



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACIÓN DE MAPAS PROTEÓMICOS DE PROTEÍNAS
DEL CITOESQUELETO DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*
CEPA ORF Y DE *Taenia solium*

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A :

LAURA MÓNICA RUIZ MARTÍNEZ

TUTOR

DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por darme esta grandiosa oportunidad de crecimiento personal y de formación profesional.

Al departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por la realización de este proyecto en sus instalaciones.

Al apoyo recibido de:

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto IN201003 “Distribución tisular y caracterización molecular de proteínas contráctiles del citoesqueleto de *Taenia solium* y de *Taenia crassiceps*” y proyecto IN216107 “Evaluación de cambios inducidos por estrés químico en la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto V43629M “Síntesis y Estudio de la Actividad Antiprotozoaria y Antihelmíntica de Compuestos Derivados del Bencimidazol y de Moléculas Híbridas con Nitrotiazol”.

Agradecimientos

Al Dr. Javier Ambrosio Hernández por abrirme las puertas de su grupo de trabajo.

A la Bióloga Olivia Alicia Reynoso Ducoing por el apoyo técnico y académico que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado por la valiosa revisión de este proyecto.

Agradecimientos

A mis papás... Calitosh y Nena, los amigos más amados que he tenido, a quienes les tengo una gran admiración y respeto, les agradezco todo lo que me han brindado sobre todo la paciencia y el apoyo incondicional que me han ofrecido siempre. Saben de sobra que en todo momento están presentes en mi vida.

A Alex, por tu apoyo y tu ejemplo, sobre tus pasos intento caminar.

A Mai-mai por ser mi hermana, mi amiga, mi conciencia... gracias por todo tu apoyo, he crecido y aprendido a tu lado y lo que nos falta!

A mis hermanitas consentidas Dao y Pany!!! Por sacarme siempre una sonrisa, por dejarme quererlas tanto ... chamaconas!!!!

A Oli, por todas tus enseñanzas y consejos, porque siempre me sentí en confianza de pedirte ayuda tanto en lo académico como en lo personal, porque me enseñaste a trabajar bien, en orden y limpio en el laboratorio. Gracias por todos tus consejos y tu aliento a no desesperar.

A Mario... en donde quiera que estés, gracias por ser mi amigo.

A Laura González, porque siempre has sido un ejemplo para mi, por iniciarme en el laboratorio y siempre contar contigo... Gracias!!!!

Agradecimientos

A mis compañeros del laboratorio... que han sido tantos... de todos he aprendido experiencias valiosas y he pasado agradables momentos.

A mis amigos del lab Mario, Alex, Angie, Mayra, Liliana, Carlos, David, Kriz, Lau, Adrián, Yamile, Xochitl, Vania, Rafa, Héctor, América, Efrén, Isa, Blanca y la Sra. Glo por su amistad, enseñanzas y por hacer el laboratorio un lugar agradable para trabajar.

A mis amigos de la Facultad, en especial a Mario, Ari, Oscar y Ana, por ser en ese momento mis mejores amigos y cómplices de muchas aventuras... no me quise quedar atrás... Lo logré!!!!!!!

A mis amigos de Grupo Vivir, Susana, Beba, Gerardo por compartir momentos de mucha diversión... y aprendizaje.

A Ricardo (bicho), por llegar a mi vida.

INDICE GENERAL

I. Antecedentes	
1.1. Proteínas	1
1.2. Proteínas del citoesqueleto	1
1.3. Isoformas	7
1.4. Proteínas del citoesqueleto de cisticercos de <i>Taenia</i>	8
1.5. Proteómica	10
1.6. Generalidades de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	11
1.7. Generalidades de cisticercos de <i>T. solium</i>	12
II. Hipótesis	14
III. Objetivos	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos particulares	14
IV. Material y Métodos	
4.1. Diseño experimental	15
4.2. Obtención de parásitos	16
4.3. Cuantificación de proteínas	17
4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	17
4.5. Isoelectroenfoque	17
4.6. Separación electroforética en doble dimensión	18
4.7. Tinciones de geles	
4.7.1. Azul de Coomassie	18
4.7.2. Sypro Ruby	18
4.8. Obtención y análisis de imágenes	
4.8.1. Quantity One	19

ÍNDICE

4.8.2. PD Quest	19
4.8.3. Determinación de PM	19
4.8.4. Determinación de pl	19
V. Resultados, análisis y discusión	20
VI. Conclusiones	43
VII. Perspectivas	45
VIII. Referencias	46

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Organización molecular de los filamentos	3
FIGURA 2. Estructura de los microtúbulos	5
FIGURA 3. Modelo de la arquitectura de un filamento intermedio.....	6
FIGURA 4. Cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i>	12
FIGURA 5. Cisticerco de <i>Taenia solium</i>	13
FIGURA 6. Separación electroforética de proteínas de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	22
FIGURA 7. Análisis densitométrico de la separación electroforética de proteínas de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	24
FIGURA 8. Electroforesis de proteínas de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF.....	27
FIGURA 9. Electroforesis de proteínas de cisticercos de <i>T. solium</i>	28
FIGURA 10. Comparación de mapas proteómicos de geles maestros en 2D..	31
FIGURA 11. Distribución con base al pH de las proteínas de cisticercos	33
FIGURA 12. Presentación de 8 subconjuntos de proteínas en los mapas proteómicos maestros de las dos especies estudiadas	34
FIGURA 13. Proteínas de los grupos A de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	35
FIGURA 14. Proteínas de los grupos B de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	36
FIGURA 15. Proteínas de los grupos C de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	37
FIGURA 16. Proteínas de los grupos D de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	38
FIGURA 17. Proteínas de los grupos E de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	39
FIGURA 18. Proteínas de los grupos F de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	40
FIGURA 19. Proteínas de los grupos G de <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	41

FIGURA 20. Proteínas de los grupos H de *T. crassiceps* y *T. solium*42

INDICE DE TABLAS

TABLA I. Proteínas específicas para *T. crassiceps* cepa ORF.....30

TABLA II. Proteínas específicas para *T. solium*30

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

1D	una dimensión
2D	dos dimensiones
ASB	Albúmina Sérica Bovina
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamino tetracético
IAA	Iodoacetamida
IEE	Isoelectroenfoque
IPG	Tiras de gradiente inmovilizado de pH
kDa	Kilodaltones
μl	microlitro
μg	microgramo
M	Molar
mL	mililitro
mM	milimolar
MHC	Miosina de cadenas pesadas
NL	No lineal
PBS	solución amortiguada de fosfatos
pI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
PSA	Persulfato de Amonio
Rf	Frente relativo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de

	Dodecil sulfato de sodio
UV	Ultra violeta
V	Volts

I. ANTECEDENTES

1.1. Proteínas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células, constituyen el 50 por ciento o más de su peso seco, son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celular. Las hay de diferentes clases y cada una especializada en una función biológica. Según su conformación, se pueden dividir en *proteínas fibrosas* las cuales se hallan constituidas por cadenas peptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje, forman fibras o láminas largas, son materiales físicamente resistentes e insolubles en agua. Las *proteínas globulares* están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. En su mayor parte son solubles en los sistemas acuosos. Generalmente desempeñan una función móvil o dinámica en la célula. Algunas proteínas se sitúan entre los tipos fibrosos y globulares, pareciéndose a las proteínas fibrosas por sus largas estructuras cilíndricas, y a las proteínas globulares, por ser solubles en disoluciones acuosas salinas como por ejemplo la miosina (Lehninger, 1990).

1.2. Proteínas del citoesqueleto

El citoesqueleto es un arreglo de proteínas filamentosas que se encuentran en el citosol de células eucariontes. La interacción de estas proteínas le proporciona a la célula fuerza y rigidez con lo que mantiene su forma. Otra de las funciones de las fibras del citoesqueleto es organizar y favorecer el tráfico vesicular de las células. Se compone de tres estructuras filamentosas bien definidas; microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, cada uno con propiedades distintas y que en conjunto constituyen una red interactiva (Howard, 2004; Karp, 2005).

Los **microfilamentos** miden alrededor de 8 nm de diámetro, a veces llamados actina F son polímeros formados por subunidades de proteínas globulares llamada actina globular o actina G. Los filamentos de actina son

formados por monómeros idénticos que forman cadenas (Fig 1). La masa molecular de las subunidades de actina tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa. Cada subunidad de actina tiene una polaridad definida, y las subunidades polimerizan en cabeza o cola; como consecuencia, los filamentos de actina también tienen una polaridad definida y todas las subunidades apuntan en la misma dirección. La polimerización requiere la presencia de ATP con concentraciones de Mg^{2+} y por K^+ o Na^+ y su polimerización está acompañada de un incremento en la viscosidad de la solución. El crecimiento de los filamentos de actina es por la adición de subunidades en ambos extremos. La velocidad de crecimiento de filamentos de actina purificada es de 5 a 10 veces más rápida en el extremo *más* que en el extremo *menos* (Darnell *et al.* 1990; Howard, 2004; Karp 2005).

Los microfilamentos proporcionan a la célula la habilidad de transportar materiales. Junto con los microtúbulos, los microfilamentos son un sistema caracterizado por estar asociado a proteínas motoras (como las miosinas, que se desplazan sobre ellos) para llevar a cabo estas funciones y es posible que el comportamiento dinámico de estos polímeros en sí pueda contribuir a algunas formas de movilidad. Los microfilamentos son especialmente dinámicos y están modulados por un gran número de proteínas ligadas a actinas (ABP's) (Hesketh *et al.* 1995). Los filamentos también se pueden ver afectados por la unión lateral de proteínas accesorias. En la mayoría de las células algunos de los filamentos de actina se estabilizan mediante la unión a tropomiosina, una proteína alargada que se une simultáneamente a siete subunidades de actina adyacentes en un mismo protofilamento, esta unión puede impedir interactuar a este filamento con otras proteínas; por esta razón, la regulación de la unión a la tropomiosina es una etapa muy importante en la contracción muscular (Alberts *et al.* 2002). Otra proteína importante de unión a actina, presente en todas las células eucariotas, es la cofilina, que desestabiliza los filamentos. También denominada factor despolimerizador de actinas, tiene la característica poco común de unirse tanto a la forma de filamento como a la actina G. Se une a lo largo de todo el filamento haciendo que se enrosque un poco más estrechamente. Este estrés mecánico debilita los contactos entre las subunidades del filamento, debilitándolo y favoreciendo su ruptura. Además

también facilita la pérdida de las subunidades con ADP del extremo menos (Alberts *et al.* 2002).

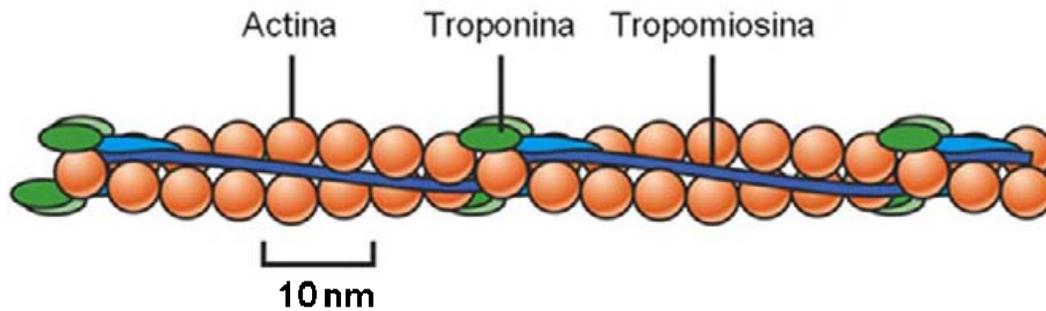


Figura 1. Organización molecular de los filamentos, los cuales consisten en un conjunto helicoidal de subunidades de actina con moléculas de tropomiosinas de forma cilíndrica y moléculas de troponina situadas a intervalos espaciales definidos (Karp G. 2005).

Los **microtúbulos** son fibras que miden 24 nm de diámetro. La secuencia de aminoácidos de sus subunidades ha sido conservada durante la evolución y la organización molecular de todos los microtúbulos es la misma. En ellos se ha encontrado un arreglo asombroso de estructuras celulares que están involucrados en muchos tipos de movimiento. La pared del microtúbulo está formada de subunidades globulares de 4 a 5 nm de diámetro, estas subunidades están ordenadas en 13 arreglos longitudinales circulando el aparente centro hueco (Fig 2). Los microtúbulos contienen dos tipos de proteínas: α -tubulina y β -tubulina, cada una con un peso molecular de 50 kDa. La pared está compuesta de un arreglo helicoidal de repetidas subunidades de tubulina conteniendo una molécula de α -tubulina y β -tubulina unidas entre sí mediante enlaces no covalentes. Estas proteínas sólo se encuentran en éste complejo. Cada monómero α y β tiene un lugar de unión para una molécula de GTP. El GTP unido a un monómero de tubulina α queda físicamente atrapado en la interfase del dímero y nunca puede ser hidrolizado o expulsado; puede ser considerado como parte integral de la estructura heterodimérica de la tubulina. Por el contrario, el nucleótido de la sub-unidad de la tubulina β puede encontrarse tanto en forma de GTP como de GDP y puede ser hidrolizado. La hidrólisis de GTP situado en este lugar tiene un efecto importante en la

dinámica de los microtúbulos. Esta estructura dimérica tiene 8 nm de longitud y es simplemente llamada tubulina. Así, los 13 protofilamentos, cada uno compuesto de dímeros $\alpha\beta$, no son idénticos y corren paralelamente a lo largo del eje. Todos los protofilamentos de un microtúbulo poseen la misma polaridad, un extremo se conoce como el extremo *más* y termina con una fila de subunidades beta. El extremo contrario es el extremo *menos* y concluye con una fila de subunidades de tubulina alfa. La polaridad estructural de los microtúbulos es un factor importante en el crecimiento de estas estructuras y su capacidad para participar en actividades mecánicas dirigidas (Darnell *et al.* 1990, Alberts *et al.*; 2002, Karp 2005).

