



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EFFECTO DEL ESTRADIOL, PROGESTERONA, TESTOSTERONA Y
DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL
CITOESQUELETO DE
Taenia crassiceps:
ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MICROSCÓPICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
NANCY MARTÍNEZ VELÁZQUEZ**

**ASESOR:
DR. JORGE MORALES MONTOR**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto del Estradiol, Progesterona, Testosterona y Dihidrotestosterona, sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: análisis proteómico y microscópico.

Que presenta la pasante: Nancy Martínez Velázquez

Con número de cuenta: 302309865 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández	
SECRETARIO	Dr. Jorge Morales Montor	
1er. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do. SUPLENTE	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

DEDICATORIAS

Dedico la presente tesis a los seres que más amo en este mundo: Mi familia que son mis padres Alma y Javier, mi hermano Henrucho, mi Gabrielito lindo, mi nene Cristian Ángel, a mi cuñada Lilibeth y al nuevo bebé que ha venido a este mundo, por ser parte de la motivación que ha hecho superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

A mis padres queridos: Alma Delia y Javier que a pesar de la distancia que algunas veces se presentó y a pesar de los momentos difíciles que pasamos juntos seguían enseñándome a encarar las adversidades. Les agradezco infinitamente que me hayan dado la vida, pues sin ella jamás habría logrado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y empeño. Gracias por cada palabra de aliento cuando veían debilitarme, por luchar por mí, por cuidarme cuando era bebe, niña o cuando enfermaba, por enseñarme a caminar a hablar, la sencillez, el respeto, el amor, en fin por hacerme feliz, mil gracias, los Amo.

A mi único hermanito: Henry, sabes que eres muy importante para mí pues Tú fuiste el único que estuvo en mi niñez, quien me protegió, quien me cuidó, quien se ponía a jugar conmigo, quien hasta me peinaba porque a esa edad yo no sabía. Gracias por tu gran amor, por tus consejos de hermano mayor, por orientarme, por darme un gran ejemplo a seguir a pesar de las circunstancias, pues yo se por todo lo que haz pasado y a pesar de todo sigues luchando, como un gran guerrero que eres, sabes que siempre me tendrás aquí y siempre te protegeré así como tu lo hiciste cuando yo era una niña. Gracias pues por ti pude tener algo de comer, pude ir a la escuela, pude jugar con alguien y sobre todo porque me protegiste de personas malas. De todo corazón mil gracias por todo hermanito. Sigue hacia adelante, Te Amo.

A mi gran amigo, confidente y amor: Mi BBSHITO Gabrielito por aparecer en mi vida, por confiar en mí, en lo que soy como mujer y en el gran amor que siento. Gracias por nunca soltarme de la mano, por seguir luchando a mi lado a pesar las experiencias duras que hemos pasado, por todo este tiempo juntos, por compartir parte de tu vida conmigo, por esas alegrías, por los momentos inolvidables que siempre llevaré en mi corazón, por esos detalles tan hermosos que tienes, por tu ternura, tu sencillez y fuerza. Gracias por cuidarme y ayudarme incondicionalmente cuando más lo necesito. Eres el Amor de mi Vida y en esta dedicatoria solo puedo decirte Gracias por tu paciencia, tu comprensión, tu infinito amor, por ser tal y como eres, sigue hacia adelante porque Tú también eres un guerrero y un ejemplo a seguir para mí, pues tú también sabes lo que es lograr las cosas sólo sin ayuda de nadie. Nunca te Rindas, Te Amo Pincipesito.



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

Gracias a mis sobrinitos hermosos por su inocencia, su gran fuerza y energía que me transmiten a pesar de su corta edad, por ser un motivo para mí al ver las ganas que tienen de crecer y conocer el mundo para llegar lejos. Por hacerme sonreír y recordar a mi niña interior que jugaba sin temor alguno. Gracias por energía, esa ternura y ese amor que tanto los caracteriza, son unos campeones, triunfadores y llegarán muy lejos, los Amo niñitos bonitos.

Gracias a mis abuelitos que a pesar de que algunos ya no estén en este mundo, se que aun siguen a mi lado y en mi corazón, se que a donde quiera que vaya estarán conmigo, pues nunca olvidaré sus palabras y su gran experiencia de abuelos.

