin embargo en la cromatografía realizada con 80 g de parásitos la cantidad de proteína excluida rebasó los valores de 3.0 nm en varias fracciones. Con respecto a los picos eluidos de las tres gráficas, todos resultaron diferentes. La cantidad de proteínas que se adsorbieron a la resina se incrementó conforme se aumentó la cantidad de parásitos empleada como se muestra tanto por los valores de absorbancia como por el número de picos. Al evaluar por el método de Hummel la presencia del inhibidor de tripsina, tanto en el extracto crudo como en cada una de las fracciones colectadas en las tres cromatografías de Sef-Q no fue posible obtener alguna señal clara que identificara al inhibidor. Sin embargo, si se pudo observar la inhibición de la hidrólisis del sustrato para la tripsina (TAME) en concentrados de las fracciones correspondientes al inicio de la elusión de las proteínas (señalizados en las gráficas con una barra horizontal sobre las fracciones escogidas para concentrarse). Adicionalmente, al cuantificar el porcentaje de inhibición de cada concentrado proteico se obtuvieron valores moderadamente bajos.

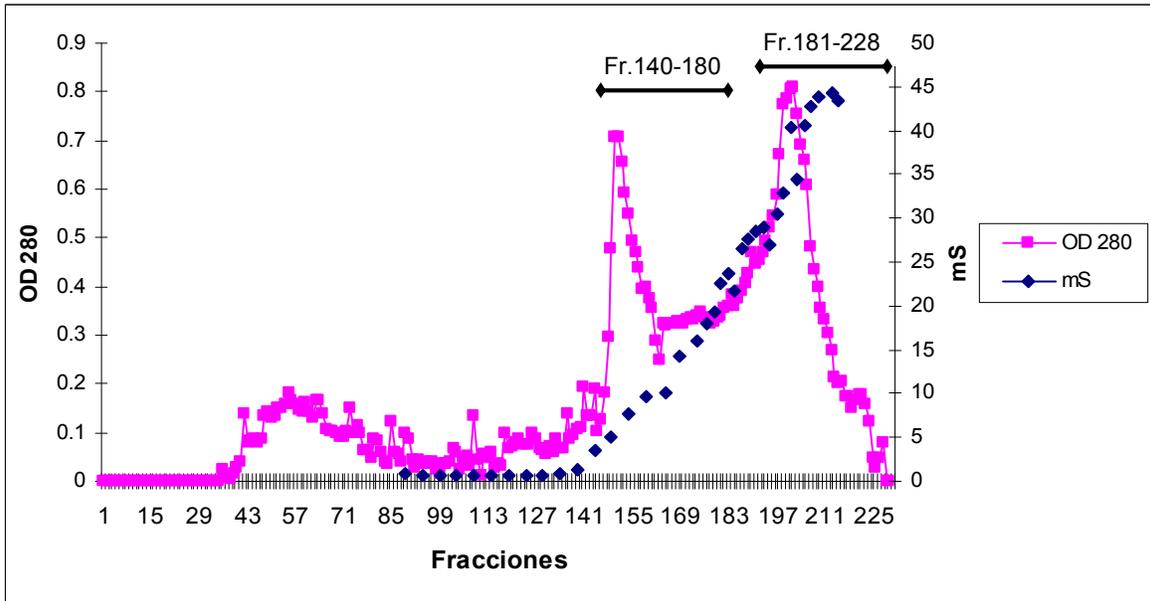


Fig. 8 Gráfica de la absorbancia a 280 nm (cuadros), conductancia (rombos) versus el número de la fracción de la primera cromatografía de Sefarosa-Q del extracto crudo (Sn1) de cisticercos de *T. solium*

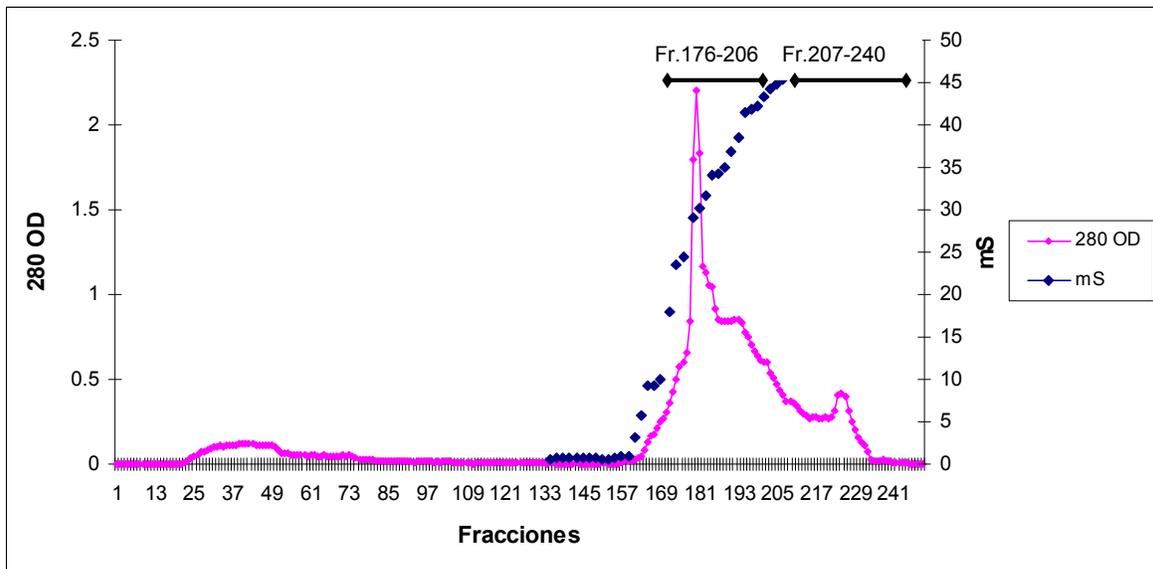


Fig. 9 Gráfica de la absorbancia a 280 nm (cuadros), conductancia (rombos) versus el número de la fracción de la segunda cromatografía de Sefarosa-Q del extracto crudo (Sn1) de cisticercos de *T. solium*.

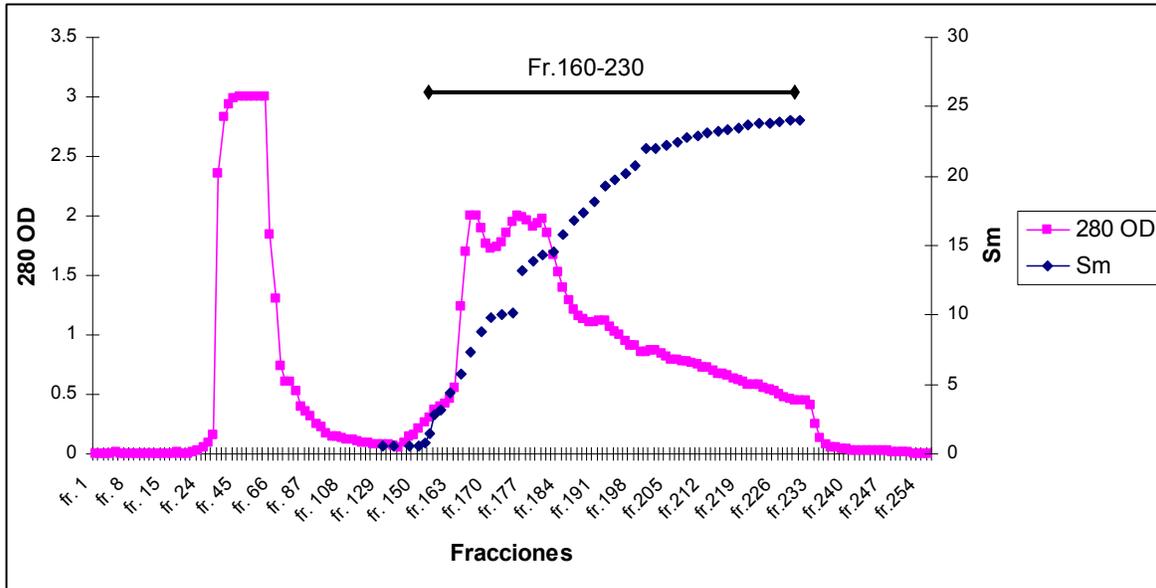


Fig. 10 Gráfica de la absorbancia a 280 nm (cuadros), conductancia (rombos) versus el número de la fracción, de la tercera cromatografía de Sefarosa-Q del extracto crudo (Sn1) de cisticercos de *T. solium*.

Cromatografías de afinidad Sefarosa-Con A

Las figuras 11-16 muestran los valores de absorbancia a 280 nm en las fracciones excluidas. Estos valores mostraron que ninguna de las columnas llegó a saturarse de proteína. También se observa que la concentración de proteína que logró adsorberse a la resina fue muy poca, como se aprecia en los picos eluidos obtenidos después de adicionar α metil-manosido a la columna. En general, el comportamiento de los perfiles cromatográficos de las figuras 11-16 resultaron muy parecidos.

Al evaluar por el método de Hummel la presencia del inhibidor de tripsina, en cada una de las fracciones colectadas en las seis cromatografías de Sef-Con A. Sin embargo, así como en las cromatografías de intercambio iónico, se pudo observar la inhibición de la hidrólisis del sustrato para la tripsina (TAME) en concentrados de las fracciones. En este caso a diferencia de Sef-Q el efecto inhibitorio se observó en las fracciones proteicas excluidas de las columnas (señalizadas en las gráficas con una barra horizontal sobre las fracciones escogidas para concentrarse). De manera similar que en Sef-Q, al cuantificar el por ciento de

inhibición de cada concentrado proteico se obtuvieron valores moderadamente bajos.