La composición de las proteínas de los microtúbulos ha sido determinada después del aislamiento del microtúbulo, el principal componente es una proteína llamada tubulina, la cual se polimeriza en microtúbulos en presencia de GTP y Mg^{2+} . Sin embargo otras proteínas son encontradas aunque en menor cantidad, proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), ellas suelen incrementar la estabilidad de los microtúbulos y promover su ensamble. Otras proteínas son las proteínas que se unen a microtúbulos (MTBPs) o proteínas que interactúan con microtúbulos (MTIPs), la unión a la tubulina es transitoria y puede ser influenciada por la presencia de moléculas, incluyendo nucleótidos tales como ATP o GTP. Las proteínas que tienen tales requerimientos incluyen a la dineína, cinecína y dinaminas y son conocidas como proteínas motoras de los microtúbulos (Hesketh *et al.*; 1995).

La familia de las tubulinas contiene cinco clases de proteínas. Aparte de las tubulinas α y β , las cuales forman los microtúbulos, hay otras tres clases que son: γ , δ y ϵ . La γ tubulina está localizada en el centrosoma y tienen actividad nucleando los microtúbulos, δ tubulina está localizada en el cuerpo basal o el centriolo y ϵ tubulina está localizada en el material pericentriolar. En muchos casos, miembros de la misma clase de tubulina de diferentes especies tienen su secuencia de aminoácidos totalmente similar (Howard, 2004). En organismos eucariontes se presentan múltiples isoformas y son de las proteínas que sufren numerosas modificaciones post-traduccionales y dichas variaciones se basan en los aminoácidos cercanos al extremo carboxilo

terminal. La secuencia de aminoácidos de la tubulina es bien conservada (Alberts *et al.* 2002).

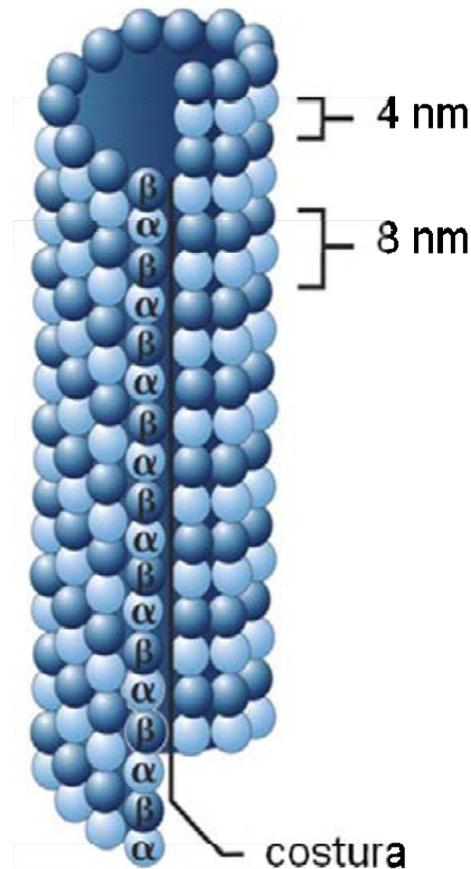


Figura 2. Estructura de los microtúbulos. Diagrama de un corte longitudinal, la pared consiste en 13 protofilamentos formados por heterodímeros de tubulina α - β apilados con una disposición cabeza-cola (Karp G.2005).

Filamentos Intermedios

Los filamentos intermedios (FI) miden de 8 a 12 nm de diámetro (Darnell *et al.* 1990). Hasta ahora los FI solo se identifican en las células animales. Son particularmente abundantes en el citoplasma de las células sometidas a estrés mecánico y parece que su función más importante consiste en proporcionar resistencia física a las células y a los tejidos. Se conectan con otros tipos de filamentos del citoesqueleto por medio de puentes delgados y frágiles. Son un grupo químicamente heterogéneo de estructuras que en los humanos se codifica en más de 60 genes distintos. Los polipéptidos individuales de los

filamentos intermedios son moléculas alargadas, que presentan un dominio central en hélice α que se enrosca con otro monómero igual formando una super hélice. Entonces, un par de dímeros paralelos se asocian de modo antiparalelo formando un tetrámero inestable. Este tetrámero representa la subunidad soluble que sería análoga al dímero de tubulina $\alpha\beta$, o al monómero de actina (Fig 3). La familia de las proteínas de los filamentos intermedios es mucho más diversa estructuralmente que el de la familia de tubulina o actina. Estas incluyen a las queratinas encontradas en el cabello, uñas y células epiteliales, las vicentinas de los fibroblastos y sus parientes las desminas (de las bandas musculares Z); las proteínas neurofilamentosas de las neuronas, entre otras (Alberts *et al*; 2002. Howard, 2004. Karp, 2005).

Los polipéptidos de los FI contienen un dominio helicoidal alfa central y cilíndrico con longitud similar y secuencia homóloga de aminoácidos. Este dominio está flanqueado a ambos lados por dominios globulares de tamaño y secuencia variables. Dos de estos polipéptidos interactúan en forma espontánea cuando sus cilindros helicoidales alfa se envuelven uno alrededor del otro. Los dos polipéptidos se alinean paralelos entre sí en la misma orientación, el dímero tiene polaridad, con un extremo definido por la terminación C de los polipéptidos y el extremo contrario por sus terminaciones N (Karp, 2005).

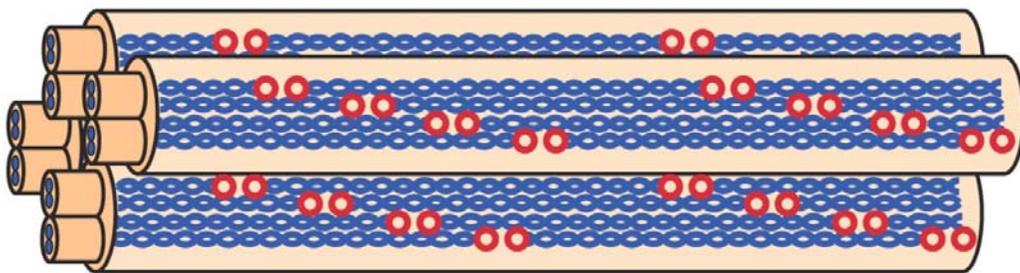


Figura 3. Modelo de la arquitectura de un filamento intermedio. Organización de las subunidades tetraméricas dentro del filamento (KarpG. 2005).

1.3. Isoformas

Se dice que dos proteínas son similares cuando tienen una secuencia de aminoácidos similares. (Howard, 2004). Una isoforma es una versión de una proteína con diferencias pequeñas de otra isoforma de la misma proteína. Estas isoformas se pueden producir de diferentes maneras de una proteína a partir de genes diferentes pero que estén relacionados entre sí, o bien, se generan del mismo gen (Brett *et al*, 2002). Hay dos razones principales por las cuales un organismo puede tener dos o más isoformas de una proteína. La primera es que los genes que codifican las distintas isoformas pueden ser regulados de forma diferente. La regulación diferencial puede también explicar la existencia de múltiples isoformas en organismos multicelulares, donde son encontradas en diferentes tipos celulares. La segunda razón de tener isoformas es que las diferentes estructuras puedan ser usadas para funciones distintas (Howard, 2004).

La regulación diferencial implica modificaciones postraduccionales y postranscripcionales que pueden ocasionar estos hechos tal como el cambio de marco traduccional, en el que el ribosoma cambia de marco de lectura en algún punto durante su jornada a lo largo del mRNA al moverse un nucleótido hacia delante o hacia atrás, lo que generaría dos polipéptidos distintos a partir del mismo RNAm. La lectura a través del codón de terminación, en la que el ribosoma continúa después del codón de terminación. La edición del RNA mensajero, en la que nucleótidos específicos se convierten en otros nucleótidos después que el RNA se transcribe (postranscripcionalmente). La edición del RNA puede crear nuevos sitios de splicing, generar codones de paro u ocasionar sustituciones de aminoácidos. El inicio de traducción alternativa en la que diferentes codones de AUG en el mismo RNAm se utilizan como el codón de inicio en la síntesis de polipéptidos. Los saltos traduccionales, en donde el ribosoma “salta” sobre una secuencia de nucleótidos en un RNAm específico y deja una porción interna sin traducir y por último el Splicing de proteína, en el que un segmento de un polipéptido

específico se elimina y los dos extremos se unen de manera covalente (Karp, 2005).

1.4. Proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia*

Paramiosina. Proteína fibrosa ampliamente distribuida entre los invertebrados pero ausente en los vertebrados, fue definida como un antígeno altamente inmunogénico y con gran potencial para desarrollar vacunas contra algunas helmintiasis como la schistosomiasis y la filariasis. En general, tienen un peso molecular de alrededor de 100 kDa. Algunos autores han mostrado la existencia de isoformas extramusculares en estados larvales de *Schistosoma japonicum* y *S. mansoni*. Una banda cerca de los 200 kDa muestra una probable reacción cruzada con la miosina (Schmidt, 1996). Se ha sugerido un papel multifuncional de la paramiosina no solo como un componente estructural del aparato contráctil, sino también como una molécula capaz de interactuar con el sistema inmune del hospedero con objeto de ayudar a la supervivencia del parásito (Cancela *et al*; 2004). Para buscar isoformas, en *Schistosoma*, la paramiosina fue separada en electroforesis de doble dimensión. En 105 kDa, aproximadamente 10 puntos se encontraron en el intervalo de pH de 4.7 a 5.2. De la composición de aminoácidos de paramiosina, el valor calculado de pI fue de 5.2 (Laclette *et al*; 1991). En los platelmintos *Taenia*, *Echinococcus* y *Schistosoma*, una localización extramuscular de paramiosina ha sido reportada con una amplia distribución, en *T. solium*, con inmunofluorescencia se ha localizado en la superficie externa de la pared vesicular de cisticercos y en células tegumentarias. El tegumento del escólex no muestra inmunofluorescencia. (Schmidt, 1996). Se ha encontrado en fibras musculares del cisticerco de *T. solium* (Ambrosio *et al*; 1997).

Actina. Es una proteína ubicua, altamente regulada a varios niveles incluyendo transcripcional y post-transcripcionalmente. La actina puede auto ensamblarse en microfilamentos y el equilibrio entre actina polimérica y monomérica es regido por complicados controles celulares como pH, sales y un conjunto de proteínas que pueden interactuar con ambos. (Villanueva *et al*; 1999). Esta proteína tiene un papel importante en la estructura celular,

motilidad y la generación de la fuerza contráctil en células musculares y no musculares. Las múltiples formas de actina o isoactinas son producto de diferentes genes y tienen diferentes, aunque muy similar, su secuencia de aminoácidos. (Drew J, Murphy R; 1997). El sistema muscular en el cisticerco de *T. solium* muestra diferentes distribuciones al del céstodo adulto, el primero tiene una variedad de fibras musculares, circular en el rostelo y ventosas; circular, longitudinal y transversal en tejidos tegumentales y una red subcuticular en el canal espiral invaginado. (Ambrosio et al. 2003). La actina purificada de *T. solium*, analizada por isoelectroenfoque y 2D, resolvió 7 puntos sobre los 45 kDa, las isoformas de actina tuvieron valores de pI de 5.23, 5.37, 5.42, 5.45, 5.48, 5.60 y 5.80. Análisis cuantitativos de las isoformas de actina muestran que tienen propiedades predominantemente ácidas (Ambrosio et al. 2003).

Miosina. La miosina es una proteína muscular de alto peso molecular, es transductor de energía de la contracción muscular a través de su actividad de ATPasas. La miosina ha sido encontrada en músculo en *T. solium* (Ambrosio et al. 1997). La miosina de tipo II tiene propiedades bioquímicas distintas debido a que expresa isoformas, estas son reguladas en el desarrollo y relacionadas a la especificidad del tejido en procesos fisiológicamente significantes para el organismo (Babu et al; 2000). La isoforma tipo II de miosina en *T. solium* esta probablemente asociada con requerimientos fisiológicos de cada estado de desarrollo del parásito y se ha encontrado en adulto, cisticerco invaginado y en el cisticerco (Gonzalez-Malerva et al; 2004). La presencia de isoformas se confirma por la separación electroforética de MHC, una isoforma se encontró en el adulto con un peso molecular aproximado de 250 kDa y tres en el cisticerco (Gonzalez-Malerva et al; 2004).

Tubulina. Siendo las tubulinas ampliamente estudiadas en organismos eucariones, poco se ha hecho al respecto en los cestodos y específicamente en tenidos; en cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF se identificaron un aproximado de 13 isoformas de tubulina alfa cuyos valores de pI se encuentran entre los intervalos de 4.84 y 6.69 (Paredes-Salomon, 2008). La tubulina presenta varias isoformas: en mamíferos existen al menos seis de tubulina α y un número parecido de tubulina β ; cada una codificada por un gen

distinto. Dichas formas son muy parecidas y generalmente pueden copolimerizar formando microtúbulos mixtos.

La tubulina γ , participa principalmente en la iniciación de microtúbulos y se le ha encontrado en casi todas las especies y tipos celulares. La identificación electroforética de la tubulina α , se detecta a nivel de los 52 kDa (Romero-Aceff, 2009).