“NUNCA PERMITAS QUE ALGUIEN TE DIGA QUE NO PUEDES HACERLO”

“NO TENGAS MIEDO DE PENSAR EN GRANDE”

“CONFIA EN TI, TÚ PUEDES LOGRARLO TODO”

“EXAGERADAMENTE FELIZ”

“JUNTOS VENCEREMOS CUALQUIER OBSTÁCULO, SIGAMOS ADELANTE”

CON AMOR NANCY



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la Universidad Autónoma de México por abrimme las puertas de sus aulas, sus instalaciones, sus laboratorios, sus bibliotecas y proporcionarme su gran riqueza en educación y enseñanza, a todos los profesores que ayudaron a formarme como Q.F.B. y persona, gracias por sus grandes conocimientos que lograron hacer de mí una buena estudiante.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por abrimme sus puertas, por permitirme utilizar sus instalaciones y equipos, en especial al Dr. Jorge Morales Montor por confiar en mí y haberme iniciado en este hermoso mundo de la investigación. Por abrimme las puertas de su laboratorio y conocer a su gran equipo de trabajo, por ayudarme a lograr uno de mis objetivos, por animarme y ser un ejemplo a seguir, Gracias por sus consejos, su amistad, sus conocimientos, su gran experiencia y apoyo que lograron apasionarme más del mundo de la ciencia.

Gracias compañeros del laboratorio del Dr. Jorge Morales, por su gran amistad y compañía, por permitirme crecer a su lado como estudiante, por toda esa alegría, sus consejos, por compartir conmigo sus grandes conocimientos y confiar en mí como buena persona y amiga. Gracias Elizabeth, Lorena, Nelly, Itztli, Rosalía, Karencita, Dra. Karen Nava, Dra. Saé, Yolanda, Angélica, Ana Gaby, Dr. Romel, Christian, Ricardo, Paul, por su gran amistad y compañía.

A la Facultad de Medicina, en especial al laboratorio del Dr. Javier Ambrosio por abrimme también las puertas de su laboratorio, permitirme utilizar sus instalaciones y maravillosos equipos, por sus grandes enseñanzas y confiar en la capacidad que hay en mí. Gracias por sus consejos su gran experiencia, su amistad, sus conocimientos y permitirme conocer a su gran equipo de trabajo. Gracias por su apoyo y permitirme realizar la mayoría de la investigación de esta tesis en su laboratorio.

Gracias compañeros del laboratorio del Dr. Javier Ambrosio, por su amistad y por tratarme como una integrante más del laboratorio, gracias por permitirme conocerlos aún más y poder aprender de ustedes. Por sus consejos y su alegría, por compartir conmigo sus grandes conocimientos y confiar en mí como una buena persona y amiga. Gracias Olivia, Laurita, Margarita, Xóchitl, Mónica, Lorena, Candelaria, Rita, Carlos, Adrián, Alejandro, gracias por su amistad y permitirme trabajar a su lado.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

A la técnico académico del Dr. Jorge Morales Montor, la bióloga Lorena López Griego por asesorarme en las técnicas y procedimientos para realizar esta tesis, por sus enormes conocimientos, por el apoyo técnico y académico que me ha brindado desde mi llegada al laboratorio. Gracias por tu gran amistad y consejos, que hicieron de mi una mejor estudiante y persona.

A la bióloga Olivia Reynoso Ducoing por su gran paciencia durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Javier Ambrosio, al momento de asesorarme y apoyarme en las técnicas y procedimientos para la realización de esta tesis, por tus consejos, por compartir tus conocimientos y años de experiencia conmigo, por el apoyo técnico y académico que hicieron de mí una mejor estudiante y persona, gracias por confiar en la capacidad que hay en mi, por su amistad y comprensión.

SIEMPRE ESTARÉ MUY AGRADECIDA CON CADA UNO DE USTEDES, POR AYUDARME A CRECER PROFESIONAL Y PERSONALMENTE.