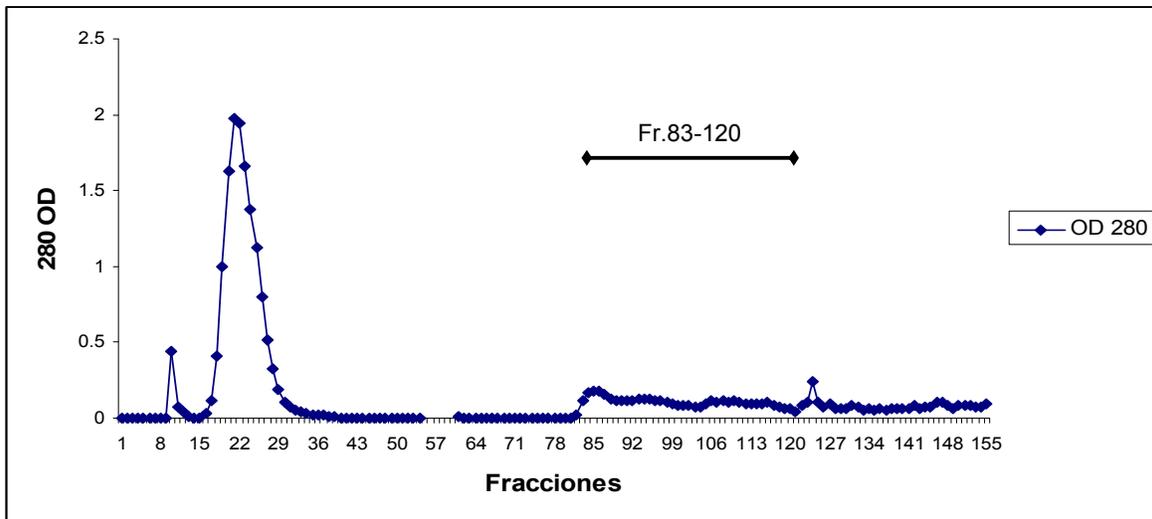


Fig. 11. Gráfica de la absorbancia a 280 nm versus el número de la fracción, de la cromatografía en Sefarosa Con-A de la fracción 140-180 proveniente de la primera cromatografía de Sefarosa-Q.

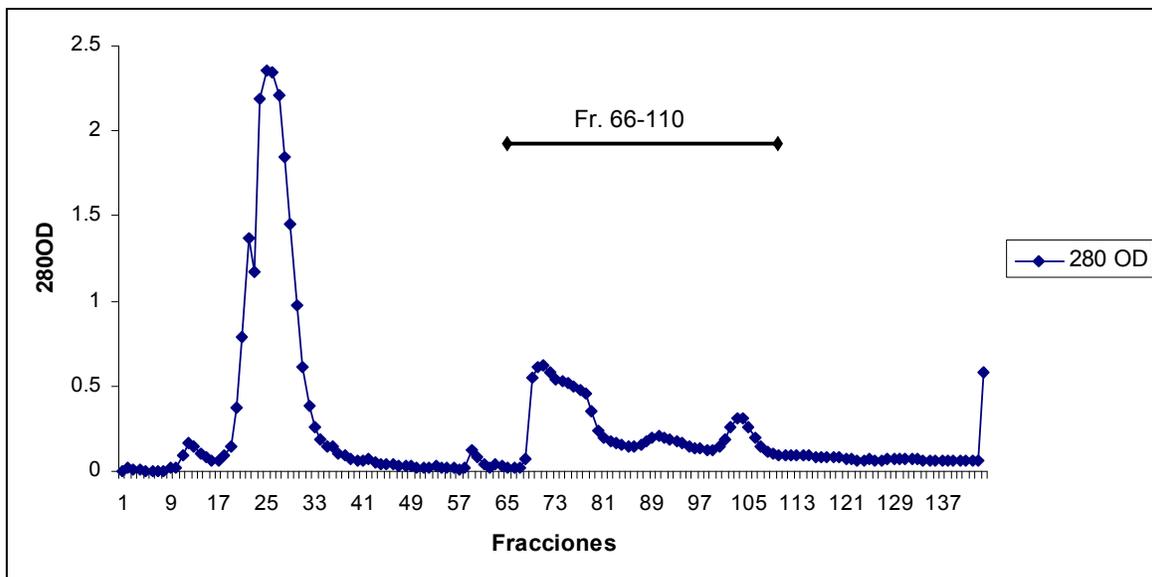


Fig. 12. Gráfica de la absorbancia a 280 nm versus el número de la fracción, de la cromatografía en Sefarosa Con-A de la fracción 181-228 de la primera cromatografía de Sefarosa-Q.

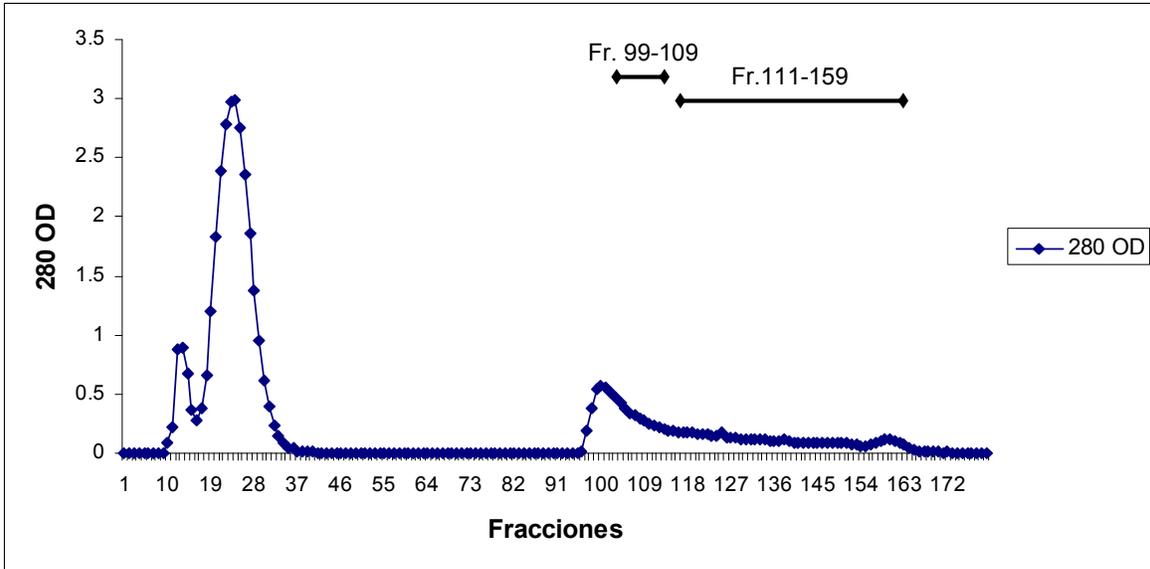


Fig. 13. Gráfica de la absorbancia a 280 nm versus el número de la fracción, de la cromatografía en Sefarosa Con-A de la fracción 176-206 de la segunda cromatografía de Sefarosa-Q.

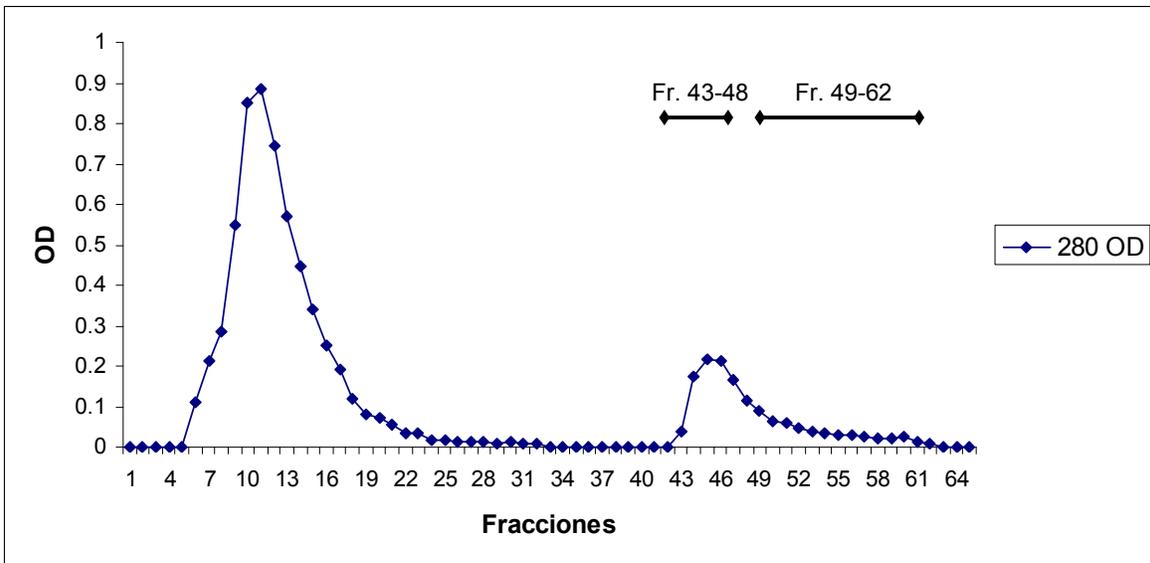


Fig. 14. Gráfica de la absorbancia a 280 nm versus el número de la fracción, de la cromatografía en Sefarosa Con-A de la fracción 207-240 de la segunda cromatografía de Sefarosa-Q.

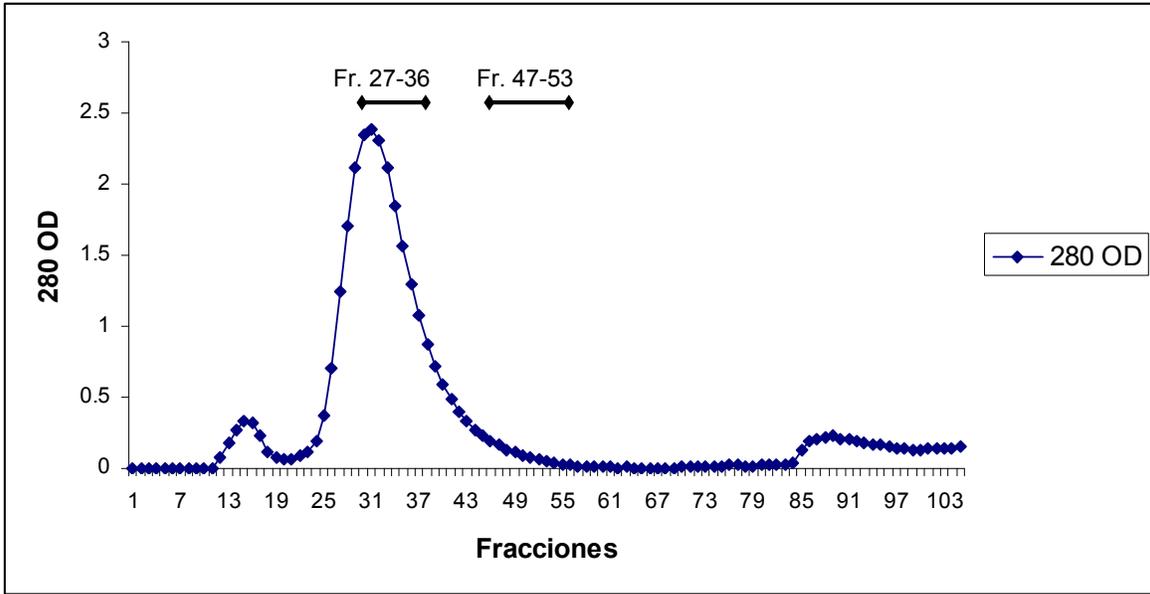


Fig. 15. Gráfica de la absorbancia a 280 nm versus el número de la fracción, de la cromatografía en Sefarosa Con-A de la fracción 160-230 de la tercera cromatografía de Sefarosa-Q.