1.5. PROTEÓMICA

La proteómica se relaciona con la sistemática y el análisis de proteínas a gran escala. Está basado en el concepto de un proteoma como un juego completo de proteínas producidas, dadas por una célula o un organismo bajo condiciones definidas. Las proteínas intervienen en casi todas las funciones biológicas, por eso, un análisis comprensivo de proteínas en la célula provee una perspectiva global única de cómo estas moléculas interactúan y cooperan para crear y mantener un sistema biológico trabajando. Las células responden a cambios internos y externos por la regulación de los niveles y la actividad de las proteínas, así los cambios en el proteoma, ya sea cualitativo o cuantitativo, provee una foto de la expresión de proteínas de la célula en acción. El proteoma es una entidad compleja y dinámica que puede definirse en términos de la secuencia, estructura, abundancia, localización, modificación, interacción y funciones bioquímicas de sus componentes, otorgando un recurso rico y variado de datos. (Twyman RM. 2004).

La proteómica se divide en varias ramas principales que comprende diferentes aplicaciones y ayuda a sintetizar la información en un sistema biológico comprensivo. La primera, se relaciona a la identificación sistemática y a la cuantificación de todas las proteínas encontradas en una célula en particular, tejido u organismo. Este acercamiento está dirigido al centro del sistema biológico y el último pretende proveer una cuantificación completa de el proteoma incluyendo todas las variantes post- transcripcionales. La segunda implica la investigación de las funciones proteicas y sus interacciones e incluye una diversa gama de métodos experimentales tales como el análisis de las

secuencias proteicas, estructuras, interacciones y actividad bioquímica. Cuando estos métodos son combinados, inevitablemente se comprenderá mejor muchos procesos biológicos (Twyman RM. 2004).

1.6. Generalidades de *Taenia crassiceps* cepa ORF

Céstodos

Taenia crassiceps es un cestodo perteneciente al Phylum Platelminotos, Familia *Taeniidae*, grupo en el que se encuentran organismos como *Taenia solium*. *Taenia crassiceps* presenta diferentes estadios de desarrollo como todos los ténidos: una fase larvaria o metacéstodo conocida como cisticerco y una adulta, conocida también como tenia o parásito adulto. Es un parásito común del zorro rojo (*Vulpes vulpes L.*) y su metacéstodo *Cysticercus longicollis* se encuentra en pequeños roedores y en topos. Los cisticercos de *Taenia crassiceps* se pueden reproducir asexualmente por gemación cuando se encuentran en la cavidad peritoneal de diferentes especies de roedores; un cisticerco mide aproximadamente de 3 a 5 mm y después de la inoculación intraperitoneal de un roedor, se producen gemas las cuales se despegan del cisticerco inicial y forman nuevos cisticercos (Freeman, 1962) . Debido a estas características, *Taenia crassiceps* es un modelo experimental de cisticercosis murina de fácil mantenimiento en el laboratorio, ya que los parásitos se pueden obtener a través de inoculaciones seriadas en la cavidad peritoneal de los ratones. De cisticercos de *Taenia crassiceps* se han obtenido varias cepas, de ellas la cepa ORF (Fig 4), se aisló a partir del zorro rojo en 1952 por el Dr. Freeman, el cuál reportó una serie de estudios sobre la biología del estadio larvario del parásito; se estableció que dicha cepa perdió la capacidad de infectar especies caninas después de ser mantenida en el laboratorio por inoculaciones seriadas en la cavidad peritoneal de roedores (Freeman, 1962), ya que esta cepa carece de escólex y róstelo, Kuhn y col., reportan que los cisticercos de esta cepa se reproducen mas rápidamente que los cisticercos de la cepa KBS y proponen que las diferencias morfológicas y reproductivas podrían deberse a una mutación genética. Los cisticercos de *Taenia crassiceps* presentan a nivel ultraestructural, una morfología semejante a los cisticercos de

Taenia solium: son vesiculares, llenos de fluido vesicular y delimitados por un tegumento sincicial continuo, el cual está unido a una capa germinal en la cual se asientan los diferentes tipos de células que la constituyen (Ambrosio *et al*; 1994).



Figura 4. Cisticerco de *Taenia crassiceps*.

1.7. Generalidades de cisticercos de *Taenia solium*

Familia Platelminetos, género *Taenia*, clase Cestoda, subclase Eucestoda, orden Cyclophyllidea, familia Taeniidae y la especie es *Taenia solium*.

Taenia solium es un parásito con tres estadios de desarrollo bien diferenciados: huevo, metacéstodo y parásito adulto. Los metacéstodos invaginados, o mejor conocidos como cisticercos (Fig 5), miden de 0.5 a 2.0 cm de diámetro está llena de un líquido denominado fluido vesicular, la cual contiene enrollado al futuro parásito adulto. El parásito está formado del escólex en donde ya se distinguen las cuatro ventosas y el róstelo compuesto de una doble corona de ganchos. La superficie de la pared vesicular está constituida por microvellosidades, la superficie permite al parásito el

ANTECEDENTES

intercambio metabólico entre él y su hospedero ya que carece de un aparato digestivo.

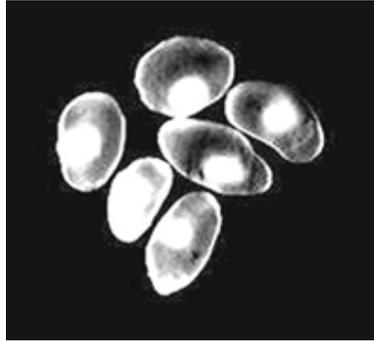


Figura 5. Cisticerco de *Taenia solium*.

II. HIPÓTESIS

Debido a que pertenecen al mismo género y tomando en cuenta que hay una expresión diferencial de diversas proteínas del citoesqueleto, así como de sus isoformas; existe la posibilidad de que la expresión de proteínas de cisticercos de *T. solium* y de *T. crassiceps* de la cepa ORF se evalúe y compare mediante electroforesis en doble dimensión.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

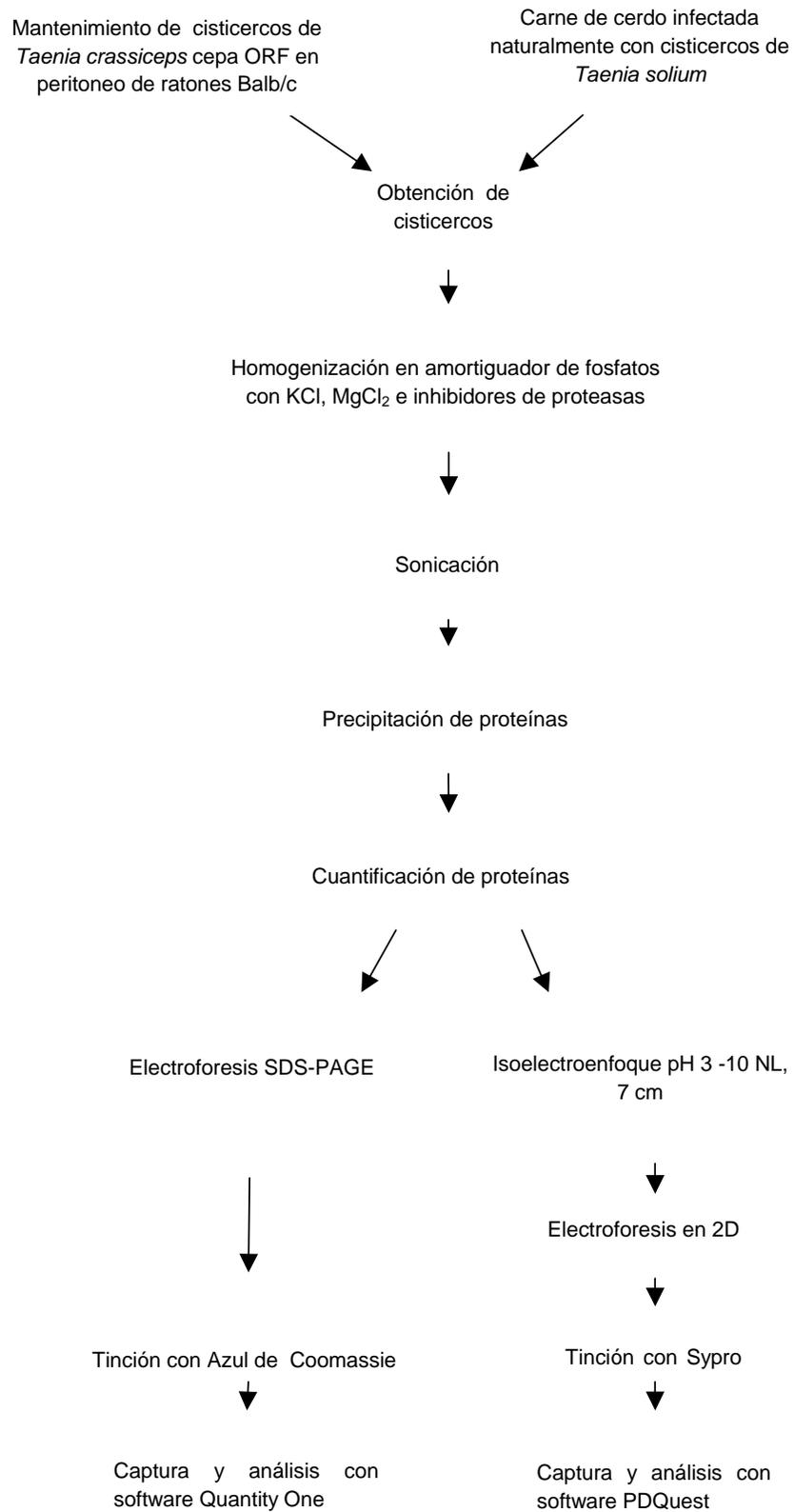
Obtener y comparar los mapas proteómicos de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF y *T. solium*.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener un extracto de proteínas de cisticercos tanto de *T. crassiceps* cepa ORF como de *T. solium*.
- Obtener la distribución total de acuerdo a PM y punto isoeléctrico de las proteínas.
- Comparar los mapas proteómicos y establecer la expresión cuantitativa de proteínas seleccionadas de los parásitos.
- Proponer la identificación de algunas proteínas del citoesqueleto con base a su PM y su pI por comparación en consulta bibliográfica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental





4.2. Obtención de parásitos

4.2.1. Cisticercos de *T. crassiceps*.

Se utilizó el modelo de cisticercosis murina para mantener los cisticercos de *T. crassiceps* en el laboratorio, es decir, a partir de inoculaciones seriadas en la cavidad peritoneal de ratones hembras Balb/c de cinco semanas de edad, aproximadamente cada tres meses se realizaron pases a una nueva camada de ratones para mantener la cepa. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y de la cavidad peritoneal se recuperaron los cisticercos, que se lavaron con PBS a 4°C y se congelaron a -20°C hasta su uso.

4.2.2. Cisticercos de *T. solium*

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron de un cerdo infectado de forma natural, una vez extraídos se lavaron con PBS a 4°C y se congelaron a -20°C.

4.2.3. Obtención de proteínas

Los cisticercos se homogenizaron en buffer de fosfato de sodio 6.7mM complementado con 0.04 mM de KCl y 1 mM de MgCl₂ a pH 7.4, con un homogenizador de tejidos Homogenizer (PRO Scientific Inc.) a velocidad máxima durante 10 segundos, en presencia de un coctel inhibidor de proteasas con EDTA (Complete protease inhibitor cocktail tablets, ROCHE) en un baño

de hielo; posteriormente cada extracto se sonicó 3 veces a 50 decibeles por 30 segundos cada vez con un intervalo de 1 minuto entre cada sonicación a 4°C con un equipo VibraCell (SONICS & MATERIALS INC.).

4.2.4. Precipitación de proteínas

Las proteínas se precipitaron en una solución con 10% de TCA; 20 mM de DTT en acetona a -20°C, ésta mezcla se sonicó 3 veces por 10 segundos a 30 decibeles, se incubó a 4°C por 2 horas, posteriormente fue centrifugada a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C, el precipitado se resuspendió en 20 mM de DTT en acetona a -20°C, se sonicó durante 10 seg a 10 decibeles y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el precipitado final se diluyó en una solución de Tris 5mM que se sonicó 10 seg a 10 decibeles.

4.3. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el kit DC Protein Assay Reagents (Bio-Rad DC Protein Assay. Bio-Rad Laboratories) que usa como principio el método de Lowry. La curva patrón fue de 0, 0.5, 1, 2, 3 y 5 mg/mL ASB. De cada una de estas y de los experimentales se tomaron 5 µL y se depositaron en un pozo de una placa de 96 pozos (Maxi Sorp). Las cuantificaciones se realizaron por triplicado. Posteriormente, se agregaron 25 µL del reactivo A y 200 µL del reactivo B la absorbencia a 750 nm mediante un espectrofotómetro (Microplate, BIO-TEK Instruments). Una vez obtenidos los valores, se graficaron y mediante el método de regresión lineal, con base en la curva patrón se calculó la concentración de las muestras.

4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La separación de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% con 0.1% de SDS, se analizaron por carril 30 µg de cada muestra, Se utilizó la cámara mini-Protean 3 (Bio-Rad) a un voltaje constante de 80 V por 30 min. y 100 V durante 1hr. Se utilizaron marcadores de Peso Molecular

preteñidos (Precision Plus, Bio-Rad). Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie R-350.

4.5. Isoelectroenfoque

De la muestra, 50 µg se mezcló con la solución de rehidratación (Urea 7M, Thiourea 2M, Chaps 2%, Azul de bromofenol) en un volumen final de 125µl. Posteriormente se puso en contacto con las tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG), de 7 cm de longitud de pH: 3-10 NL y se incubó a temperatura ambiente por 16 horas, las tiras se corrieron en la unidad Protean IEF bajo las siguientes condiciones: Paso 1, 250 V, Ramp: L, Tiempo: 00:20; Paso 2, 4000 V, Ramp: L, Tiempo: 02:00; Paso 3, 4000 V, Ramp: R, V/hora 10000. Las tiras de IPG se equilibraron por 15 min en agitación y a temperatura ambiente en solución de equilibrio (Tris base 8.8, Urea 8M, Glicerol 30%, Azul de Bromofenol 0.02%, agua MilliQ) complementada con 0.13 M DTT y durante otros 15 min en la misma solución pero complementada con 0.32 M IAA.