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

ÍNDICE

1. Índice de figuras.....11

2. Índice de tablas.....14

3. Resumen.....16

4. Antecedentes.....17

 4.1 Descripción y clasificación de helmintos y cestodos.....17

 4.2 *Taenia crassiceps*: Estrategia experimental alternativa..... 19

 4.2.1 *Taenia crassiceps*: Descripción y ciclo de vida... ..20

 4.3 Hormonas esteroides: Descripción e importancia..... 23

 4.3.1 Hormonas esteroides: Efectos sobre infecciones parasitarias.....26

 4.3.2 Hormonas esteroides: Efecto sobre la infección causada por *T. crassiceps*...28

 4.4 El citoesqueleto: Descripción y función.....29

 4.5 Células flama: Descripción y función.....33

 4.6 Métodos para el análisis de proteínas.....34

 4.6.1 Técnicas electroforéticas.....35

 4.6.1.1 Electroforesis SDS-PAGE en una dimensión.....37

 4.6.1.2 Isoelectroenfoque (IEF).....39

 4.6.1.3 Electroforesis en doble dimensión (Proteómica).....40

 4.6.2 Técnicas inmunoquímicas..... 42

 4.6.2.1 Inmunofluorescencia..... 43

 4.6.2.2 Citometría de flujo..... 45



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

5. Justificación.....	48
6. Hipótesis.....	49
7. Objetivos.....	50
7.1 Objetivo general.....	50
7.2 Objetivos particulares.....	50
8. Material y métodos.....	51
8.1 Diagrama general del método.....	51
8.2 Preparación de medio DMEM suplementado.....	52
8.3 Preparación de hormonas esteroideas (soluciones stock).....	52
8.4 Obtención de parásitos.....	52
8.5 Cultivo de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	53
8.6 Extracción de proteínas.....	53
8.7 Precipitación de proteínas.....	54
8.8 Cuantificación de proteínas.....	54
8.9 Electroforesis en una dimensión.....	55
8.9.1 Preparación de gel de poliacrilamida.....	55
8.9.2 Reducción de proteínas.....	57
8.9.3 Separación electroforética en una dimensión.....	57
8.9.4 Tinción con azul de Coomassie.....	58
8.9.5 Captura y análisis de imágenes.....	58



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

8.10 Electroforesis en doble dimensión.....	58
8.10.1 Reducción de proteínas.....	59
8.10.2 Hidratación de tiras.....	60
8.10.3 Isoelectroenfoque (Separación por pI).....	60
8.10.4 Rehidratación de tiras.....	61
8.10.5 Separación electroforética por peso molecular (doble dimensión).....	61
8.10.6 Tinción con azul de Coomassie.....	62
8.10.7 Captura de imágenes (Quantity one).....	62
8.10.8 Análisis de imágenes (PD Quest).....	62
8.11 Citometría de flujo.....	62
8.11.1 Obtención de parásitos.....	62
8.11.2 Cultivo de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	62
8.11.3 Extracción de células.....	63
8.11.4 Tinción con anticuerpo primario.....	63
8.11.5 Tinción con anticuerpo secundario.....	63
8.11.6 Análisis con citómetro de flujo.....	63
8.12 Microscopía confocal.....	64
8.12.1 Obtención de parásitos.....	64
8.12.2 Cultivo de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	64
8.12.3 Obtención y fijación de tejidos.....	65



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

8.12.4 Unión de anticuerpos.....	65
8.12.5 Detección de la reacción mediante microscopía confocal.....	66
9. Resultados.....	66
9.1 Cuantificación de proteínas.....	66
9.2 Separación electroforética en una dimensión.....	67
9.3 Electroforesis en doble dimensión.....	74
9.4 Citometría de flujo.....	82
9.5 Microscopía confocal.....	85
10. Discusión.....	90
11. Conclusiones.....	103
12. Perspectivas.....	104
13. Referencias.....	105
14. Anexos.....	114



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1. Descripción y clasificación de helmintos y cestodos..... 18

Figura No. 2 Cisticercos de *Taenia crassiceps*.....21

Figura No. 3 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.....22

Figura No. 4 Estructura química de las hormonas esteroides.....23

Figura No. 5 Síntesis y metabolismo de las hormonas esteroides..... 24

Figura No. 6 Estructura de algunas hormonas sexuales.....26

Figura No. 7 Electroforesis en gel SDS PAGE.....38

Figura No. 8 Principio del isoelectroenfoque.....39

Figura No. 9 Corrimiento electroforético en una dimensión.....42

Figura No. 10 Inmunofluorescencia directa e indirecta.....44

Figura No. 11 Corrimiento electroforético en una dimensión de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroides.....67