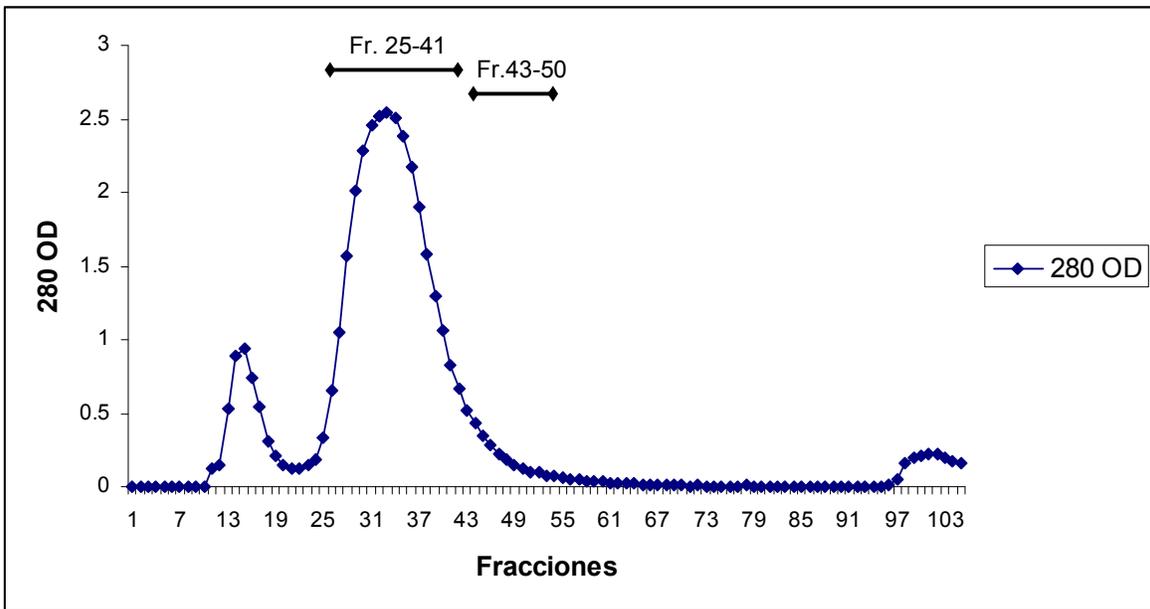


Fig. 16. Gráfica de la absorbancia a 280 nm versus el número de la fracción, de la cromatografía en Sefarosa Con-A de la fracción 160-230 de la tercera cromatografía de Sefarosa-Q.

El análisis por geles de acrilamida PAGE-SDS reductores al 12% de los concentrados con y sin efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la tripsina de la cromatografía de Sef-Q se muestra en las Fig. 17. La imagen del extracto crudo, presenta un gran número de bandas de proteínas con pesos moleculares por encima de 180 kDa hasta 10 kDa. Fig. 17 (A). En el carril (B), se aprecian las proteínas pertenecientes al concentrado de las fracciones 31-96, en este carril, el número de bandas no es excesivamente grande y se distribuyen entre los 45-10 kDa. En el carril (C) se muestra el concentrado de las fracciones 140-180, correspondiente al inicio de la elusión de las proteínas de la columna Sef-Q, por el efecto del gradiente salino. También se observa el trabajo de la resina para concentrar a diversas bandas proteicas cuando las comparamos con el extracto crudo, mismas que se distribuyen entre los pesos moleculares de 180-10 kDa. En el carril (C) observamos las proteínas correspondientes a la parte terminal del eluído, con un número reducido de bandas y algunas de ellas concentradas en comparación con el homogenizado total.

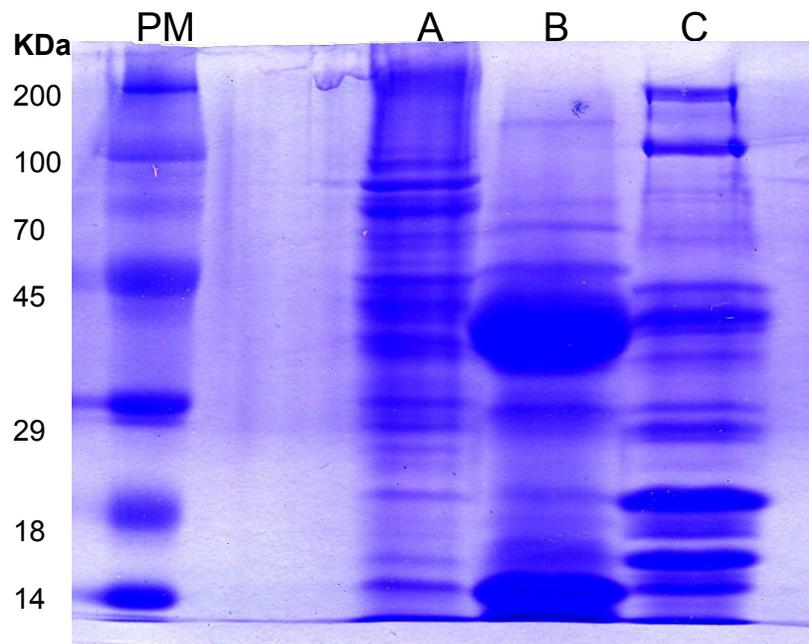


Fig. 17 Análisis en PAGE al 12 % SDS de PM) proteínas controles de pesos moleculares. A) extracto crudo de cisticercos de *T. solium*, B) fracción 31-96 obtenida de Sef-Q, C) fracción 140-180 obtenida de Sef-Q.

En la Fig. 18 se muestra el análisis por geles de PAGE-SDS reductores al 12 % de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad de Sef- Con A. En la columna (A) se observa a las fracciones excluidas 43-50 concentradas de esta resina que es algo similar a la correspondiente al inicio de la elusión en la cromatografía de Sef-Q. En el carril (B) se indica a la fracción 43-50 eluída de Sefarosa Con A la cual presenta solamente 5 bandas con pesos moleculares muy diferentes entre si. El efecto inhibitorio hacia la actividad enzimática de la tripsina se observó en la fracción excluida 43-50.

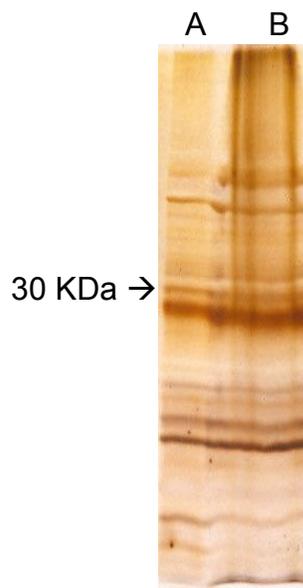


Fig. 18 Análisis en PAGE al 12% SDS de la fracción 43-50 obtenida de la cromatografía de Sefarosa Con-A. A) 30 µg, B) 60 µg.

6.3 ENSAYOS EN SOLUCIÓN DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA.

En la tabla 2 se muestra el resultado de un ensayo enzimático de tripsina en solución realizado con reactivos comerciales. Los valores de absorbancia a 247 nm tanto de la actividad enzimática de la tripsina pancreática de cerdo, en ausencia (◇) y en presencia del inhibidor de tripsina de huevo de pavo (■) desarrollados durante 3 minutos. Los datos de la tabla anterior fueron graficados como el cambio de absorbancia en función del tiempo (Fig. 19). La diferencia en los valores de las pendientes nos indica el efecto inhibitorio del inhibidor de

tripsina. Por ejemplo, a los 3 min de desarrollada la reacción enzimática, al restar el valor de la absorbancia de la reacción sin inhibidor (0.304 nm) de la que contenía el inhibidor (0.119 nm) se obtuvo una diferencia de 0.185 nm. Esta diferencia es equivalente al 39 % de inhibición de la actividad enzimática de la tripsina.

Tabla 2. Control de la actividad enzimática de Tripsina de páncreas de cerdo en ausencia y presencia del Inhibidor de tripsina de huevo de pavo.

Segundos	Tripsina ◊ absorbancia 247 nm	Trip.+Inh. Trip■ absorbancia 247 nm
15	0.023	0
30	0.038	0
45	0.064	0
60	0.088	0
75	0.115	0.008
90	0.141	0.024
105	0.168	0.04
120	0.196	0.055
135	0.226	0.07
150	0.253	0.087
165	0.277	0.104
180	0.304	0.119

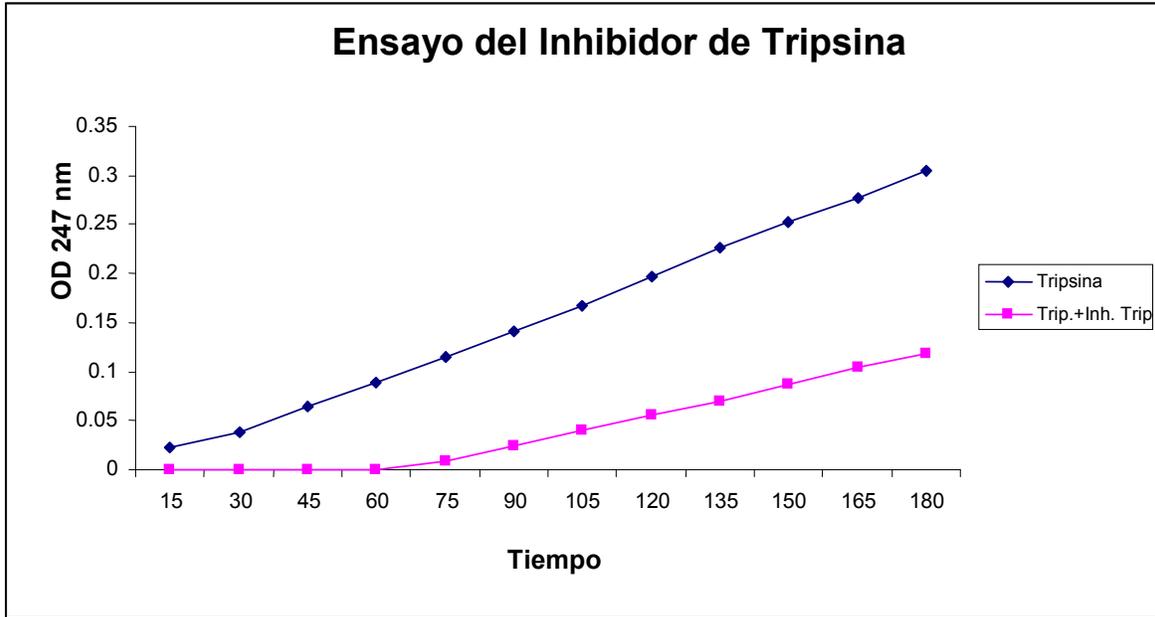


Fig. 19 Gráfica de la tabla 2, actividad enzimática de la Tripsina (◆), actividad enzimática de la Tripsina en presencia del inhibidor de tripsina (■).