4.6. Separación electroforética en doble dimensión.

Las tiras se colocaron sobre geles pre hechos de poliacrilamida (Gel cassette NuPAGE 4-12% Bis-Tris ZOOM, 1.0 mm, IPG well, Invitrogen) y se sellaron con agarosa al 5%. La separación electroforética se llevó a cabo en una mini-cámara XCell Sure. Se utilizaron pesos moleculares no teñidos Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad), las condiciones de corrida fueron 200 V constantes durante 40 minutos en refrigeración.

4.7. Tinciones de geles

4.7.1. Azul de Coomassie

Los geles se incubaron en Azul de Coomassie (Phast Gel Blue, Pharmacia) durante aproximadamente una hora en agitación a temperatura

ambiente, se retiró el colorante y se procedió a quitar el exceso de este con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% en agua destilada hasta lograr el contraste deseado.

4.7.2. Sypro Ruby

Otros geles fueron teñidos con Sypro Ruby (Molecular Probes, Invitrogen). Los geles se fijaron durante 15 minutos en Metanol 50%, Ácido acético 7% en agua destilada, concluido el tiempo se desechó la solución y se agregó el reactivo Sypro Ruby según la técnica del reactivo, finalmente se lavaron con una solución de Metanol 10%, Ácido acético 7% en agua destilada y se realizaron 2 lavados con agua milli Q por 5 minutos cada vez.

4.8. Obtención y análisis de Imágenes

4.8.1. Quantity One

Se capturaron las imágenes en un equipo Chemidoc XRS de Bio-Rad con el programa de cómputo Quantity One versión 4.6 para una dimensión, utilizándose un filtro 3004 62 mm (color ámbar).

4.8.2. PDQuest

El análisis y la captura de los geles de doble dimensión se hizo en el Chemidoc XRS mediante el programa de cómputo PDQuest V 7.4.0. (Bio-Rad) con filtro 630BP30 62 mm con luz UV. Los geles maestros, representativos de las separaciones electroforéticas, se obtuvieron de tres geles de diferentes experimentos.

4.8.3. Determinación de PM

Capturadas las imágenes, se analizaron con el paquete computacional adecuado y se obtuvieron las estimaciones del peso molecular de cada una de las bandas obtenidas por muestra analizada así como los valores de Rf.

4.8.4. Determinación de pI

El estimado de pI se calculó manualmente con base en lo descrito por Amersham Biosciences al utilizar el tríptico técnico “Immobiline Drystrip Visualization or pH gradients” No. 18-1140-60.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Separación electroforética de proteínas.

Como se muestra en la figura 6, se logró una separación electroforética efectiva de los homogenizados obtenidos de los cisticercos. La comparación de las muestras se hizo con la misma concentración (30 μg) y mostró que el número de bandas era semejante para las muestras de los parásitos. Sin embargo, se detectó que la intensidad de las bandas era diferente: Por arriba de los 250 kDa, se encontraron diferencias en proteínas de alto peso molecular ya que en *T. solium* se observaron bandas que no fueron apreciadas en *T. crassiceps*. Posiblemente, las bandas que se identificaron correspondan a agregados de proteínas que no pudieron ser fraccionadas durante la electroforesis o bien, que ellas correspondan a proteínas de alto peso molecular como la miosina tipo II en su forma nativa identificada en estos parásitos (González-Malerva *et al*, 2003). A nivel de los 250 kDa, se observó una banda de similar intensidad para ambos parásitos, la cual podría ser un indicativo de que esta proteína es constitutiva en estos organismos. Cabría la posibilidad de que se tratara de miosina tipo II en su forma monomérica como ya se ha reportado para ambos parásitos (González-Malerva *et al*, 2003; Cruz-Rivera *et al*, 2006). En el intervalo de 150 a 75 kDa, se observaron diferencias en el número, la intensidad y la localización de las bandas en los casos analizados tal vez a nivel de 100 a 90 kDa se encuentren las bandas correspondientes a la paramiosina descrita en cisticercos de *T. solium* (Laclette *et al*, 1991). En el intervalo de 75 a 50 kDa, se observan diferencias en el número de bandas; por debajo de 75 kDa, se encontraron en el caso de *T. crassiceps*, dos bandas; una de menor intensidad con un PM más alto que la otra y otra de mayor intensidad de menor PM. Esta última banda se presentó al mismo nivel que la que se observó para *T. solium*. Luego, por encima de 50 kDa, se observaron un número similar de bandas en ambos carriles, aunque en el caso de *T. crassiceps*, por encontrarse las bandas con mejor definición, da la impresión de que hay una banda mas que no se observa para *T. solium*. Posiblemente, en el intervalo de 50 a 55 kDa, algunas de las bandas con tinción tenue correspondan a alguna de las tubulinas α , β y γ . Bajo estas circunstancias es difícil indicar si estas bandas corresponden a alguna de las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

isoformas de tubulina indicadas; en nuestro grupo se ha demostrado que estas proteínas sólo se evidencian bajo ensayos de reconocimiento con anticuerpos específicos, una vez que han sido electrotransferidas a membranas de PVDF (Paredes, 2008; Romero-Aceff, 2009). En el intervalo de 50 a 37 kDa se observaron diferencias en la localización e intensidad de las bandas y no así en el número de ellas, ya que en ambos carriles hay 5 bandas; sin embargo, en *T. crassiceps*, se observaron 2 bandas con una intensidad aparentemente similar y en la que una de ellas tiene un mayor PM que la otra. La detección de estas bandas es diferente de lo que se observó para el caso de *T. solium*, en donde aunque también se detectaron 2 bandas con intensidad similar de tñido y una de ellas presentó mayor PM que la otra, la separación entre ellas fue menor que lo encontrado para *T. crassiceps*. Al nivel de 42 kDa cabría la posibilidad de que las bandas encontradas correspondan a actina, como ha sido demostrado para los cisticercos de *T. solium* (Ambrosio et al, 2003). En el intervalo de los 37 a los 25 kDa se encontró un número semejante de bandas para los parásitos, sin embargo, la intensidad de tñición fue distinta; para *T. solium* se encontraron a las bandas con una mayor intensidad y grosor que lo observado para *T. crassiceps*. Al nivel de los 25 kDa también se encontraron diferencias entre el número y la intensidad de las bandas entre ambos parásitos. Es posible que en los pesos moleculares localizados por debajo de los 25 kDa, las proteínas no estén bien definidas, lo cual podría deberse a las limitantes técnicas de resolución de la electroforesis en este intervalo de separación.

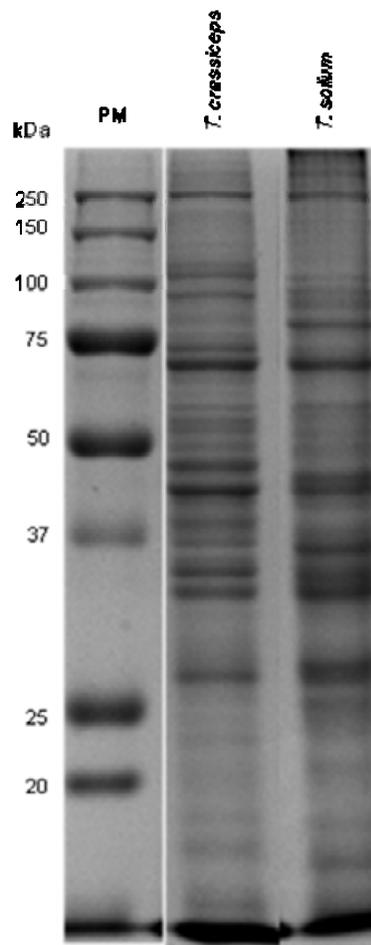


Figura 6. Separación electroforética de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*. Geles de poliacrilamida-SDS al 10%, bajo condiciones reductoras. Tinción con Azul de Coomassie.

Luego de la obtención de imágenes de la separación electroforética, como se muestra en la figura 6, se les sometió a un análisis densitométrico con la finalidad de estimar cuantitativamente la expresión de cada una de las proteínas. Como se observa en la gráfica de la figura 7, las bandas de proteínas se analizaron en función de su separación electroforética y se les localizó con respecto a la posición de los marcadores de PM mediante el empleo del paquete computacional Quantity One. Según lo que se observa en la figura 7, para ambas muestras, de manera general, hay semejanzas en la distribución y en el número de las bandas (*T. crassiceps* = 35 bandas; *T. solium* = 34 bandas). Sin embargo, se encontró que hubo diferencias importantes en la intensidad de pixeles asociada a la mayor parte de proteínas, por lo que podría

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ser establecido que hay una expresión diferencial en cantidad de proteína cuando se comparan las muestras de *T. crassiceps* y de *T. solium* y que según lo que se observa en *T. crassiceps* hay proteínas con mayor expresión; tales proteínas se encontraron en los intervalos de Rf de 0 a 0.1 ($> e = a$ 250 kDa); de 0.1 a 0.2 (entre 150 y 75 kDa); de 0.3 a 0.4 (alrededor de los 50 kDa); de 0.4 a 0.5 (entre 50 y 37 kDa); de 0.5 a 0.6 (entre 37 y 25 kDa) y de 0.9 a 1 ($<$ de los 20 kDa). Otras proteínas que se encontraron expresadas, pero en menor cantidad que lo observado para las de *T. solium*, estuvieron localizadas en los intervalos de Rf de 0.5 y 0.6 (~37 kDa), de 0.8 y 0.9 ($<$ a los 25 kDa). De las proteínas con cantidades semejantes en ambas muestras, se encontraron localizadas en los intervalos de Rf de 0.2 a 0.3 (~70 kDa); de 0.3 a 0.4 (~60 kDa) y el del intervalo de 0.6 y 0.7 (~30 kDa). En el caso de *T. solium*, para aquellas bandas con cantidades de proteínas con mayor expresión que las de *T. crassiceps*, se detectaron a las situadas en los intervalos de Rf de 0.2 – 0.3 (~ 80 kDa) y de 0.5 a 0.6 (~35 kDa). En resumen se encontraron 18 proteínas expresadas con alta concentración para *T. crassiceps* y 9 para *T. solium*; 4 de expresión semejante tanto en proteína como en cantidad entre ambos parásitos y 4 de expresión semejante pero con diferente intensidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

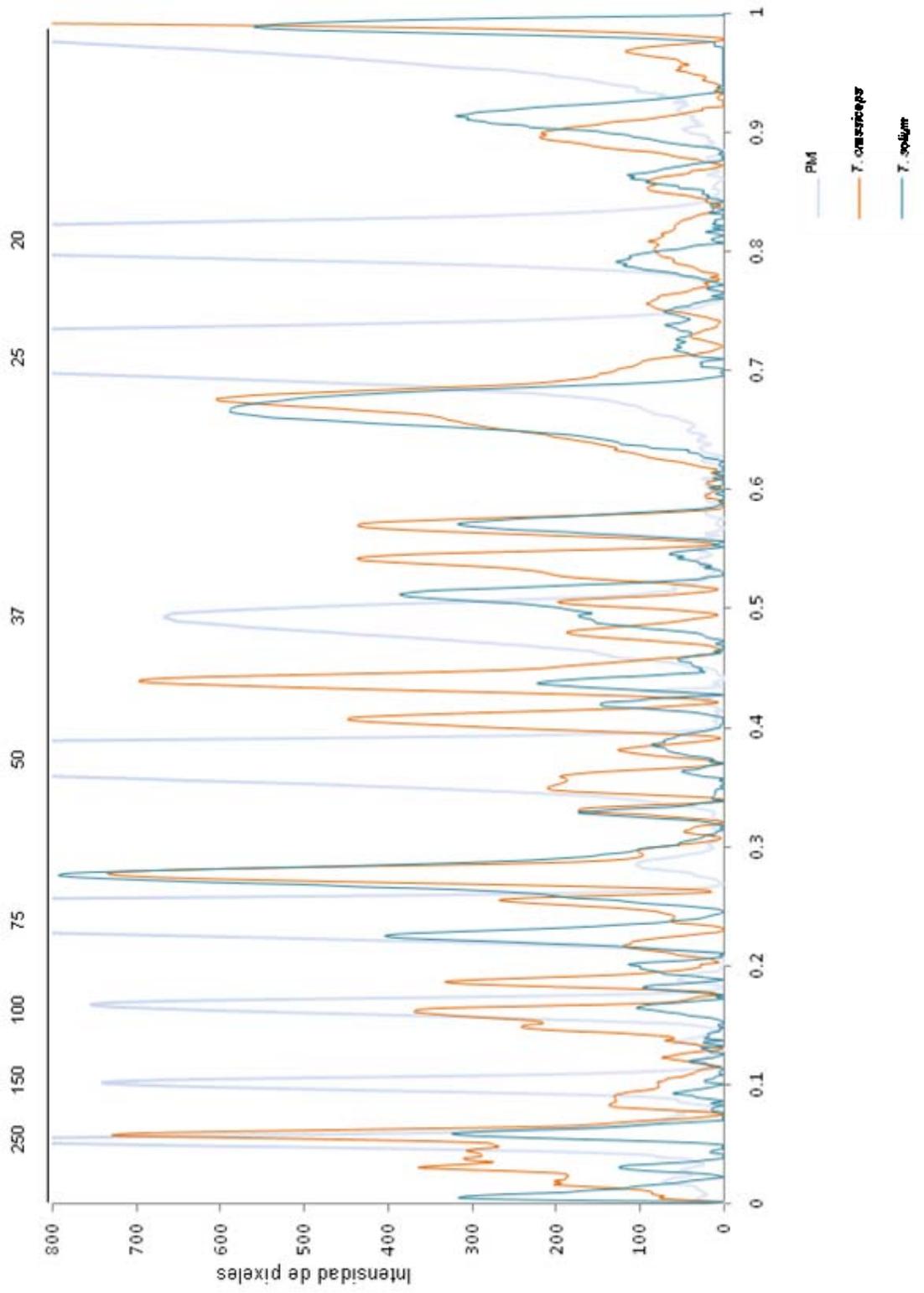


Figura 7. Análisis densitométrico de la separación electroforética de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*. Las proteínas fraccionadas en la fig. 6 se sometieron a un análisis densitométrico con el paquete computacional de Quantity One, en donde se determinó la intensidad de los pixeles (ordenadas) para cada una de las bandas en función de su movilidad electroforética relativa o Rf (abscisas). En el eje superior se indican los PM correspondientes de los marcadores comerciales. Se hace la comparación de los barridos para las muestras de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF, *T. solium* y los marcadores de PM.