Figura No. 12 Cambios en el número de bandas del corrimiento electroforético en una dimensión.....68

Figura No. 13 Análisis densitométrico de proteínas control y proteínas tratadas con estradiol.....69



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 14 Análisis densitométrico de proteínas control y proteínas tratadas con progesterona.....70

Figura No. 15 Análisis densitométrico de proteínas control y proteínas tratadas con dihidrotestosterona.....71

Figura No. 16 Análisis densitométrico de proteínas control y proteínas tratadas con testosterona.....72

Figura No. 17 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas.....74

Figura No. 18 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Geles control.....75

Figura No. 19 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Tratamiento estradiol.....75

Figura No. 20 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Tratamiento progesterona.....76

Figura No. 21 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Geles control de etanol.....76

Figura No. 22 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Tratamiento dihidrotestosterona.....77

Figura No. 23 Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Tratamiento testosterona.....77

Figura No. 24 Secuencia de proteínas analizadas mediante programa PDQuest.....78



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 25 Expresión de actina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con estradiol y progesterona.....82

Figura No. 26 Expresión de actina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con testosterona y dihidrotestosterona.....82

Figura No. 27 Expresión de tubulina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con estradiol y progesterona.....83

Figura No. 28 Expresión de tubulina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con testosterona y dihidrotestosterona.....83

Figura No. 29 Expresión de miosina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con estradiol y progesterona.....84

Figura No. 30 Expresión de miosina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con testosterona y dihidrotestosterona.....84

Figura No. 31 Expresión de actina y tubulina de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con estradiol y progesterona, 200 μm85

Figura No. 32 Expresión de actina y tubulina de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con estradiol y progesterona, 10 μm 86

Figura No. 33 Expresión de actina y tubulina de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con testosterona y dihidrotestosterona, 200 μm87

Figura No. 34 Expresión de actina y tubulina de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con testosterona y dihidrotestosterona, 10 μm 88

Figura No. 35 Células flama de cisticercos tratados con hormonas sexuales.....89



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Ejemplos de filamentos intermedios.....	31
Tabla No. 2 Concentración y dosis de hormonas para el cultivo de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	52
Tabla No. 3 Curva patrón para la cuantificación de proteínas.....	55
Tabla No. 4 Preparación de geles de poliacrilamida.....	56
Tabla No. 5 Distribución de muestras en el gel para electroforesis en una dimensión.....	58
Tabla No. 6 Cantidad necesaria de reactivos para reducir 600 µg de proteína.....	59
Tabla No. 7 Concentración final de los sistemas de la curva patrón.....	66
Tabla No. 8 Concentración final de las muestras (proteínas).....	67
Tabla No. 9 Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con estradiol.....	73
Tabla No. 10 Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con progesterona.....	73
Tabla No. 11 Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con dihidrotestosterona.....	73



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Tabla No. 12 Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con testosterona.....74

Tabla No. 13 Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto del estradiol con respecto al control.....79

Tabla No. 14 Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto de la progesterona con respecto al control.....79

Tabla No. 15 Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto de la dihidrotestosterona con respecto al control de etanol.....80

Tabla No. 16 Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto de la testosterona con respecto al control de etanol.....80

Tabla No. 17 Diferencias en la intensidad de proteínas entre el control y control de etanol.....81

Tabla No. 18 Peso molecular y punto isoelectrico de las proteínas que presentaron cambios en la intensidad.....81



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

3. RESÚMEN

En el transcurso de la evolución de las especies, los parásitos han sufrido transformaciones morfológicas y fisiológicas, que les han permitido adaptarse al ambiente y a su vida parasitaria. Como resultado de la evolución de los parásitos, se han generado enfermedades cada vez más resistentes y peligrosas.

El desarrollo y crecimiento de un parásito se ve favorecido por los requerimientos nutritivos presentes en el ambiente, sin embargo, estos factores pueden verse afectados por la presencia de ciertas sustancias, como lo es el caso de las hormonas, las cuales juegan un papel importante en el mantenimiento de infecciones (las favorecen, o bien las inhiben).