En la tabla 3 se muestran los valores de absorbancia a 247 nm y el porcentaje de inhibición de diferentes fracciones proteicas parasitarias obtenidas en el proceso de purificación.

Tabla 3 Inhibición de las diferentes fracciones de las cromatografías Sefarosa-Q y Con-A

Muestra	Λ 247 nm	% inhibición
Sin inhibidor	0.241	0
Extracto crudo	0.218	2.6
Fr. 140-180 Sef-Q	0.137	7.15
Fr. 43-50 Sef-Con A	0.12	9.8

6.4 ELISAs

Las figuras 20 y 21 muestra los valores de absorbancia a 490 nm de las reacciones inmunes entre la tripsina comercial (Sigma), frente a los anticuerpos de conejo específicos contra tripsina.

Las figuras 22 y 23 muestra los valores de absorbancia a 490 nm de las reacciones inmunes entre la fr 169-175 obtenida de la cromatografía de Sef-Q y la fracción 24-110 obtenida de la cromatografía de Sef-Con A frente a los anticuerpos de conejo específicos contra tripsina.

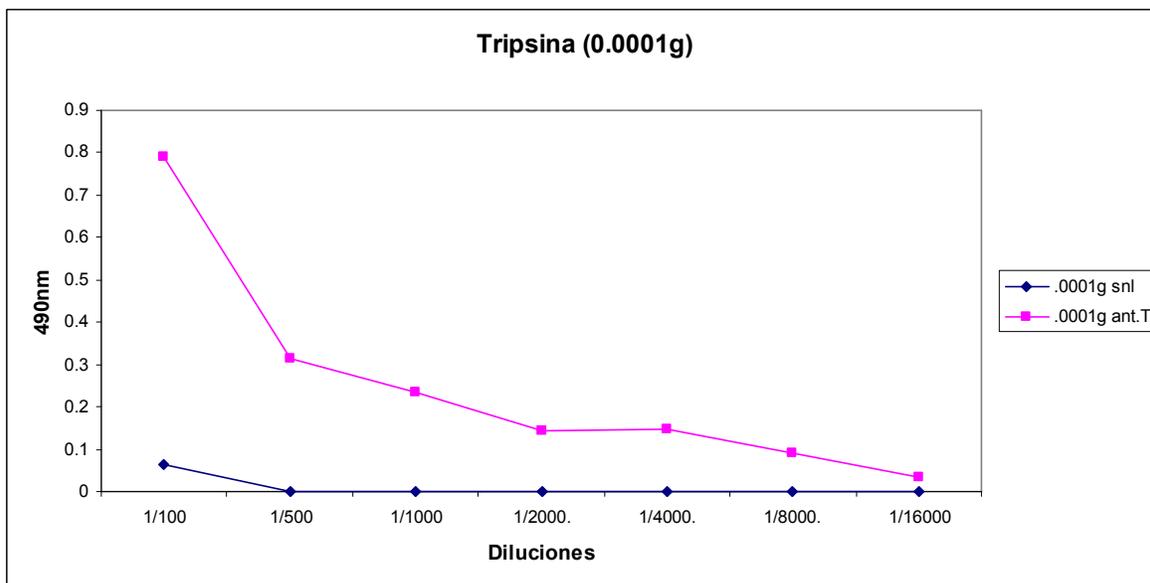


Fig. 20. Gráfica de la unión de los anticuerpos de conejo α tripsina de páncreas de cerdo a diferentes diluciones, frente a 0.1 μ g / pozo de su antígeno homólogo (■). Suero preinmune de conejo bajo las mismas condiciones experimentales que el suero inmune (◆).

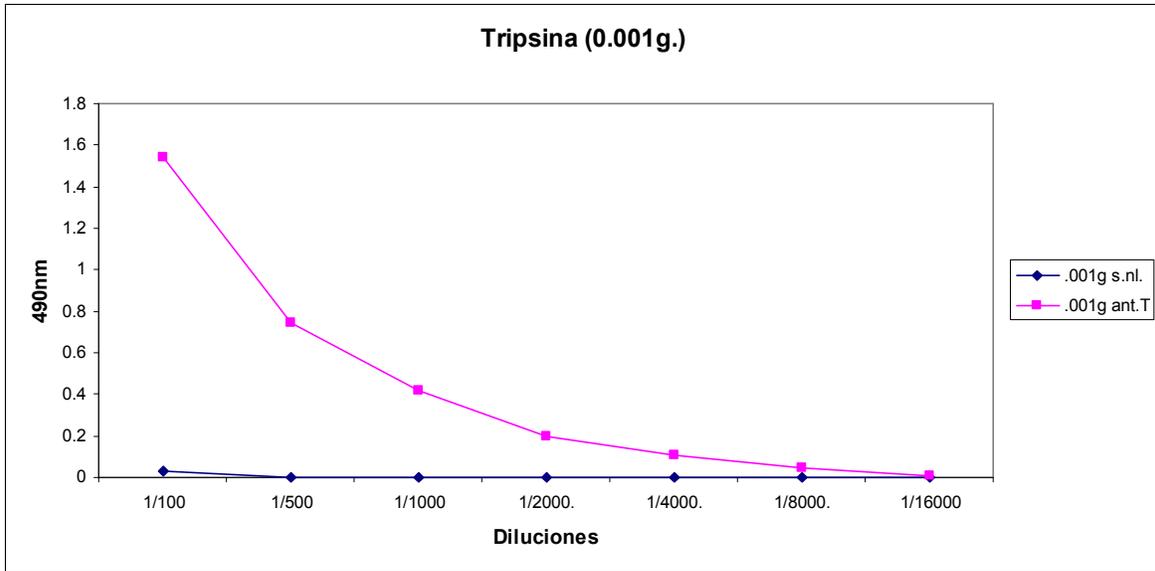


Fig. 21. Gráfica de la unión de los anticuerpos de conejo α tripsina de páncreas de cerdo a diferentes diluciones, frente a $1.0 \mu\text{g}$ / pozo de su antígeno homólogo (■). Suero preinmune de conejo bajo las mismas condiciones experimentales que el suero inmune (◆).

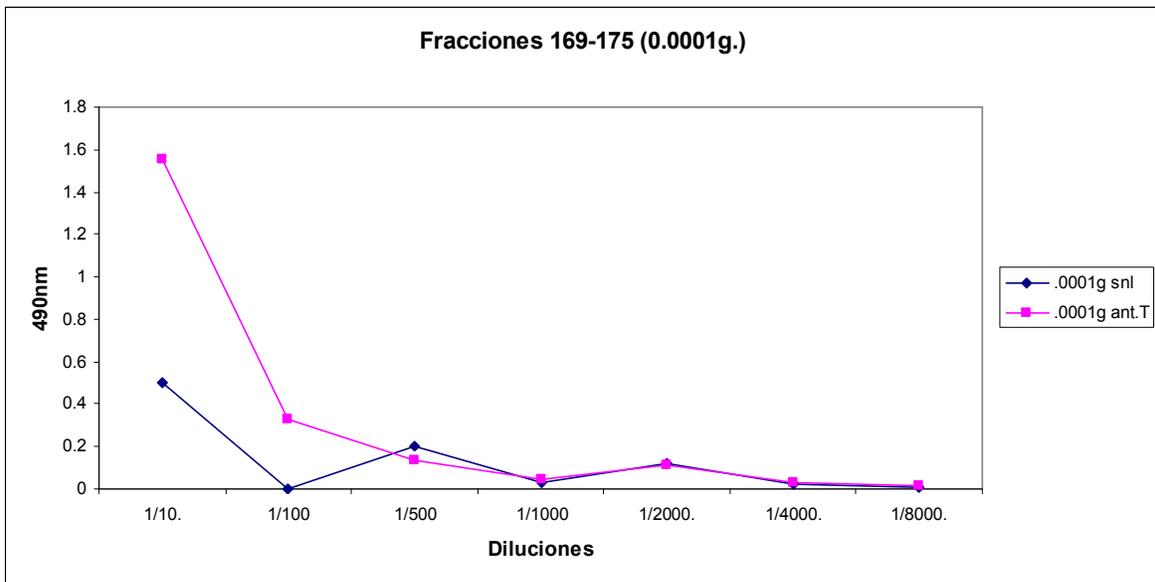


Fig. 22. Gráfica de la unión de los anticuerpos de conejo α tripsina de páncreas de cerdo a diferentes diluciones, frente a $0.1 \mu\text{g}$ / pozo de la fracción 169-175 de cisticercos de *T. solium* obtenida en Sef-Q (■). Suero preinmune de conejo bajo las mismas condiciones experimentales que el suero inmune (◆).

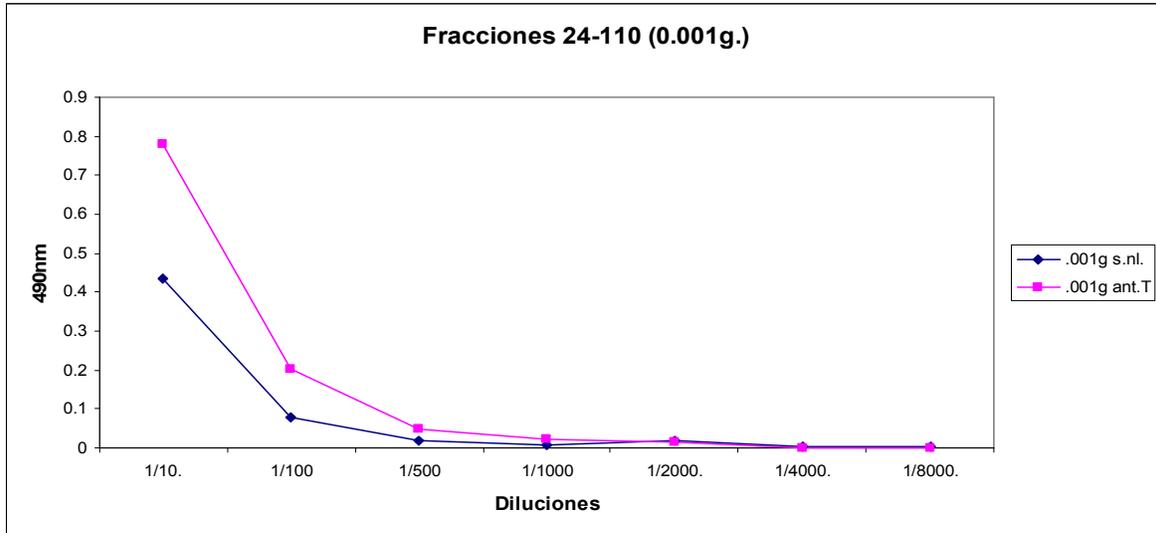


Fig. 23. Gráfica de la unión de los anticuerpos de conejo α tripsina de páncreas de cerdo a diferentes diluciones, frente a 1.0 μg / pozo de la fracción 24-110 de cisticercos de *T. solium* obtenida en Sef-Con A (■). Suero preinmune de conejo bajo las mismas condiciones experimentales que el suero inmune (◆).