Según lo anterior podemos asumir que existen diferencias en la expresión de proteínas en cada uno de los organismos en estudio como proteínas de alto peso molecular localizadas por arriba de los 250 kDa (0 – 0.5 Rf) como también variaciones en la expresión de las proteínas que podrían estar relacionadas debido al patrón de banda y otras que presentan ubicaciones e intensidad de expresión similares.

5.2. Análisis electroforético en 2D de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF

En la figura 8 se muestra la comparación de las separaciones electroforéticas tanto en una como en dos dimensiones. La descripción de las bandas y el número de ellas en los geles en una dimensión se presentaron en el párrafo anterior. En el caso del fraccionamiento en 2D, en el gel seleccionado, se obtuvo la separación de más de 200 puntos (correspondientes a proteínas individuales) y ello es una separación de lo mostrado en 1D. El mapa proteómico obtenido, corresponde a la separación electroforética de proteínas que se enfocaron de manera perfecta, unos presentan mayor expresión que otras con base a la intensidad con la que resultaron teñidas y, en su mayoría, se localizaron entre los intervalos de pH de 4 a 8 y en el de PM entre los 75 a los 37 kDa. En algunos casos se encontró que las proteínas parecen formar parte de un rosario en donde alguna de ellas está expresada con mayor intensidad que otras del mismo sitio. Aparentemente, estas proteínas en serie podrían estar asociadas a isoformas de un mismo tipo de proteína y que en el caso de *T. solium* corresponden a isoformas de actina con un PM aproximado a los 45 kDa (Ambrosio *et al*, 2003). Sin embargo, para

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

llevar a cabo la identificación de estas proteínas sería necesario el analizarlas mediante espectrometría de masas (Twyman, 2004) o bien, mediante el reconocimiento de anticuerpos en ensayos de inmunoelectrotransferencia como se hizo para la actina. Otras proteínas de menor intensidad de expresión que se encontraron en el mapa, podría atribuirse a que en el momento del análisis ellas no se expresaron con tanta intensidad, o bien, en algunas de ellas no se dieron las mejores condiciones para que enfocaran el pI correspondiente. Otra explicación alternativa en la falta de expresión de proteína, principalmente en aquellas que se encuentran localizadas en los límites de la ventana del análisis electroforético (pH de 3 a 10 y PM de 250 a 10 kDa), podría ser la falta de su definición por tales condiciones o porque realmente tengan poca expresión. Sin embargo, la intensidad con la que se detectaron los puntos, con el conocimiento de que corresponden a proteínas del citoesqueleto, podría estar relacionado el posible papel biológico que desempeñan en los parásitos estudiados en un momento definido de su vida.

En lo referente a la comparación de las separaciones de proteínas, tanto en 1D como en 2D, se observa que de las 35 bandas encontradas por 1D, no todas corresponden a los puntos situados en los PM correspondientes en 2D. Esto tiene su explicación en que las condiciones de las separaciones electroforéticas son distintas: En la 2D se utilizó una separación inicial de las proteínas de acuerdo a su pI y su posterior separación por su PM, el tratamiento de las proteínas para el análisis en 2D requirió una desnaturalización fuerte mediante el empleo de agentes caotrópicos como la Urea y la Tiourea y, finalmente, la separación de las proteínas se hizo en un gel en gradiente de 4 a 12% a diferencia de 1D en donde se hizo la separación en un gel continuo al 10%. Estas condiciones propiciaron que hubiera agregación de bandas y no buena separación en 2D.

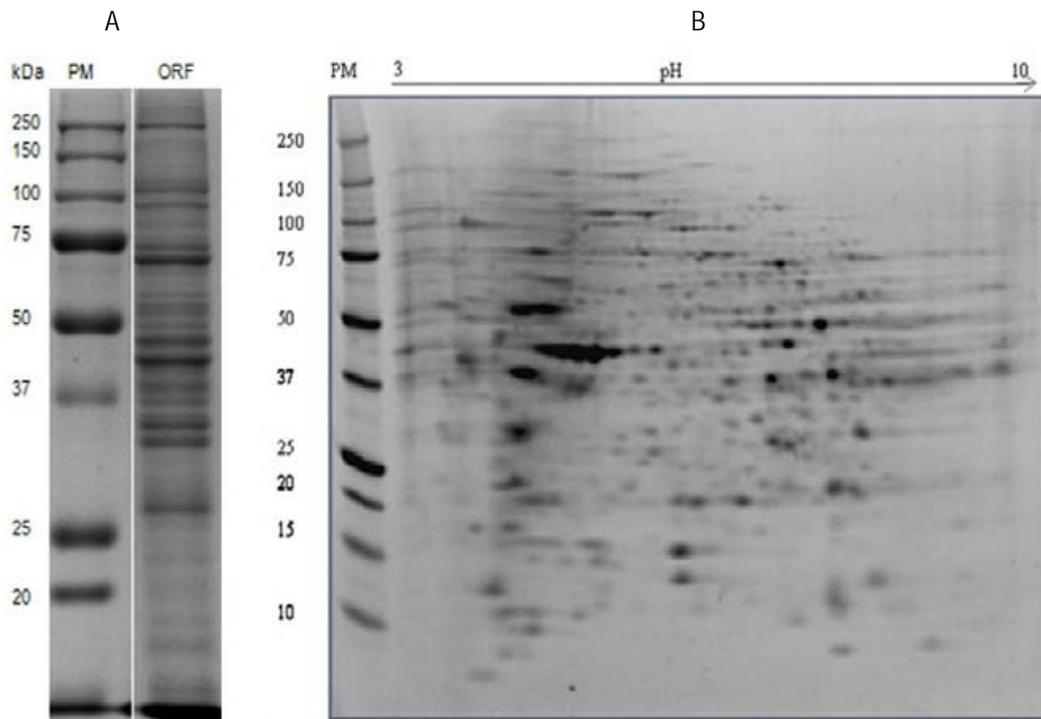


Figura 8. Electroforesis de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Comparación en 1D en geles de poliacrilamida SDS al 10 % (A) con 30 μ g de proteína y en 2D gel de poliacrilamida en gradiente 4 al 12 % con 50 μ g de proteína (B). Tinción con azul de Coomassie Brillante (A) y por Sypro Ruby (B). En ambos casos se utilizaron marcadores comerciales de peso molecular de amplio rango, en A marcadores preteñidos y en B, no teñidos. En B, las proteínas previamente se separaron por isoelectroenfoque en tiras IPG de intervalo NL de 3-10 de pH y de 7 cm de largo. Las imágenes se obtuvieron mediante los paquetes de Quantity One (A) y PDQuest (B).

5.3. Análisis electroforético en 2D de cisticercos de *T. solium*.

De la misma manera que se hizo para la figura 8, en la figura 9 se muestra la comparación de la separación electroforética en 1D y en 2D de proteínas del citoesqueleto de *T. solium*. En este caso se encontró que en el mapa proteómico se revelaron 300 proteínas. En comparación con el mapa proteómico para *T. crassiceps*, para *T. solium* hubo un mayor número de proteínas detectadas, mientras que en los extremos de la ventana se encontró una menor resolución de proteínas, se encontró que hubo un mayor número de proteínas de intensa expresión, se encontraron 12 rosarios entre los que posiblemente se encuentre uno semejante al encontrado en los 45 kDa para *T. crassiceps*, en algunos de ellos se observa que claramente hay una expresión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

débil de las proteínas o, bien, intensa. La mayor parte de todas las proteínas reveladas se encontraron en el intervalo de pI de 4 a 8 y de PM de 100 a 37 kDa. En el gel presentado en dicha figura, se encontró que hubo una pobre resolución de casi todas las proteínas en el intervalo de pI de 3 a 5; estos resultados podrían indicar que para lograr la mejor separación y resolución de las proteínas es necesario efectuar un isoelectroenfoco en este intervalo de pH o bien, es posible que desde la extracción de las proteínas no se hayan favorecido sus características bioquímicas que permitan su adecuado enfoque bajo las condiciones de los ensayos.

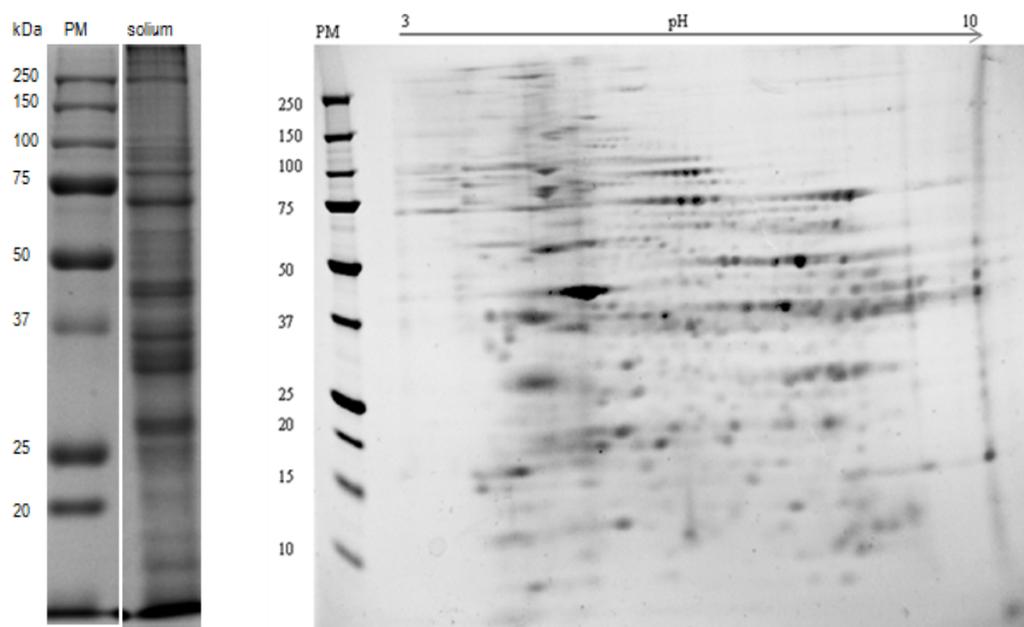


Figura 9. Electroforesis de proteínas de cisticercos de *T. solium*. Se muestra la comparación electroforética de extractos de proteínas en 1D en geles de poliacrilamida al 10 % (A) y en 2D de uno de los geles de poliacrilamida en gradiente de concentración del 4 al 12 % (B). El revelado fue con azul de Coomassie Brillante (A) y por Sypro Ruby (B). La imagen se capturó con un fotodocumentador mediante los programas computacionales Quantity One (A) y PDQuest (B).

5.4. Comparación de mapas proteómicos de cisticercos.

Con la finalidad de efectuar la comparación de los mapas proteómicos, se seleccionó un triplicado de geles de 2D, los cuales se procesaron con el programa PDQuest y se obtuvieron los geles maestros mostrados en la figura 10. A los cuales se les aplicaron colores falsos a las manchas de las proteínas con la finalidad de detectar si algunas de ellas eran comunes en los parásitos, o bien, si alguna de ellas no lo eran. Los geles maestros obtenidos permitieron apreciar una mejor separación y enfoque de las proteínas a diferencia de lo que se observó en las figuras 8 y 9; por lo consiguiente, con el programa PDQuest, se pudieron cuantificar 216 puntos para los cisticercos de *T. crassiceps* y 348 para *T. solium*. El mayor número de proteínas encontradas para *T. solium*, en comparación con las de *T. crassiceps*, podría estar relacionado con que estos parásitos tienen más tejido como el correspondiente al escólex invaginado. Luego, al empalmar los geles maestros, fue posible encontrar que en *T. crassiceps* hay alrededor de 87 proteínas específicas de esta especie; mientras que, para *T. solium*, se encontraron alrededor de 166. En las tablas I y II se muestra el número de proteínas por especie de cada parásito que se localizaron en función de su pI y/o su PM y como se observa, la mayor parte de ellas tiene un pI entre 4 y 6 y un PM entre 25 y 150 kDa para *T. crassiceps*; mientras que para *T. solium* el pI se encontró entre 4 y 8 a un PM entre 25 y 250 kDa (figura 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

T. crassiceps

pl	3 a 3.9	4 a 4.9	5 a 5.9	6 a 6.9	7 a 7.9	8 a 8.9	9 a 9.9	>10
P.M (kDa)								
> 250	-	-	-	-	-	-	-	-
250 a 150	-	-	2	-	-	-	-	-
150 a 100	-	-	6	5	-	-	-	-
100 a 75	-	1	-	2	2	-	-	-
75 a 50	1	2	5	5	-	-	-	2
50 a 37	1	1	8	-	-	-	-	-
37 a 25	3	3	6	3	-	-	-	-
25 a 20	-	2	4	1	-	-	-	-
20 a 15	-	2	2	-	-	-	-	-
15 a 10	-	2	8	2	1	-	-	-
<10	-	3	-	1	-	1	-	-
Total	5	16	41	19	3	1	0	2