Una de las enfermedades causadas por parásitos y que es afectada por la presencia de hormonas, es la cisticercosis, enfermedad producida por la fase larvaria de cestodos pertenecientes a la familia *Taeniidae*, que afecta a muchos hospederos, incluyendo humanos. Es un problema grave de salud pública en México, América Central, América del Sur, India, África Subsahariana y es endémica en muchos países asiáticos.

Para la realización de esta tesis, se optó por utilizar una estrategia experimental alternativa, para el estudio de la cisticercosis, a través del modelo murino: ratones hembra de la cepa BALB/CAnN fueron inoculados por vía intraperitoneal, con cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF-WFV.

Se evaluó el efecto causado por hormonas sexuales (estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona), sobre proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* cultivados *in vitro*. Por electroforesis en 1D, se demostró que los esteroides sexuales afectan de manera directa al parásito, pues al realizar un análisis densitométrico de las proteínas, se observó que algunas de ellas presentan una disminución o bien, un aumento en su expresión, respecto al control. Al realizar la cuantificación y análisis estadístico de las proteínas corridas en 2D, se evidenciaron cambios significativos en la expresión de las mismas, además de observarse dichos cambios a la altura del PM y pI de proteínas que son constitutivas del citoesqueleto.

La citometría de flujo mostró que algunas células del parásito, aumentan la expresión de actina, tubulina y miosina por efecto del tratamiento con progesterona. Así también, se analizó el efecto de las hormonas sexuales sobre la organización y formación de células flama presentes en cisticercos de *T. crassiceps*, dichas células, son de suma importancia, para el desecho de sustancias tóxicas que pudieran perjudicar al parásito. Los resultados obtenidos por microscopía confocal mostraron que los andrógenos T_4 y DHT inhiben la formación de células flama, además de desorganizar su estructura, mientras que los estrógenos E_2 y P_4 favorecen la formación de dichas células.

El efecto directo que causaron las hormonas sexuales mencionadas sobre las proteínas de cisticercos de *T. crassiceps*, fue de suma importancia para nosotros, ya que gracias a ello, pudimos conocer más a fondo la fisiología y proteoma de este parásito, además, con los futuros experimentos que se sigan realizando, se podrá dar pauta al diseño de nuevos análogos de hormonas que afecten solo al parásito y no al hospedero.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4. ANTECEDENTES

4.1 Descripción y clasificación de helmintos y cestodos.

Los helmintos son gusanos de cuerpo alargado, de simetría bilateral y órganos definidos, no presentan extremidades, pero si una reproducción sexual durante la fase adulta, además de un tamaño muy variable que puede ir desde unos milímetros hasta varios metros. La palabra helminto proviene del griego, que significa gusano y comprende a gusanos parásitos que infectan al hombre, animales y plantas (Gallego, 2007).

Los helmintos se dividen en dos grandes grupos: los platelmintos o helmintos planos y los nematelmintos o helmintos redondos. En cuanto a los platelmintos, sabemos que éstos son gusanos hermafroditas y presentan una morfología aplanada dorso ventralmente, además de órganos de fijación en forma de ventosas o ganchos (Gallego, 2007).

Algunos de estos parásitos pueden presentar tubo digestivo (ciego), el cual se comunica con el exterior por un orificio único que funciona como ano y boca, sin embargo, cuando carecen del mismo, el tegumento funciona como única superficie absorbente de nutrientes (Gallego, 2007).

Presentan un rudimentario sistema excretor, donde sus elementos funcionales básicos son los selenocitos, o células flamígeras y un sistema nervioso formado por dos masas ganglionares cerebroides, unidas por comisuras transversas supra esofágicas. (Gallego, 2007).

Se reproducen sexualmente, formando huevos fértiles, que dan lugar a larvas de diversa morfología y tamaño variable, algunas de las cuales, pueden dar a varios estadios muy bien diferenciados entre sí, en uno o varios hospederos intermediarios para posteriormente formarse en adultos (Gallego, 2007).