6.5 FRACCIÓN 140-180 EN INMUNOBLOTS DE UNA DIMENSIÓN

En la Fig. 24 se muestra, por inmunoelectrotransferencia, la reacción positiva entre 50 ng / mm de la fr 140-180 parasitaria obtenida de la cromatografía de Sef-Q que se transfirió a la NC y los anticuerpos de conejo contra el inhibidor de tripsina tipo II de huevo de pavo (B). También se aprecia, que la reacción fue con una sola banda de proteína de aproximadamente 30 kDa, no obstante que en la fr 140-180 existen mas de 20 bandas proteicas. La especificidad de la reacción se estableció al mostrar que el suero preinmune del mismo conejo no interaccionó con la muestra del parásito (A). Las columnas (D, F, H), al igual que los resultados de ELISA, indican la reacción positiva entre los anticuerpos de conejo contra el inhibidor de tripsina y su antígeno homólogo a diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 respectivamente. En las columnas (C, E, G) se muestran los resultados negativos del suero preinmune del conejo a las diluciones antes mencionadas. También podemos distinguir en las tiras de NC positivas que el inhibidor de tripsina de vertebrados presenta un peso molecular de aproximadamente 17 kDa.

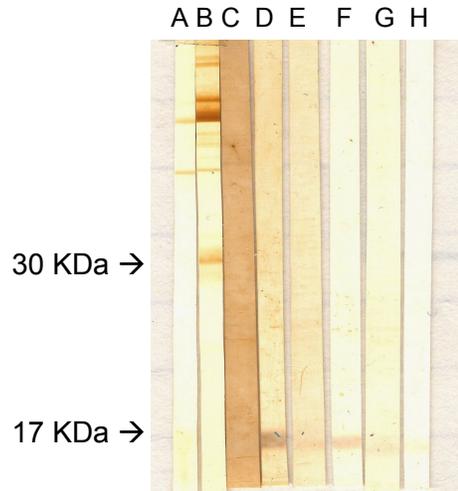


Fig. 24. Inmunoelectrotransferencia que muestra la reacción inmune cruzada entre la fracción 140-180 obtenida en Sef-Q (A, B) y el Inhibidor de tripsina de huevo de pavo (D-H). Sueros preinmunes (A, C, E, H).

En la Fig 25 se muestra, por inmunoelectrotransferencia, la reacción positiva entre la fr 45-50 parasitaria obtenida de la cromatografía de Sef-Con A que se transfirió a la NC y los anticuerpos de conejo contra el inhibidor de tripsina (B). Al igual que con la fracción parasitaria obtenida de Sef-Q, la positividad de la reacción inmune fue con una sola banda de aproximadamente 30 kDa.



Fig. 25. Inmunoelectrotransferencia que muestra la reacción inmune cruzada entre la fracción 43-50 Sef-Con A (A, B) y los anticuerpos de conejo α -Inhibidor de tripsina de huevo de pavo (B), suero de conejo preinmune (A).

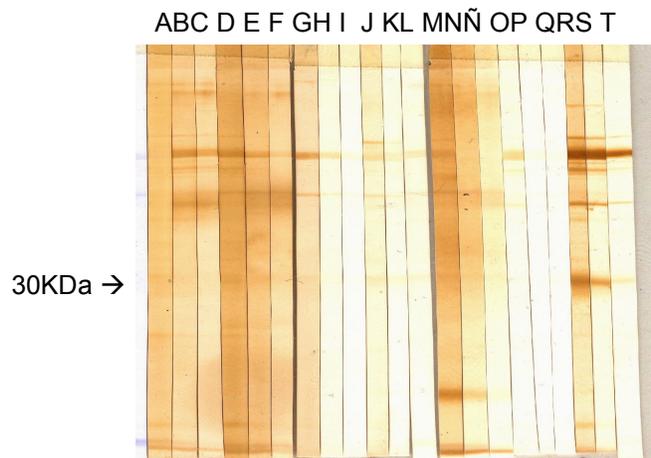


Fig. 26. Inmunoelectrotransferencia de la fracción 45-50 del parásito obtenida de la cromatografía de Sef-Con A (A-T) revelada con: suero normal de cerdo (A-C), suero de cerdo con cisticercosis (D-F), suero normal de humano (G-I), suero de humano con cisticercosis (J-L), suero normal de rata (M-Ñ), suero normal de conejo (O-Q), suero de conejo α -Inhibidor de tripsina de huevo de pavo (R-T). Cada suero se diluyó 1:10, 1:100, 1:1000. Los resultados muestran la ausencia de reacción entre los sueros normales y de cerdos e individuos con cisticercosis con la banda de 30 kDa, contrastando con los de conejo α -Inhibidor de tripsina de huevo de pavo, empleado como control positivo.

6.6 FRACCIÓN 45-50 Y 140-180 EN DOBLE DIMENSIÓN

La fig. 27 muestra, por tinción con Commassie, diferentes manchas de proteínas de la fr 45-50 parasitaria obtenida de la cromatografía de Sef-Q y separadas tanto por su punto isoeléctrico como por su peso molecular y transferidas a una hoja de PVDF. Existen en esta muestra, proteínas con puntos isoeléctricos (pIs) desde 3.5 hasta 8.0 y pesos moleculares desde 185 kDa hasta 20 kDa.

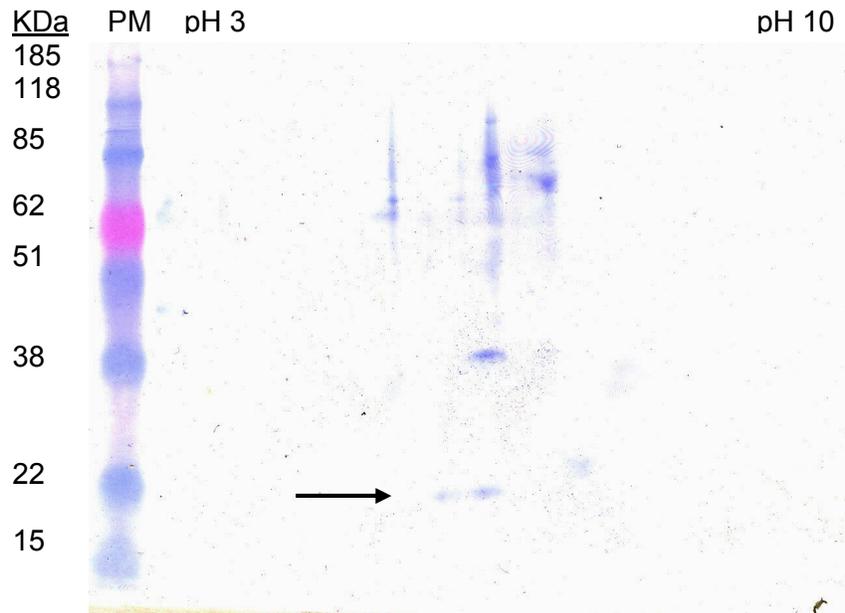


Fig. 27. Análisis en gel de doble dimensión de la fracción 45-50 obtenida de la cromatografía de Sef-Con A. La flecha indica las manchas proteicas de ~20 kDa que fueron positivas a los anticuerpos de conejo α -Inhibidor de tripsina de huevo de pavo, compatibles con el peso molecular para este inhibidor (Fig. 28). Tinción con azul de Commassie.

La Fig. 28 es una doble dimensión similar a la anterior pero con cien veces menos proteína debido a que se reveló con anticuerpos en lugar de Commassie. En esta hoja de PVDF se distingue la reacción inmune positiva entre los anticuerpos de conejo contra el inhibidor de tripsina y seis proteínas de la fr 140-180 parasitaria obtenida de la cromatografía de Sef-Q. Dos de éstas con pesos moleculares de ~30 kDa y pls de 6.4 y 6.8; otras dos de pl 7.5 y pesos moleculares de ~70 y 65 kDa, y dos mas de pl 8.0 y pesos moleculares de ~70 y 65 kDa.

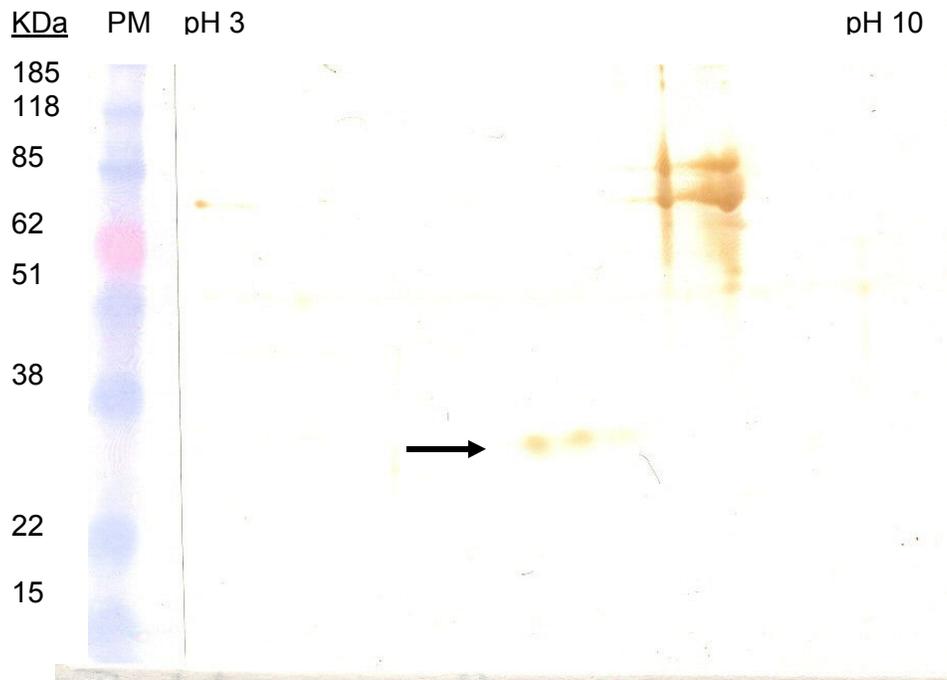


Fig. 28. Análisis en gel de doble dimensión de la fracción 45-50 obtenida de la cromatografía de Sef-Con A y revelada con anticuerpos de conejo α -Inhibidor de tripsina de huevo de pavo. La flecha indica las manchas proteicas de ~20 kDa compatible con el peso molecular para este inhibidor.