TOTAL: 87

T. solium

pl	3 a 3.9	4 a 4.9	5 a 5.9	6 a 6.9	7 a 7.9	8 a 8.9	9 a 9.9	>10
P.M (kDa)								
> 250	1	6	9	-	2	-	-	-
250 a 150	-	2	3	-	-	-	-	-
150 a 100	2	7	13	1	-	-	-	-
100 a 75	3	9	14	7	-	-	-	-
75 a 50	2	2	16	2	4	3	-	-
50 a 37	2	-	-	3	-	-	-	-
37 a 25	-	5	6	3	1	2	-	1
25 a 20	-	-	4	2	1	-	-	-
20 a 15	-	1	5	1	1	-	-	1
15 a 10	-	4	3	2	3	2	1	-
<10	-	1	-	-	2	1	-	-
Total	10	37	73	21	14	8	1	2

TOTAL: 166

Tabla I y II. Número de proteínas específicas de cada parásito en función de su pl y su PM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

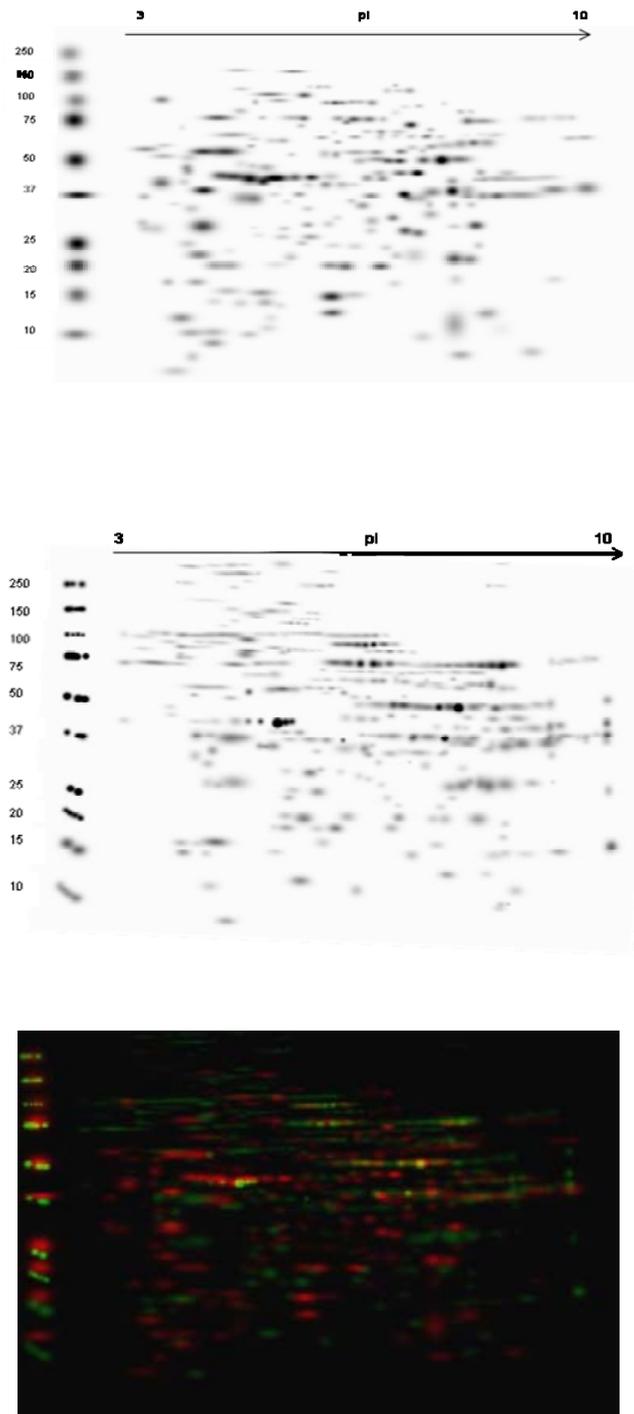


Fig. 10 Comparación de mapas proteómicos de geles maestros en 2D.

5.5. Comparación de la distribución de las proteínas en función de su pl.

Con base en los pl calculados para las proteínas presentadas en los geles maestros de la figura 10, se procedió a agrupar a las proteínas en intervalos de pH (unidades de pH en el intervalo de 3 a 10) como se muestra en la figura 11. De acuerdo a esta figura se observa que el mayor porcentaje de las proteínas es de naturaleza ácida, ya que se encuentran en el intervalo de pH de 4 a 6; siendo en el pH de 5.0 a 5.9 en donde se encuentra la mayor parte de ellas. En *T. crassiceps*, en el pH 5, presenta mayor número de proteínas (43.98%), al igual que en *T. solium* (50.14%). En el caso del pH básico, se encontró que la mayor parte de proteínas correspondientes a *T. solium* se encuentran en el intervalo de pH de 9 y 10 (0.29% y 2.87 % respectivamente), mientras que para *T. crassiceps*, en estos mismos intervalos, se encuentran distribuidas de forma distinta (2.78% y 0.46% respectivamente). Con base a estas diferencias podemos argumentar que aún cuando los parásitos son morfológicamente parecidos (sin tomar en cuenta el escólex de los cisticercos de *T. solium*) y que incluso se ha establecido que también son parecidos antigénicamente, las proteínas del citoesqueleto que presentan podrían tener un funcionamiento distinto por el pH en que se les ha clasificado. De acuerdo a lo anterior, cabría la posibilidad de que los parásitos son metabólicamente o fisiológicamente distintos y que las proteínas podrían estar acordes a las necesidades fisiológicas de los parásitos.

***T. crassiceps* cepa ORF**

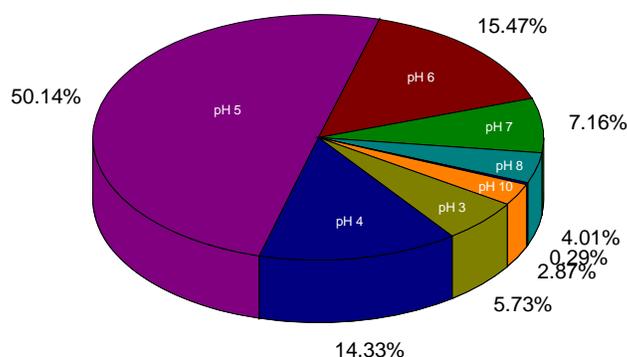
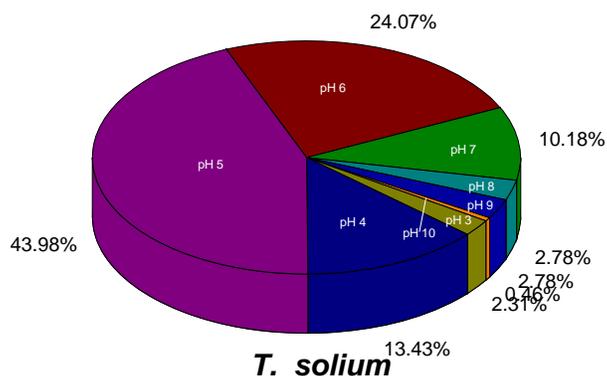


Figura 11. Distribución con base al pH de las proteínas de cisticercos. Los porcentajes indican el total observado de proteínas en los mapas proteómicos, que se localizaron en los intervalos. Se muestra la comparación de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* y de *T. solium*.

5.6. Subconjuntos de proteínas dentro de los mapas proteómicos.

Se consideró que como una forma de intentar la identificación de alguna de las proteínas en los mapas proteómicos podría ser la formación de grupos. El criterio principal que se siguió para la formación de los grupos se dio con base en PM y pl muy cercanos y podrían contener grupos de proteínas semejantes (Fig. 12). Se formaron ocho grupos por mapa proteómico. Luego, para cada una de las proteínas seleccionadas en los grupos, se hizo una cuantificación de su nivel de expresión mediante el programa PDQuest. Se consideró que cada uno de los grupos ofrece un panorama instantáneo del nivel de expresión de las proteínas en ese momento específico del ciclo de vida

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del parásito, el posible número de isoformas en cada parásito podría ofrecer con base en la literatura, un posible papel biológico que desempeñasen determinadas proteínas en cada uno de los organismos en estudio.

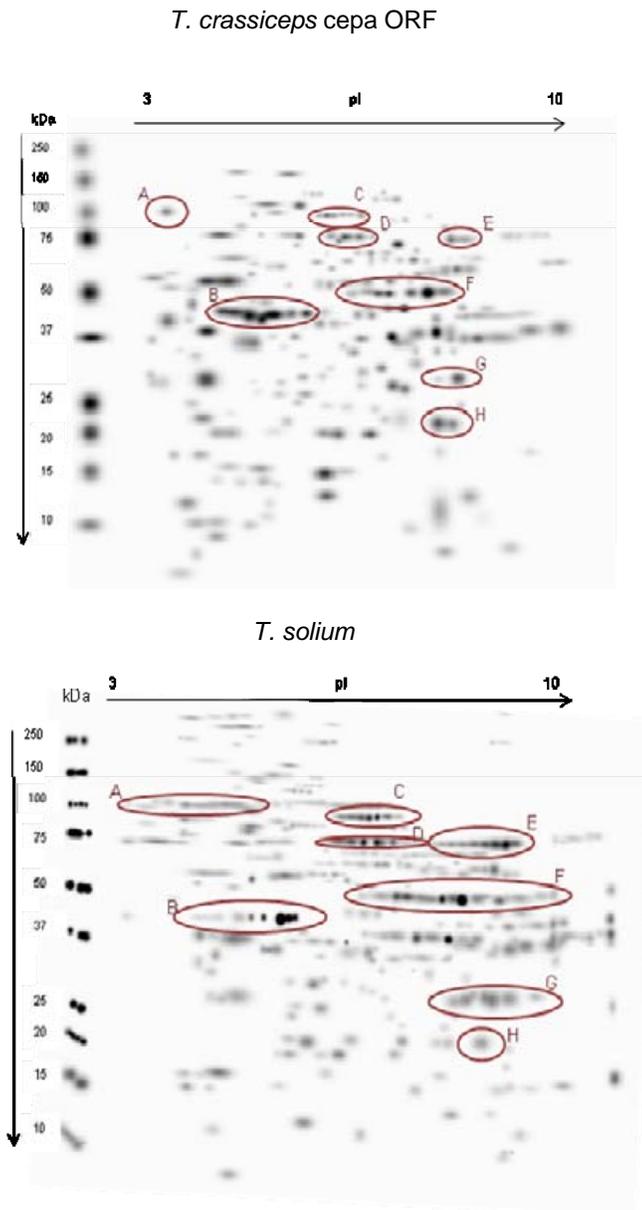


Figura 12. Presentación de 8 subconjuntos de proteínas en los mapas proteómicos maestros de las 2 especies estudiadas. Cada grupo incluyen proteínas con PM y pI's muy cercanos. Grupos del A al H.

Grupos A. La comparación de estos grupos mostró que las proteínas están localizadas en intervalos de PM entre 101.6 a 106.88 y de pl's de 3 a 4.9. Se observa que las proteínas expresadas en *T. solium* presenta un patrón de 9 proteínas contra solo una por *T. crassiceps* y esta parece tener una intensidad semejante a la mancha 9 de *T. solium*.

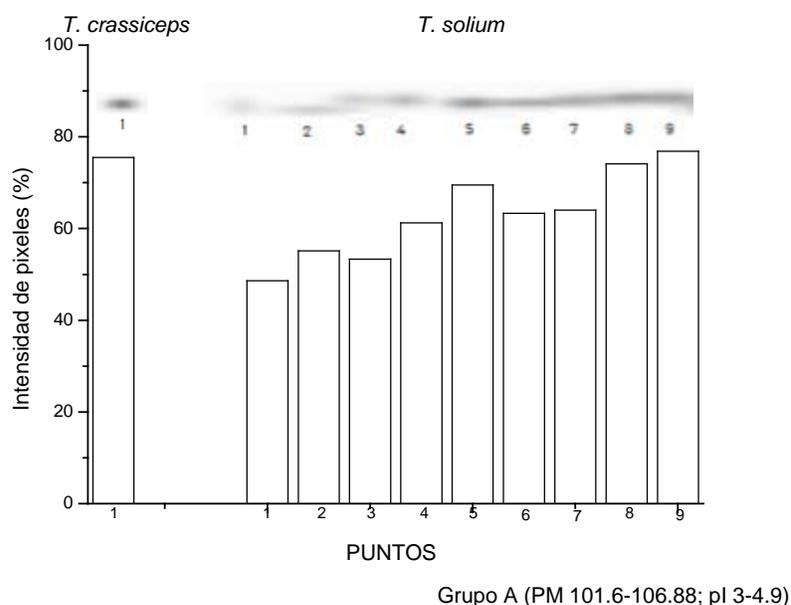
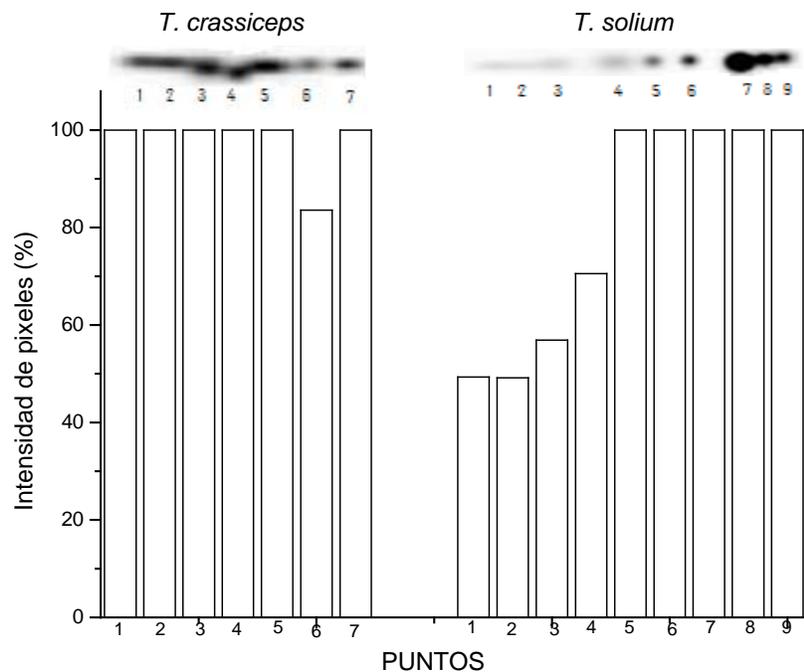


Figura 13. Proteínas de los grupos A de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en píxeles de las proteínas contenidas entre los PM de 101.6 a 106.88 y con un pl de 3 a 4.9. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos B. Se encontraron diferencias en el número de proteínas en ambos parásitos; mientras que en *T. crassiceps* se detectaron 7; en *T. solium*, 9. Según lo observado para *T. crassiceps*, casi todas las proteínas tienen una expresión alta, mientras que, para *T. solium*, cinco de las nueve proteínas con niveles elevados de expresión y con una buena resolución en el enfoque. Las 4 proteínas restantes presentaron una baja expresión en comparación con las anteriormente descritas.