Además, este tipo de parásitos, pueden ser de vida libre o parasitaria y su localización, comprende el área de la luz del tubo digestivo (formas adultas), o bien, en varios órganos profundos (adultos o formas larvarias) (Gallego, 2007).

Dentro del grupo de los platelmintos, se encuentran los trematodos y los cestodos. Estos últimos, son parásitos carentes de tubo digestivo y presentan un cuerpo muy peculiar, en el extremo anterior, hay una estructura que no es plana llamada escólex y en la mayor parte de los cestodos es de tipo cuboide. Después del escólex o cabeza, viene una porción muy pequeña que todavía no está bien segmentada denominada cuello, posterior a éste, comienzan los segmentos, haciendo una cadena llamada cadena estrobilar o estróbilo, el cual está formado por varios segmentos llamados proglótidos (Romero, 2007).

Los proglótidos van cambiando conforme se van alejando del escólex, varían en tamaño haciéndose más grandes y difieren en las estructuras que contienen. En función de esto, los proglótidos se dividen en tres tipos: inmaduros, maduros y grávidos (Romero, 2007).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

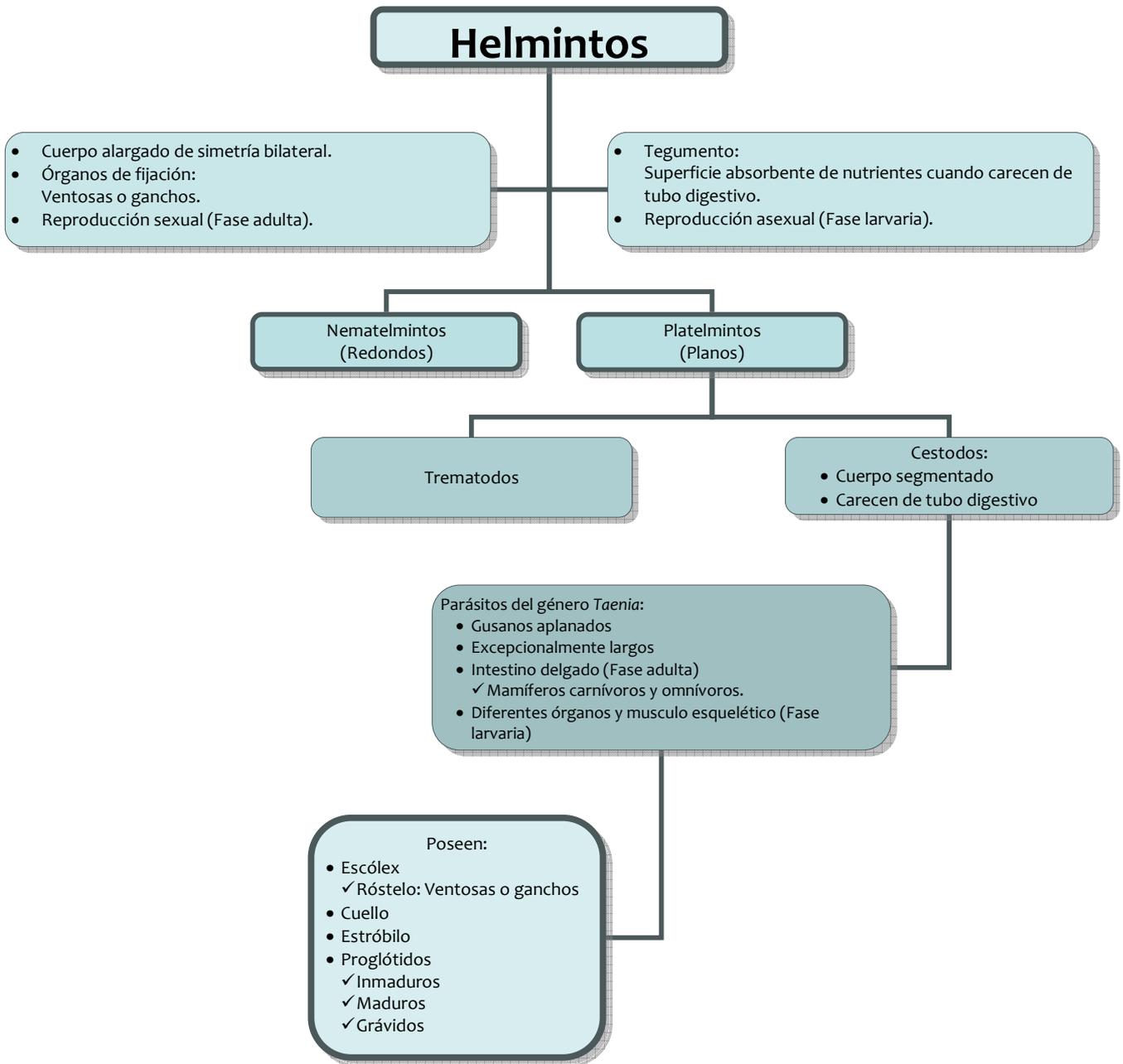


Figura 1. Descripción y clasificación de helmintos y cestodos (Gallego, 2007; Romero, 2007).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.2 *Taenia crassiceps*: Estrategia experimental alternativa.

La cisticercosis, es una enfermedad parasitaria causada por el platelminto *Taenia solium*, el cual infecta a cerdos (hospedero intermediario) y a llevado a tener grandes pérdidas económicas y la transmisión a humanos (Larralde y col. 1990).

Es un problema de salud pública, que prevalece tanto en áreas urbanas como rurales, se encuentra distribuida en África, Asia y Latinoamérica. México y Brasil son los países que presentan las frecuencias más altas (Flisser, 1994).

La neurocisticercosis (NCC), enfermedad causada por la infestación larvaria de *T. solium* en el sistema nervioso central (SNC), afecta a millones de personas en el mundo, ocasionando desordenes cerebrales (White y col. 1997).