6.7 ENSAYOS EN SOLUCIÓN PARA TRIPSINA.

Con el interés de buscar también la actividad enzimática de tripsina en las fracciones parasitarias, se evaluaron diversas muestras de los cisticercos obtenidas tanto de las cromatografías iónicas como de afinidad. Los datos que obtuvimos de la fr 169-175 obtenida de la cromatografía de Sef-Q y la fr 27-34 proveniente de la cromatografía de Sef-Con A tuvieron un efecto amplificador, en lugar de inhibitorio, para hidrolizar al sustrato (TAME) de la tripsina por el método de Hummel. La Fig. 29 representan la gráfica del cambio de absorbancia a 247 nm frente al tiempo de los valores de la tabla.

En la fig. 29 muestra los valores de absorbancia a 247 nm de tripsina de páncreas de cerdo y la fracción 169-175 obtenida de la cromatografía de Sef.-Q y de los valores inespecíficos del sustrato TAME.

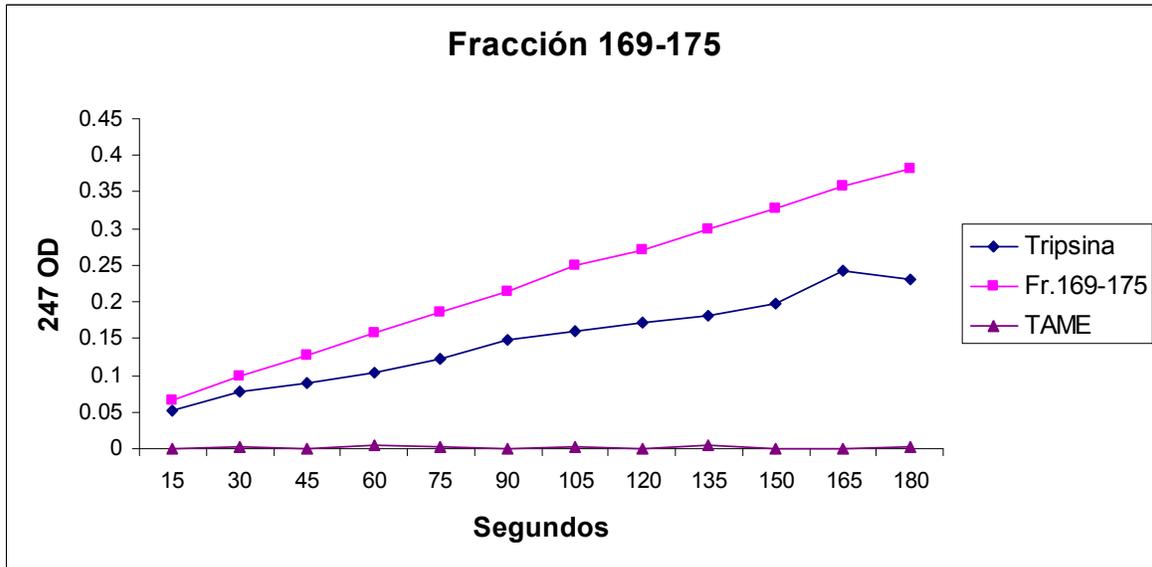


Fig. 29. Gráfica de la tabla 13 actividad enzimática de la Tripsina y valor de su pendiente = 0.0011 (◆), actividad enzimática de la fracción 169-175 y valor de su pendiente = 0.0019 (■) fondo del TAME (▲). La diferencia entre las pendientes es de 1.72 veces.

6.8 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA EN BÚSQUEDA DE TRIPSINA DEL PARÁSITO.

La Figura 30 muestra, la interacción de los anticuerpos de conejo anti extracto crudo de cisticercos con la tripsina pancreática porcina adsorbida por electrotransferencia a NC. Este suero, como el suero de conejo anti tripsina pancreática porcina (control positivo de la reacción) reaccionaron exclusivamente con una sola banda de ~20 kDa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de ELISA previamente descritos.

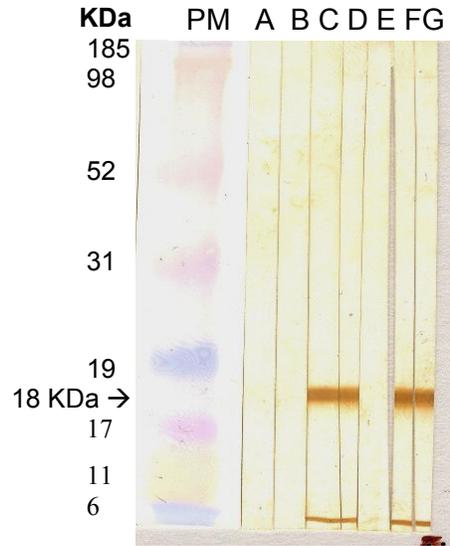


Fig. 30. Inmunoelectrotrasferencia que muestra la reacción inmune cruzada entre la tripsina de páncreas de cerdo adsorbida a la membrana (A-G) y los sueros de cuatro diferentes conejos inmunizados cada uno con un extracto crudo de cisticercos de *Taenia solium* (C, D, F, G). Los sueros preinmunes de estos conejos no reconocieron a la tripsina (A, B, E).

7. DISCUSIÓN

Con las cromatografías de intercambio aniónicas Sefarosa Q, empleando el homogenizado inicial del parásito, se fraccionaron tres poblaciones de proteínas, como se demostró por geles de poliacrilamida. Sin embargo, en la población proteica con mayor número de bandas fue donde se encontró la actividad del inhibidor de tripsina. Esta misma población correspondió a proteínas que interaccionaron con la resina, lo cual indica que este inhibidor es aniónico. La actividad inhibitoria hacia la tripsina obtenida en las fracciones 140-180 solo se pudo demostrar si se concentraron estas muestras y no en cada una de ellas. Es decir, la elección de estas fracciones se debió no al haber detectado la actividad inhibitoria en las fracciones individuales, como era de esperarse, sino debido a esto utilizar una opción alternativa. Esta opción consistió en elegir algún (os) pico (s) de la cromatografía, concentrarlos y analizarlos, eligiendo rangos donde se detecto un poco de actividad inhibitoria. En la cromatografía donde se emplearon 20 g de parásitos existió un pico de absorbancia muy agudo al inicio de la elusión, formado por las fracciones 140-180, y flanqueado por otros picos con abundantes proteínas. Al analizar esta fracción se encontró un porcentaje de actividad inhibitoria hacia la tripsina. De manera similar, en las otras dos cromatografías de intercambio aniónico se demostró actividad inhibitoria hacia la tripsina en fracciones concentradas de regiones cromatográficas similares a la primera cromatografía.

Los resultados de las cromatografías de afinidad de Sefarosa-Con A de las fracciones 140-180 o similares provenientes de las cromatografías aniónicas, mostraron también que solo concentrando las fracciones obtenidas en este siguiente paso de purificación se detectó actividad inhibitoria hacia la tripsina. Así, en las fracciones 45-53, correspondientes a la región de descenso del primer pico obtenido en Sefarosa-Con A se encontró un porcentaje de inhibición hacia la tripsina. En las otras cinco cromatografías de afinidad por la Con A desarrolladas con muestras parasitarias con actividad inhibitoria hacia la tripsina, provenientes de las cromatografías de intercambio aniónico mostraron la actividad inhibitoria en

un bajo porcentaje. Este bajo efecto inhibitorio fue constantemente encontrado en la misma región cromatográfica de las columnas de Sefarosa Con A. El tener una baja actividad inhibitoria hacia la tripsina en estas fracciones, podría deberse a que realmente existiese este inhibidor pero en muy bajas concentraciones o a que por estar mezclado con muchas otras proteínas, inclusive en la cromatografía de afinidad, su actividad se ocultara.

Debido a esta limitada señal inhibitoria hacia la tripsina de las proteínas parasitarias, demostrada en estas fracciones cromatográficas, se decidió apoyar esta observación empleando anticuerpos específicos contra un inhibidor de tripsina de vertebrados.

En las fracciones 140-180 obtenidas en Sefarosa Q y en las 45-53 de Sefarosa Con A se encontró una banda de ~20 kDa que reaccionó con anticuerpos de conejo inmunizado con inhibidor de tripsina de huevo de pavo. La especificidad de esta reacción sugiere que en los cisticercos de *T. solium* existe el inhibidor de tripsina y/o proteínas con determinantes antigénicos similares a los presentes en el inhibidor de tripsina del vertebrado. Sin embargo, el peso molecular de ~30 kDa no es el que comúnmente se ha encontrado en los inhibidores de tripsina publicados. El hecho de que sea mayor este dato para la proteína del parásito podría explicarse, por un lado, a que es una proteína que cruza inmunológicamente con el inhibidor o a que sea realmente un inhibidor con ese peso molecular y una tercera posibilidad a que sea un inhibidor que este conjugado a otra proteína y que en conjunto pesen ~30 kDa.

Con la finalidad de caracterizar un poco mas y verificar si la proteína de ~30 kDa parasitaria estuviera asociada a otra proteína, la fracción 45-53 de Sefarosa Con A se resolvió en un sistema de doble dimensión. Los resultados mostraron que los anticuerpos anti inhibidor de tripsina reconocieron a siete diversas proteínas con diferente intensidad. Dos de ellas con pesos moleculares de ~20 kDa pero ambas con un pI de 5.0 y las otras restantes todas con pI de 7.0 pero pesos moleculares entre 40-60 kDa. Sin embargo, la misma fracción 45-53 en doble dimensión, pero visualizada con Commassie claramente muestra que solo hay una proteína de ~20 kDa. Esta proteína sería la más probable a ser el inhibidor de tripsina porque

reúne el mayor número de evidencias encontradas en la literatura. Pero la presencia de otras macromoléculas en la misma muestra que se visualizaron con los anticuerpos específicos recomienda una caracterización mas amplia de la proteína de ~20 kDa.