Grupo B (PM 42-44; pl 4.1-5.5)

Figura 14. Proteínas de los grupos B de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 42 a 44 y con un pl de 4.1 a 5.5. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos C. Se encuentran localizados entre el intervalo de PM de 101–103.5 kDa y entre 5 – 5.8 de pH. Tanto para *T. crassiceps* como para *T. solium* aparentemente, hay un número semejante de estas proteínas con un alto nivel de expresión, aunque distinto para cada una de éstas proteínas; en *T. solium* las proteínas 4 y 5 tienen un más alto grado de expresión con respecto a todas las demás que se compararon.

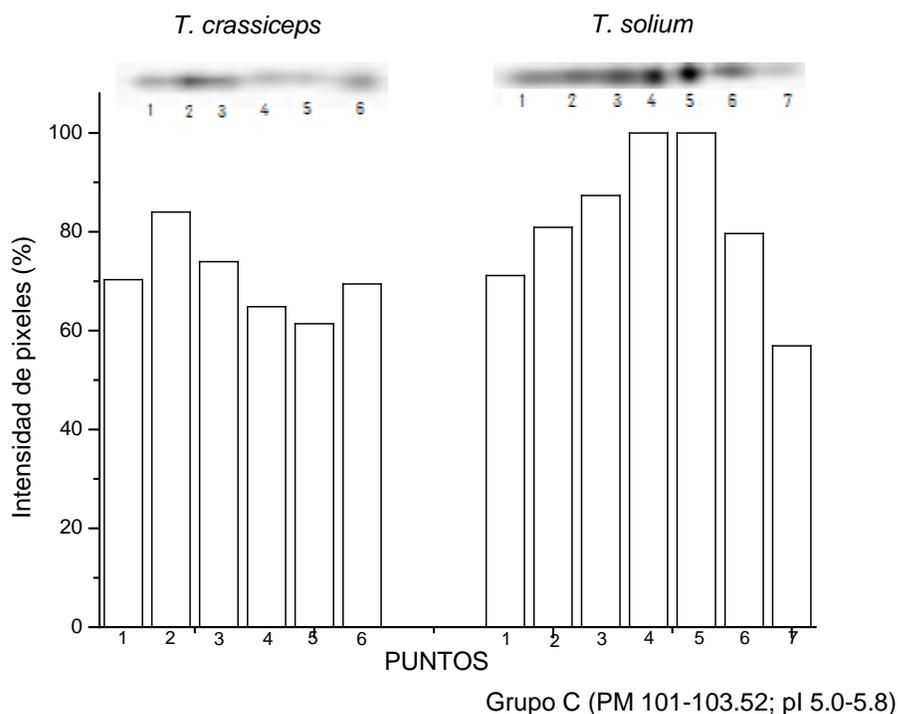


Figura 15. Proteínas de los grupos C de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 101 a 103.52 y con un pl de 5.0 a 5.8. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos D. Se encuentran localizados en el intervalo de PM de 81.9 a 83.5 y entre un pH de 5 a 5.8. En *T. crassiceps* se encontraron cinco proteínas con una intensidad de expresión semejante, que no se lograron enfocar de manera definida lo que sí se logró en las de *T. solium*. Se encontró que una de las proteínas (2) parece tener un menor PM. En el caso de *T. solium*, se encontraron siete puntos, de los cuales tres de ellos (3, 4 y 5) son los de mayor expresión.

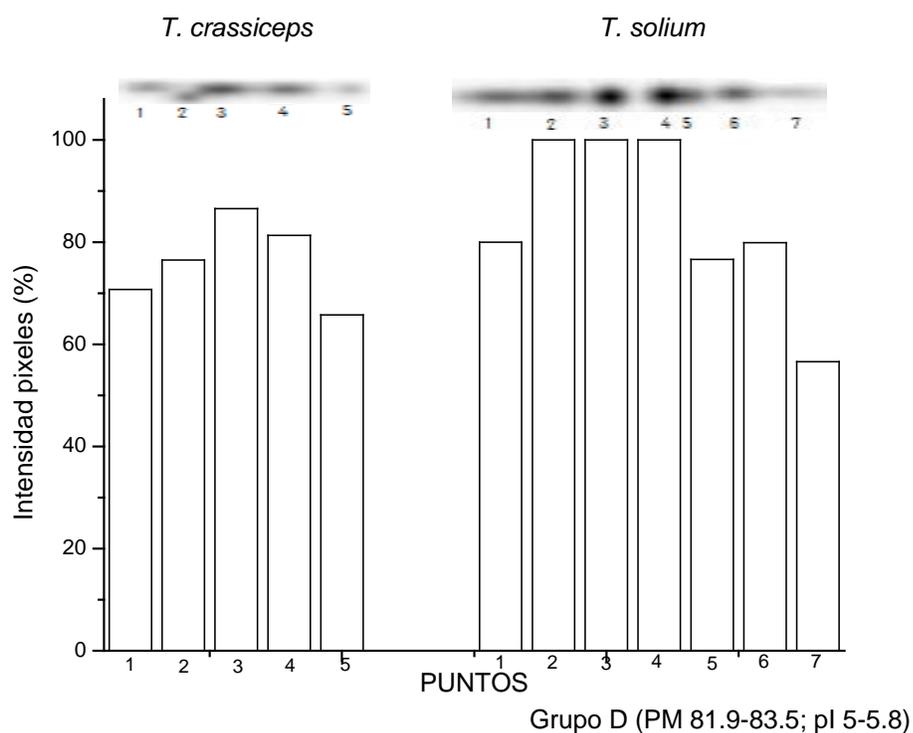


Figura 16. Proteínas de los grupos D de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 81.9 a 83.5 y con un pI de 5.0 a 5.8. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos E. Las proteínas se encuentran localizadas en el intervalo de PM de 83.7 a 86.9 y a un pH de 6 a 7.2. Mientras que para *T. crassiceps* sólo se encontraron dos proteínas, con enfoque pobre; para *T. solium* se encontraron ocho, de las cuales una (7) tiene una alta expresión y el enfoque y el nivel de expresión de las otras es mayor que lo encontrado para *T. crassiceps*.

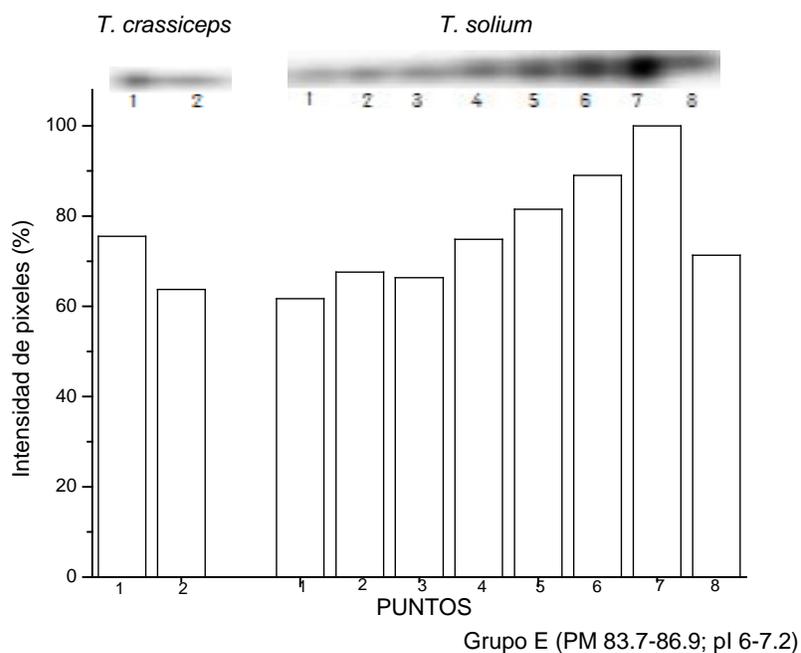


Figura 17. Proteínas de los grupos E de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 83.7 a 86.9 y con un pI de 6.0 a 7.2. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos F. Se localizan en el intervalo de PM de 52.3 a 56.3 y a un pH de 5.1 a 8.2. En *T. crassiceps* se expresan siete proteínas, de las cuales, dos están muy bien expresadas (4, 6); mientras que parece ser que el enfoque de las primeras cuatro muestra que tienen un pI muy cercano (1-4), las otras tres (5-7) lo presentan mas distante. Llama la atención que en *T. solium* se encontraron quince proteínas, de las cuales dos (6, 8) se encuentran muy altamente expresadas. Para las proteínas de ambos parásitos se encontró una buena resolución en el isoelectroenfoco.

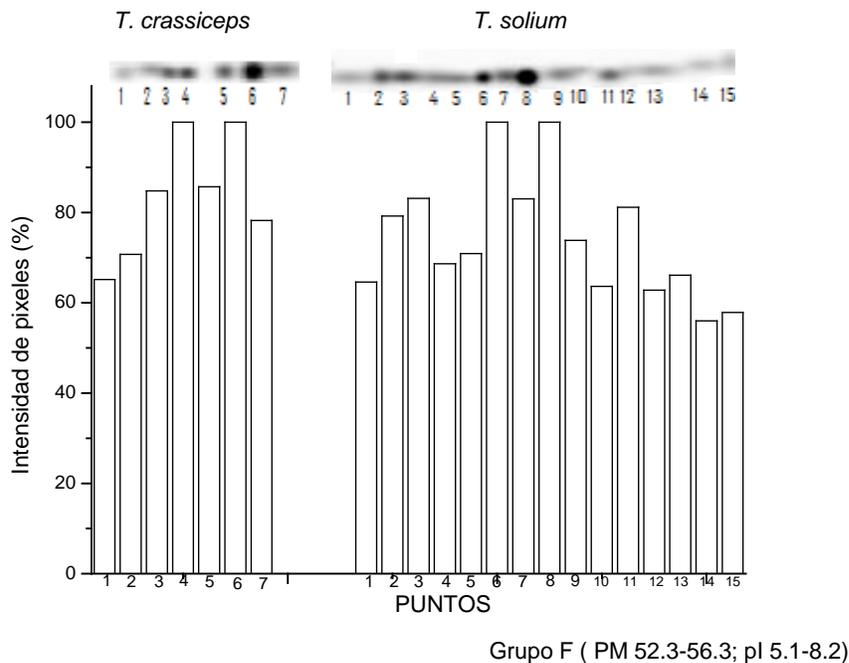


Figura 18. Proteínas de los grupos F de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 52.3 a 56.3 y con un pI de 5.1 a 8.2. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos G. Se encuentran localizados entre el intervalo de PM de 27.2 a 29 y de 6.1 a 7.8 de pH. Sólo se encontraron dos proteínas para *T. crassiceps* en esta zona. Para *T. solium*, se encontraron siete con un enfoque pobre.

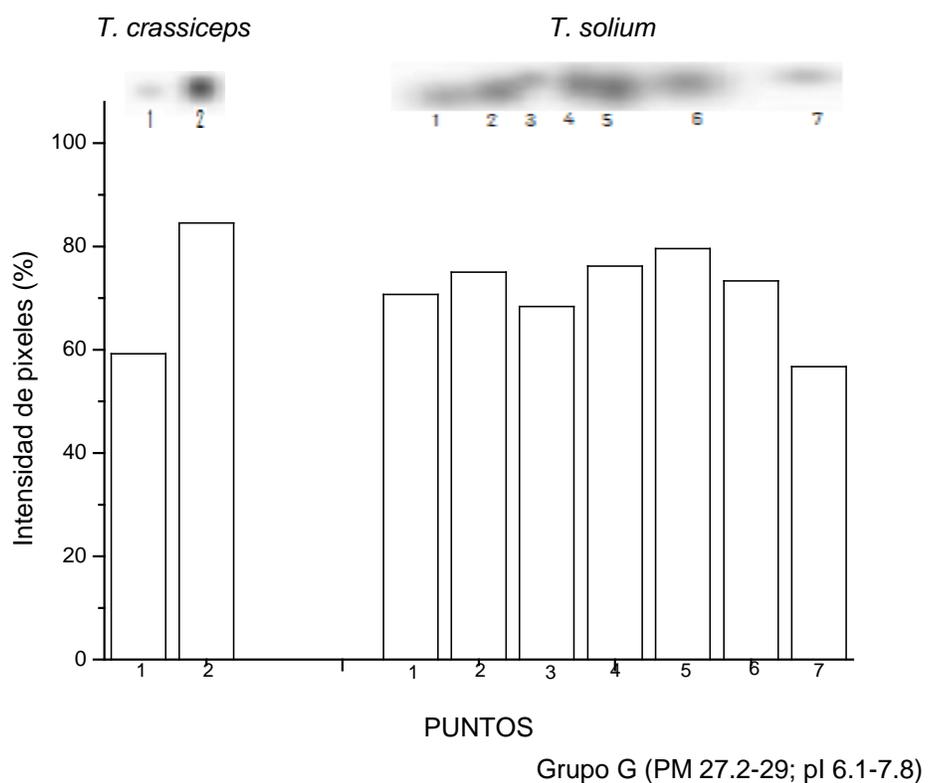


Figura 19. Proteínas de los grupos G de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 27.2 a 29.0 y con un pl de 6.1 a 7.8. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

Grupos H. Se localizan en el intervalo de PM de 21.2 a 21.5 y de 6.0 a 7.7 de pH. Sólo se encontraron dos proteínas en *T. crassiceps* que tuvieron una expresión baja pero bien enfocadas. Para *T. solium* sólo se encontró una bien enfocada.