Debido a el alto costo y complicada investigación de estas enfermedades (Cisticercosis y NCC), *T. crassiceps*, se ha convertido en una estrategia experimental alternativa para el estudio de la cisticercosis experimental, mediante el modelo murino, esto gracias a que comparte características similares con *T. solium*, por ejemplo, presentan similar composición antigénica, anatomía, morfología, ciclo de vida, relación hospedero-parásito y respuesta inmune (Larralde y col. 1990; Toledo y col. 2001; Morales y col. 2004).

Además, *T. crassiceps* ofrece varias ventajas, como lo es su fácil manejo en el laboratorio, su rápida reproducción (asexual), por lo que la recuperación de parásitos alta, se puede mantener *in vitro* bajo condiciones mínimas o especiales, además de que se asemeja a la enfermedad natural (Sciutto y col. 1991; Larralde y col. 1990).

La cisticercosis experimental murina, es causada por la inoculación intraperitoneal del metacéstodo de *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962; Smith y col. 1972; Dorais y col. 1969) y es caracterizada, por la rápida reproducción asexual de los parásitos en el hospedero (Larralde y col. 1995).

Presenta un marcado dimorfismo sexual, ya que la proliferación parasitaria es más rápida en ratones hembra que en ratones machos, además, es favorecida por el estradiol, y obstaculizada por los andrógenos (Huerta y col. 1992; Bojalil y col. 1993; Terrazas y col. 1994).

Se ha observado también, que las hembras aumentan más la carga parasitaria que los machos durante la infección aguda (Sciutto y col. 1995) y después de cuatro semanas de infección (infección crónica), la carga parasitaria de los machos aumenta progresivamente hasta llegar a ser similar a la de las hembras (Larralde y col.1995), dándose un proceso de feminización en los ratones crónicamente infectados, ya que, las concentraciones de estradiol aumentan (E_2) hasta llegar a ser parecidas a las de las hembras y al mismo tiempo ocurre una desandrogenización ya que los niveles de testosterona disminuyen 90% su valor normal (Larralde y col. 1995; Morales y col. 1996; Morales y col. 2001).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.2.1 *Taenia crassiceps*: Descripción y ciclo de vida.

Taenia crassiceps (Zeder, 1800), es un cestodo perteneciente al Phylum Platyhelminthes, Familia Taeniidae, presenta diferentes estadios de desarrollo, como todos los demás ténidos; una fase larvaria o metacestodo (cisticerco) y una fase adulta (taenia adulta).