Con respecto a la presencia de tripsina en los tejidos de los cisticercos se obtuvieron dos evidencias que sugieren este hecho. Una es por medio de los ensayos en solución de la actividad enzimática de la tripsina sobre el sustrato TAME, en diversas fracciones parasitarias y la otra por las reacciones cruzadas inmunológicas de las mismas fracciones parasitarias antes mencionadas, con anticuerpos contra la tripsina de vertebrados. Los resultados obtenidos con la fracción 27-34 obtenida de Sefarosa Con A, la cual reaccionó positivamente frente a los anticuerpos de conejo inmunizado con tripsina de vertebrados

Adicionalmente a esta observación, se demostró también que ocho diferentes sueros de conejos inmunizados, cada uno de ellos con diferentes lotes de extractos crudos de cisticercos de *T. solium*, reaccionaron en forma cruzada tanto por ELISA en pozo como por inmunoelectrotransferencia frente a tripsina pancreática de cerdo.

El hecho de encontrar a un inhibidor de tripsina en *T. solium* correlacionaría con la presencia de una proteína similar en *Taenia pisiformis* (Németh, 1980) y la Teniastatina en *Taenia taeniformis* (Suquet, 1986).

La actividad biológica de este tipo de inhibidores ha sido ampliamente caracterizada. El inhibidor de tripsina llamado Teniastatina, de *T. taeniformis* inhibe la proliferación de los linfocitos de ratón activados con fitohemaglutinina, concanavalina A, podwik, lipopolisacáridos y ovoalbúmina. Todos estos son activadores policlonales tanto para linfocitos T como B. También se sabe que esta inhibición es parcialmente mediada por inhibir a la interleucina 2. Teniastatina es capaz de inhibir a la vía alterna del complemento de manera dosis dependiente, con un efecto pronunciado sobre el factor D. Inhibe además la migración de neutrófilos al actuar sobre el ligando para el C5a (Leid, 1987).

Todas estas observaciones sugieren que la presencia del inhibidor de tripsina en los parásitos tendría un papel preponderante en la regulación de diversos procesos biológicos, particularmente los inmunológicos.

8. CONCLUSIONES

- a) Se obtuvieron evidencias de la presencia de un inhibidor de tripsina y tripsina en algunas fracciones semipurificadas de cisticercos de *T. solium*.
- b) En estas fracciones se pudieron detectar estas proteínas tanto por ensayos enzimáticos como por reacciones con anticuerpos específicos.
- c) El inhibidor de tripsina se encontró en bajas concentraciones en el parásito.
- d) Tanto la tripsina como su inhibidor son aniónicos.
- e) Posiblemente la tripsina como su inhibidor de encuentren dentro de un complejo proteico por lo que se observaron bandas con pesos de entre 20 y 30 KDa.
- f) Es posible que este complejo proteico este formado por la tripsina y su inhibidor.

9. APENDICE

Procesamiento y homogenizado de los cisticercos:

Amortiguador 0.01M Tris-HCl pH 8 + 3M KCl

Cromatografía de intercambio ionico (Sefarosa-Q):

0.01M Tris-HCl pH 8

0.01M Tris-HCl pH 8 + NaCl 0.5M

Cromatografía de Afinidad (Sefarosa Con-A):

0.02 M Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.001 M CaCl₂ , 0.001 M MnCl₂

Cuantificación de proteínas. Metodo de Lowry (1951).

A) Solución de Lowry:

Carbonato de sodio anhidro (Na₂CO₃) 2% en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M.

Tartrato de sodio y potasio 2%.

Sulfato cuprico (CuSO₄•5H₂O) 1%.

B) Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Sigma) + agua destilada en una proporción 1:1 de vol.

Procedimiento:

1. Agregar a cada tubo el volumen de la muestra que se eligió, tanto de la curva patrón como de los experimentales y aforar a 1 ml con Amortiguador de Fosfatos. Incluir un tubo con 1 ml de amortiguador como control o blanco
2. A todos los tubos (curva patrón, experimentales y blanco) se les adiciona 4 ml de la solución de Lowry; agitar.
3. Incubar durante 10 min. a temperatura ambiente.
4. Adicionar a todos los tubos rápidamente 0.4 ml de la solución de Folin y agitar.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.

6. Leer las densidades ópticas de los tubos en el espectrofotómetro a 600 nm, calibrando a cero con el blanco.

Electroforesis (Laemmli, 1970).

Composición de los geles.	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida 30%. Bis Acril. 0.8%	4.1ml	1.25ml
Tris 1.5 M (pH 8)	2.5ml	-----
Tris 0.5M (pH 6.8)	-----	1.5ml
H ₂ O detilada	2.6ml	2.8ml
SDS 10%	0.2ml	0.06ml
Persulfato 10%	0.07ml	0.03ml
Temed	0.008 ml	0.02ml

Mezcla para disolver la muestra

SDS	0.1g
Mercaptoetanol	100µl
EDTA	7.4mg
Glicerol	1ml
Tris HCl 0.05M, pH 6.8 aforar a 10ml	
Bromophenol blue.	

Amortiguador de Corrida a pH 8.5

Tris	2.4g
Glicina	11.52g
SDS 10%	8ml
Aforar a un litro	

Solución para Teñir Geles (Meyer y Lamberts, 1965).

Azul de Commassie R-250 Bio-Rad 1.25g (para un litro).

Metanol al 50%

Ácido acético 10%

Aforar a un litro en agua destilada.

Solución para desteñir geles

Ácido acético 10 % en agua destilada.

Procedimiento.

1. Correr en cámara de electroforesis (Miniprotean II de Bio-Rad) con amortiguador de corrida a 100 volts.
2. Teñir con Azul de Commassie o en plata o transferir a Nitrocelulosa.

Electroinmuno-electrotransferencia (EIT)

Amortiguador de transferencia

Tris 0.025M

Glicina 0.192M

Metanol al 20%

Aforar con agua destilada a un litro y ajustar pH a 8.3

Procedimiento

1. Cortar el papel de nitrocelulosa del tamaño del gel y empaparlo con amortiguador de transferencia.
2. Empapar las fibras y el papel filtro con amortiguador de transferencia.
3. Colocar en el siguiente orden en la cámara de transferencia con amortiguador: Partiendo del lado del electrodo negativo, rejilla de plástico fibra, papel filtro, gel, papel de nitrocelulosa, papel filtro fibra, y la rejilla que se cierra con la rejilla de inicio.
4. Correr por una hora a 100 volts.

Revelado de la electroinmuno-electrotransferencia por medio de anticuerpos

Amortiguador de fosfato de sodio (AFS).

A) Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.01M, Cloruro de Sodio (NaCl) 0.15 M. Aforar con agua destilada a un litro.

B) Fosfato de sodio bibásico ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.01M, Cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M. Aforar con agua destilada a un litro.

Mezclar las soluciones A y B (aproximadamente 5 partes de solución A por 6 partes de colisión B) hasta alcanzar un pH de 7.2

Amortiguador de fosfato de sodio-Tween 0.3%

AFS 1 litro

Tween 20 (Sigma) 3ml

Amortiguador de fosfato de sodio-Tween 0.3%+ Leche descremada al 5%

AFS 1 litro

Tween 20 (Sigma) 3 ml

Leche descremada 5 gr

Anticuerpos de conejo conjugados a peroxidasa (Zymed)

Diluciones de 1:1000 hasta 1:5000

Soluciones Reveladoras (Mezclar al momento de usarse)

Diaminobenzodina (DAB) 1g.

Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3%

Aforar en AFS a 20 ml.

Procedimiento.

1. Cortar el papel de nitrocelulosa en tiras de 0.3 cm aproximadamente y colocar en una placa de canales.

2. Colocar a cada tira AFS-Tween +Leche con las diferentes diluciones de sueros. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
3. Lavar tres veces con AFS-Tween, cada cinco min.
4. Agregar 0.5 ml del conjugado diluido en AFS-Tween. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar tres veces con AFS-Tween cada cinco min.
6. Lavar tres veces con AFS cada cinco min.
7. Adicionar 0.5 ml de la solución reveladora a temperatura ambiente; Una vez que se observa la reacción esta se detiene con agua destilada.
8. Colocar la tiras de nitricelulosa colocar en mica transparenté para su conservación.

Ensayo para detectar el inhibidor de tripsina y tripsina

Soluciones:

- a) Amortiguador 0.046M de Tris-HCl, pH 8.1 mas 0.0115M de CaCl_2
- b) Sustrato TAME disolver 37.9mg em 10ml de H_2O destilada.
- c) HCl 0.001M
- d) Enzima: Tripsina a 1mg/ml en 0.001m de HCl

Procedimiento:

1. Colocar 2.7 ml de amortiguador, 0.2 ml de amortiguador de la muestra.
2. Para el control negativo se adiciona 0.1 ml de Tripsina con inhibidor de tripsina y 0.2 ml de TAME
3. Para el control positivo se adicione 0.1 ml de Tripsina y 0.2 ml de TAME
4. Para la muestra se coloca 2.7 ml de amortiguador, 0.2 ml de amortiguador de la muestra, 0.1 ml de muestra y 0.2 de TAME.

Incubar por 15 min. a temperatura ambiente antes de adicionar el sustrato, al momento de adicionar el sustrato leer en el espectrofotómetro a 247 manómetros.

Tinción en plata para proteínas

1. Solución fijadora (100ml)

Etanol	40ml
Ácido acético	10ml
Agua MQ aforar a	100ml

2. Metano 50%

3. Agua formaldehisada (100ml)

Formaldehído	100µl
Agua MQ	100ml

4. Solución de Tinción (100ml)

Hidróxido de sodio al 5.29%	1ml
Hidróxido de Amonio	1ml
Nitrato de Plata	400mg
Agua MQ aforar	100ml

5. Solución Reveladora

*Stock de citratos	100µl
Formaldehído	25µl
Agua MQ	50ml

*Disolver 2.5g de Citrato de Sodio en 100ml de agua MQ.

6. Solución stop

Metanol	112.5ml
Ácido acético	25ml
Agua MQ aforar	250ml

7. Solución de conservación

Glicerol al 87%	11.5ml
Etanol	75ml
Agua MQ aforar	250ml

Procedimiento.

1. Colocar en un recipiente y agregar 50 ml de solución fijadora.
2. Dejar en agitación lenta por 30 min.
3. Lavar con agua MQ 3 veces cada una de 5 min.
4. Eliminar el agua y agregar metanol al 50 %, agitar lentamente por 30 min.
5. Lavar con agua formaldehizada en agitación por 20 min.
6. Lavar con agua MQ 2 veces cada una de 20 min.
7. Colocar el gen en solución de tinción, agitar lentamente de 15 a 20 minutos
8. Lavar con agua MQ 3 veces y todos rápidos.
9. Lavar con agua MQ por 15 minutos.
10. Eliminar el agua y agregar la solución reveladora hasta obtener el bandeo deseado.
11. Eliminar la solución y agregar la solución stop, agitando por 5 minutos.
12. Eliminar la solución y agregar la solución de conservación.