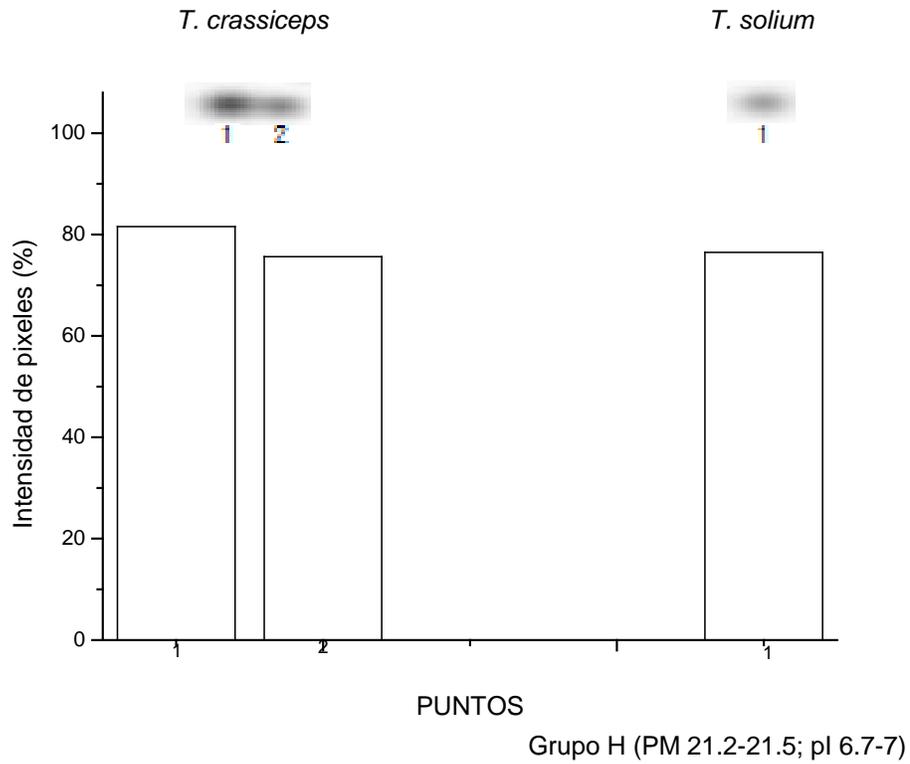


Figura 20. Proteínas de los grupos H de *T. crassiceps* y *T. solium*. Intensidad en pixeles de las proteínas contenidas entre los PM de 21.2 a 21.5 y con un pI de 6.7 a 7.7. Información obtenida por medio del paquete computacional PDQuest.

VI. Conclusiones

- Los resultados obtenidos en la electroforesis SDS-PAGE muestra que los extractos proteicos de ambas cepas se procesaron adecuadamente, ya que las bandas reveladas por Azul de Coomassie se distribuyeron a lo largo del carril sin presentar evidencias de degradación, con una adecuada concentración de sales (para estos estudios 5mM) sin la presencia de contaminantes que afectaran su corrimiento. En general las proteínas obtenidas tuvieron una buena resolución y se pueden analizar y contar sin problema alguno.
- La comparación de los geles obtenidos de las separaciones electroforéticas en una dimensión mostró por la distribución de las bandas resultantes que entre los parásitos hay semejanzas en la cantidad de proteínas, que algunas presentan pesos moleculares semejantes, pero que hay otras que presentan diferencias por su Rf, distribución, intensidad y nivel de expresión
- La combinación de las diferentes condiciones utilizadas para analizar las proteínas por IEE de ambas muestras fueron las adecuadas con respecto a la desnaturalización (urea, tiourea), solubilización (Chaps), reducción (DTT) e inhibición de proteasas endógenas, ya que se presentó tanto una eficiente separación por punto isoeléctrico como por PM evidenciada por el revelado de los mapas proteómicos con Sypro-Ruby.
- En los análisis de los mapas proteómicos obtenidos, para *T. crassiceps* se encontraron 216 proteínas totales, en su mayoría de naturaleza ácida ya que se localizaron en el intervalo de pI de 4 a 6 y en el PM localizó desde los 150 a los 25 kDa. En el mapa proteómico de *T. solium* se revelaron 348 proteínas, en su mayoría localizadas entre el intervalo de pI de 4 a 8 y entre los PM de los 250 a los 25 kDa. El análisis de los dos mapas por el software PDQuest permitió empalmar e identificar 87 proteínas expresadas únicamente en *T. crassiceps* y 166 en *T. solium*. Esto permite suponer que hay proteínas constitutivas del género *Taenia* que son expresadas por las dos especies y otras constitutivas y

específicas de la especie en sí, es conveniente hacer notar que a pesar de que en el análisis por 1D hay una banda de más en *T. crassiceps*, por IEE y 2D se encontraron 132 proteínas más en *T. solium* las cuales podrían corresponder principalmente a proteínas que constituyen el escólex del cisticerco, estructura ausente en *T. crassiceps* cepa ORF, lo cual indica que efectivamente este análisis presenta mucho mayor resolución para analizar una mezcla de proteínas.

- La separación eficiente de las proteínas en los mapas proteómicos permitió su análisis, agrupar a un conjunto de proteínas con base en su similitud de pI y de PM, por lo que se seleccionaron ocho grupos.
- Se han identificado ya en *T. solium* 7 isoformas de actina (Ambrosio *et al*, 2003) que corresponderían a 7 puntos que se ubican dentro de los grupos B a nivel de 43 kDa y se han identificado, aislado y secuenciado dos genes que codifican para actinas denominados PAT 5 y PAT 6 (Campos *et al*,1990). El análisis comparativo de las bases de estos genes muestra alta homología con algunos de los reportados para *Diphyllobotrium dendriticum*, por lo que podrían tener funciones similares y en este parásito se sabe que hay 6 genes diferentes coexpresados al mismo tiempo en células de diferentes regiones del parásito.
- La actina codificada sufre además, modificaciones postraduccionales principalmente por acetilación del residuo amino terminal y/o mutación de una de sus histidinas, lo cual explica la presencia de varias isoformas.
- En los grupos C se cree que esté la paramiosina que ha sido secuenciada y reportada en cestodos (Laclette *et al* 1995, 1991) y sus características la ubican en este grupo.
- Con respecto a las miosinas, proteínas de alto peso molecular detectadas por análisis de electroforesis en geles de 1D (González-Malerva, 2005) se encontraron tres isoformas en cisticercos. El análisis de electroforesis en 1D realizado por Gonzalez-Malerva demostró que hay tres isoformas de miosina tipo II en cisticercos y que puede

corresponder a las bandas de alto peso molecular detectadas en este estudio en la sección correspondiente a electroforesis SDS-PAGE.

- Con base a la calidad de los mapas proteómicos obtenidos se lograron efectuar análisis de tipo cualitativo y cuantitativo de las proteínas de los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF y de *T. solium*.
- La ubicación y las características de pI de algunas de las proteínas detectadas en los mapas proteómicos parece permitir su identificación; sin embargo, se necesitan evaluaciones adicionales como análisis inmunoproteómicos (para identificarlas por el reconocimiento con anticuerpos) o bien mediante análisis por espectrometría de masas.

VII. PERSPECTIVAS

Debido a que no fue posible identificar a las proteínas de los mapas proteómicos, es necesario llevar a cabo análisis que permitan su identificación como se ha indicado anteriormente; sin embargo, la identificación dependerá del conocimiento que se tenga del genoma de estos parásitos. De la misma manera, debido a que en algunas zonas de los mapas proteómicos obtenidos no hubo una adecuada resolución, es necesario efectuar otros nuevos ensayos donde se emplearan tiras para isoelectroenfoque con intervalos de pI distintos a los empleados en el presente trabajo de investigación. En aquellos casos en que la resolución de las manchas de proteínas no fue eficiente, cabría la posibilidad de que se mejorara su separación mediante la utilización de tiras de isoelectroenfoque de mayor longitud (18 cm) bajo estas mismas condiciones de separación. Sería interesante, dado que ya se estandarizó el proceso de obtención de las proteínas y sus mapas proteómicos, así como la posibilidad de identificar a las proteínas, el evaluar que efecto producen en la expresión de tales proteínas cuando los parásitos se incuban en presencia de sustancias con potencial antihelmíntico.

VIII. REFERENCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) The cytoskeleton: Molecular Motors. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York. 949-53.

Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez H, Correa-Piña D, Gonzalez-Malerva L, Cruz-Rivera M, Flisser A. (2003) Actin expresión in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. Cell Biology International 27(9) 727-733.

Ambrosio JR, Cruz-Rivera M, Allan J, Moran E, Ersfeld K, Flisser A. (1997) Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. Parasitology 114:545-553.

Ambrosio JR, Landa A, Merchant M, Laclette JP. (1994) Protein Uptake by custicerci of *Taenia crassiceps*. Archives of Medical Research 25:325-330.

Babu G, Warshaw D, Periasamy M. (2000) Smooth muscle myosin heavy chain isoformas and their role in muscle physiology. Microscopy Research and Technique 50:532-540.

Brett D, Pospisil H, Valcárcel J, Reich J, Bork P. (2002) Alternative splicing and genome complexity. Nature Genetics 30:29-30.

Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gómez E, Hernández R, Willms K y Laclette J P (1990) Cloning and sequencing of two genes from *Taenia solium* (Cestoda). Mol Biochem Parasitol 40: 87-94.

Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goñi F, Berasain P. (2004) Purification, characterization and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. Parasitology Research 92: 441-448.

Cruz-Rivera M, Reyes-Torres A, Reynoso-Ducoing O, Flisser A, Ambrosio JR. (2006) Comparason of biochemical and immunochemical properties of myosin II in taeniid parasites. Cell Biology International 30: 598-602.

REFERENCIAS

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. (1990) *Molecular Cell Biology*. 2nd edition. Scientific American Books. 815-899 USA.

Drew J, Murphy R. (1997) Actin isoform expression, cellular heterogeneity and contractile function in smooth muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75: 869-877.

Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F. *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York USA. 307-361.

Flisser A, Madrazo I, Delgado H. (1997) *Cisticercosis Humana*. Facultad de Medicina UNAM y Ed. El Manual Moderno, S.A de C.V. pp192 México.

Freeman R. (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*. Volume 40 969-990.

Garcia D (2007) Determinación del potencial antihelmíntico de derivados del Bencimidazol en cisticercos de *Taenia crassiceps* Cepa ORF. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM.

González-Malerva L (1998) Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales producidos contra parásitos adultos de *T. solium*, hacia diferentes miosinas. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Gonzalez-Malerva L, Cruz-Rivera M, Reynoso-Ducoing O, Retamal C, Flisser A, Ambrosio JR. (2005) Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda) *Cell Biology International* 28: 885-894.

Hesketh J, Pryme I. (1995) *The Cytoskeleton. Structure and Assembly*. Vol 1. Edit. Jai Press Inc.

Hoberg E, (2002) *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection* 4:859-866.

Howard Jonathon. (2004) *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.

REFERENCIAS

- Karp G. *Biología Celular y Molecular, conceptos y experimentos* (2005) 4ª edición. Edit. Mc GrawHill. México. 357-417.
- Laclette JP, Skelly PJ, Merchant M and Shoemaker CB. (1995) Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in Platyhelminth Parasites. *Experimental Parasitology* 81:140-143
- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis A, Shoemaker CB. (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda) *Molecular and Biochemical Parasitology* 44: 287-296.
- Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. (1993) cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Molecular and Biochemical Parasitology* 60: 343-347
- Lehninger A, *Bioquímica*. (1990) 2ª edición. Ediciones Omega 757-785 España.
- Paredes-Salomon C. (2008) Caracterización Inmunoquímica de tubulina alfa en cisticercos de *Taenia crassiceps* Cepa ORF. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM.
- Romero-Aceff Y, (2009) Identificación y comparación de isoformas de tubulina de cisticercos en dos cepas de *Taenia crassiceps*. Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Schmidt J, Bodor O, Gohr L, Kunz W. (1996) Paramyosin isoforms of *Schistosoma mansoni* are phosphorylated and localized in a large variety of muscle types. *Parasitology* 112: 459-467.
- Twyman RM. (2004) *Principles of Proteomics*. Department of Biological Sciences. Bios Scientific Publishers. UK. 241pp.
- Villanueva M, Campos F, Diaz C, Dolmenero-Flores J, Dantán E, Sánchez F, Covarrubias A. (1999) Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris*. *L. Planta* 207:582-589.