Electroforesis en PAGE en 2 Dimensiones.

Primera Dimensión:

1. Acrilamida 30%, Bis acrilamida 5.4%
2. Triton X-100 10%
3. Amortiguador para la muestra

8M urea

2% de tritonX-100

5% mercaptoetanol

1.6% anfolitos 5/7

0.4% anfolitos 3/10

Diluir en 1ml de agua MQ; No calentar a mas de 30°C, hacer alícuotas de 0.1ml y congelar a -70°C

4. Amortiguador para cubrir la muestra.

4M urea

0.8% anfolitos 5/7

0.2% anfolitos 3/10

0.005 ml de azul de bromo fenol al 0.05%

Aforar con agua MQ a 1ml, no calentar a más de 30°C, hacer alícuotas de 0.1ml y congelar a -70°C.

5. Amortiguador de la cámara superior 0.1M NaOH, desgasificado por 30 min.

6. Amortiguador de la cámara inferior 0.01M H₃PO₄, desgasificado por 30 min.

Procedimiento.

Preparación del gel en tubos capilares.

8M urea 1.1g

4% archilamida

2% Triton X-100

1.6% de anfolitos 5/7

0.4% de anfolitos 3/10

0.3 de Agua MQ

0.01% de persulfato de amonio al 10 %

0.1% de TEMED

Aforar a 2ml con agua MQ.

Precorrido de la cámara

1. Se coloca la cámara con los tubos capilares, amortiguadores superior e inferior y se corre sin muestras a 200 vlts. por 10 min, 300 vlts. por 15 min, 400 vlts. por 15 min.
2. Se colocan las muestras con el amortiguador para cubrir la muestra
3. Se corre a 500 volts por 10min, y a 750 volts por 3.5 horas.

Segunda Dimensión

El procedimiento es el mismo que se usa para la Electroforesis (Laemmli, 1970), lo único que se adiciona la mezcla para diluir proteínas es el 1% de azarosa para fijar el gel del tubo capilar al gel de la electroforesis.

10. BIBLIOGRAFÍA:

Abdussalam M. 1975. El problema de la Teniasis – Cisticercosis. VII Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. Organización Panamericana de la salud. Publicación científica No. 295. 117-129.

Abul K, Andrew H. Jordan S. 1995. Inmunología Celular y Molecular ED. Interamericana- McGraw- Hill. 517pp.

Acha P.N. Szyfres, B. 2004. Teniasis y cisticercosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. 3° Ed. . Publicación científica No. 503. 763-774

Alarcón T. 1999. “Cisticercosis del Sistema Nervioso” Ed. Abad Cía. Ltda.

Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, OLaclette JP, Larralde C, Madrazo I, Velázquez V y Willms K. Cisticercosis. 1987. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. México. Fondo de cultura Economica.

Arriaga C, Nogales-Gaete 1997. Neurocisticercosis. Aspectos epidemiológicos, patológicos, inmunológicos, clínicos, imagenológicos y terapéuticos. Santiago-Chile: Arrynog Ediciones 333pp.

Barry M, Kaldjian L. 1993 Neurocisticercosis. Semi Neurol. 13 2.

Berman JD, Beaver PC, Cheeve AW, Quindlen EA. 1981. Cysticercus of 60-milliliter volume in human brain. AM J. Trop. Med. Hyg. 30:616-619.

Birk, Y. 1976. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from Groundnuts (*Arachis hipogaea*) in: Metod Enzymol 45:716-718

Burnete Wn 1981. "Western blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal Biochem.* 112: 195-203.

Carpio A. 2002. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect Dis.* 2:751-62.

Cordero del Campillo 1990. *Parasitología y Enfermedades parasitarias de animales domésticos.* Ed Limusa. México.

Cheng T 1986. *General Parasitology.* Harcourt Brace Haranovich. Publishers. New York.

Dixon H. B. F y Lipscomb F. M. 1961. Cysticercosis an analysis and follow up 450 cases. *Privy Council Med. Res Especial Report Ser.* 229: 1-58.

Delves PJ y Roitt IM 2000 The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343(1):37-49.

Delves PJ and Roitt IM 2000 The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 343(2):108-117.

Engvall E, Perlmann P 1972 Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109: 129-135.

Evans C, Garcia HH, Gilman RH, Friedland. 1997. Controversies in the Management of Cysticercosis. *Emerg Infect Dis* ;3:403-405.

Escobar, A. 1983. The pathology of neurocysticercosis. Cysticercosis of the Central Nervous System. (Editores) Palacios E, Rodríguez Carbajal M D. y Taveras J M. Charles C Thomas Publisher. U.S.A. 27 – 54 pp.

Fisser A. 1986. Cisticercosis Humana. Epidemiologia, diagnostico e inmunología. Rev UIS Medicina.

Gönnert R, Meister G, Strufe R y Webbe G. 1967. Biological problems in *Taenia solium*. Z Tropenmed Parasitol. 18:76-81.

Hummel B. B. W 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Canadian J. Biochem. and Phys. 37:1393-1399.

Janeway C.A, Travers P, Walprt M. Capra J. 2000. Inmunobiología Ed. Masson México 644pp.

Jung RC, Rodriguez MA, Beaver PC, Schental JE y Levi RW. 1981. Racemose cysticercus in human brain. A case report AM J. Trop. Med. Hyg. 30:620-624.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 22(15):680-685

Lehninger L, Nelson L y Cox M. 1995. Principios de Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona.

Leid RW, Grand RF, Suquet C. 1987 Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin. Parasite. Immunol. 9:195-204.

Leid RW, Suquet C, Grant RF, Tanigoshi L, Blanchard D, y Yilma Tilahun. 1987 Taeniastatin, a cestode proteinase inhibitor with Broad Host Regulatory activity. Mol. Strat. P, Inva. 12:653-693

Lowry O.H, Rosebrough N. J, Farr A. L. y Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Meyer T. S. y Lamberts B. L. 1965. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of paratid savila proteins on acrilamide-gels strips. Biochim. Acta. 107:144-145.

Molinari, J. L. Meza, R. Suárez, B. Palacios, S. Tato, P. 1983. *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. Exp. Parasitol. 55. 340 – 357.

Monod J, Changeux y Jacob F. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems J. Mol. Biol. 306-329.

Németh I, Juhász S. 1980 A trypsin and chymotrypsin inhibitor from the metacestodes of *Taenia pisiformis* J Parasitology 80, 433-446.

O' Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The Journal of Biological Chemistry. 250 (10): 4007-4021.

Ostrove S. 1990. Affinity Cromathophy: General Methods pp 357-371 Section VII Purification Procedures: Chromatographic Methods en Methods in Enzymology Vollume 182 Edited by Deutscher M. Academi Press, INC.

Otrove S. y Weiss S. 1990. Affinity Cromathophy: Specialized Techniques pp 371-380 Section VII Purification Procedures: Chromatographic Methods en Methods in Enzymology Vollume 182 Edited by Deutscher M. Academi Press, INC.

Peferoen M, Huybrechts y R, de Loof A 1982. Vaccum-blotting: A new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – Polyacrilamide gels to nitrocellulose. FEBS Lett. 145: 369-372.

Rabiela MT, Lombardo L, Flores F. 1972. Cisticercosis cerebral Estudio de 68 casos de autopsia. Patología (MEX) 27-40.

Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Cancino F, 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, In Cysticercosis Present state of knowledge and perspectives. (Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Riadura C, Beltran F). New York Academic. 179-200.

Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Gonzalez A. 1985. Morphological evidence indicating that *C. cellulosae* and *C. rasemosus* are larval stages of *Taenia somium*. Arch Invest Med Méx. 81-92.

Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticercosis. Parasitol Today. 107-126.

Rosomando E. F. 1990. Ion-Exchange Chromatography Section VII Purification Procedures: Chromatographic Methods en Methods in Enzymology Vollume 182 Edited by Deutscher M. Academi Press, INC. pp 309-317

Salgado P, Rojas R, Sotelo J. 1997. Cysticercosis Clinical classification based on imaging studies 157 (17): 1991-1997.

Sartí E. Gutiérrez, E. J.; Gutiérrez Ospina, I. La teniasis y cisticercosis en México. (Revisión bibliográfica). Salud Pública de México. 1986. 28(5): 556-563

Sarti E. Epidemiología de la Teniasis/Cisticercosis. Flisser A, Malagón F. eds. Cisticercosis Humana y Porcina. Limusa Noriega. 1989.

Sarti E, Flisser A, Scalante PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Brofman M, Wijeyartne P. 1997 Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium*. In a rural community in Mexico. Am J. Trop. Med. Hyg 56(2): 127-132.

Silverman, P. H, 1954. Studies on the biology of some tapeworms of genus *Taenia*. II. The morphology and development of the Taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. Agricultural Research Council. 48:356-366.

Smyth, J. D. 1963. The biology of cestode life – cycles. Technical Communication Number 34 of the Commonwealth Bureau of Helminthology, St. Albans, Herts, England. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, Bucks, Inglaterra.

Stites D., Terr A. y Parslow T. 1998. “Inmunología básica y clínica” Ed. Manual moderno. México 1080pp.

Stoot, D.I. 1989 Immunoblotting and dot blotting. J. Immunol. Meth. 119: 153-187.

Suquet C, Green E, Leid W. 1984 Isolation partial characterization of a *Taenia taeniaformis* metacestode Proteinase inhibitor. Int. Journal for Parasitology 14: 165-172.

Tsang V, Brand A. y Boyer A. E. 1989. En enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J. Infections Diseases. 159 : 50-59.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from 322 polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci. 76: 4350-4354.

Towbin H. y Gordon J 1984 Immunoblotting and dot immunobinding-Current status and outlook. J Immunol Methods. 72: 313-340.

Yoshino K. 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part I On the hatching of the eggs of *Taenia solium*. J Med Ass Formosa; 32:139-141.

Yoshino K. 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part II On the migratory course of the oncosphera of *Taenia solium* within the intermediate host. J Med Ass Formosa; 32:155-158.

Yoshino K. 1933. Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part III On the developmento of cysticercus cellulosae within the definite intermediate host. J Med Ass Formosa; 32:166-169.

Weisz, P.B. La Ciencia de la Zoología. 5ta. Edición Omega. Barcelona. 1985