Es un parásito, que en su forma adulta, se encuentra usualmente en el intestino de zorros rojos de Europa y América del Norte. Se reproduce por gemación en la cavidad peritoneal de roedores, los cuales son los hospederos intermediarios naturales para este parásito. Los cisticercos, de *T. crassiceps*, también pueden reproducirse en la cavidad peritoneal de ratones BALB/C, los cuales son excelentes hospederos y los cuales pueden utilizarse como modelo para el estudio de la cisticercosis. (Freeman, 1962; Sciutto y col. 1991).

T. crassiceps, se ha obtenido de varias cepas, entre las cuales se encuentran la cepa ORF, la cual se aisló a partir del zorro rojo en 1952 por el Dr. Reino Freeman. Este aporte arrojó, una serie de estudios sobre la biología del estadio larvario del parásito y 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).

La cepa ORF, se ha convertido en la más estudiada (Larralde y col. 1989; Escobedo y col. 2004; Jiménez y col. 2006), sin embargo, debido a que ha perdido su capacidad de generar el escólex, también perdió la capacidad de desarrollarse en una tenia adulta (Freeman, 1962; Mount, 1968).

La ultraestructura de la fase larvaria y la solitaria de *T. crassiceps*, no difiere significativamente de lo descrito para otros tenidos o gusanos planos (Lumsden y col. 1982; Lumsden y col. 1983; Willms y col. 2003a, 2004, 2005).

Morfológicamente y a simple vista, el cisticerco de *T. crassiceps*, es una vesícula ovoide, llena de fluido vesicular, en donde, en uno de sus polos se lleva a cabo la germinación. Está delimitado por un tegumento sincicial continuo, este, está unido a una capa germinal, donde se asientan los diferentes tipos de células que la constituyen, como células tegumentarias y células flama (Ambrosio y col. 1994; Palomares y col. 2006).

Debido a que este tipo de parásitos carecen de aparato digestivo en el tegumento es donde basan su absorción de nutrientes y eliminación de desechos. Además el tegumento sirve como una barrera de protección, está formado por citoplasma, microvesículas y mitocondrias. La porción basal está delimitada por una membrana basal, en donde las células están embebidas en un tejido parenquimatoso que contiene fibras musculares y otros tipos de células como las células flama (Ruppert y col. 1994; Smyth y col. 1989).

Como bien se sabe, el ciclo de vida de *T. crassiceps*, involucra dos tipos de hospederos: 1) el hospedero intermediario, representado por diversas especies de roedores (*Mus musculus*, *Microtus arvalis*, entre otros), el cual se infecta con el metacestodo o cisticerco (*Cysticercus longicollis*) que presenta mayor afinidad para alojarse en músculo esquelético, 2) el hospedero definitivo, quien desarrolla la fase adulta (gusano) en el intestino de cánidos principalmente el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), aunque también algunas especies de lobos (*Canis lupus*), los cuales se infectan al depredar al hospedero intermediario (Modificado y basado en Freeman, 1962).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Una vez que estas especies consumen el metacestodo del hospedero intermediario (depredación), las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, inducen la evaginación del escólex y su fijación a la pared intestinal. Aquí madurará hasta convertirse en gusano adulto, este a su vez se autofecundará para producir miles de huevos que serán expulsados a través de la defecación (proglótidos grávidos) (Modificado y basado en Freeman, 1962).

Los huevos producen varias capas protectoras, por lo que pueden permanecer largos periodos de tiempo en el ambiente, contaminando agua o plantas que serán consumidas por el hospedero intermediario. Este a través de las enzimas proteolíticas y sales biliares, activará al embrión hexacanto, para convertirlo en oncosfera. Una vez formada la oncosfera, ésta penetrará la pared intestinal hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos, para distribuirse a gran variedad de órganos y tejidos, donde madurará hasta convertirse en cisticerco (Modificado y basado en Freeman, 1962).

Los cisticercos de *Taenia crassiceps*, se pueden reproducir asexualmente por gemación cuando se encuentran en la cavidad peritoneal de diferentes especies de roedores y llegan a medir, aproximadamente de tres a cinco mm, así también después de la inoculación intraperitoneal de un roedor, se producen nuevas gemas las cuales, se desprenden del cisticerco original formándose nuevamente cisticercos (Freeman, 1962).

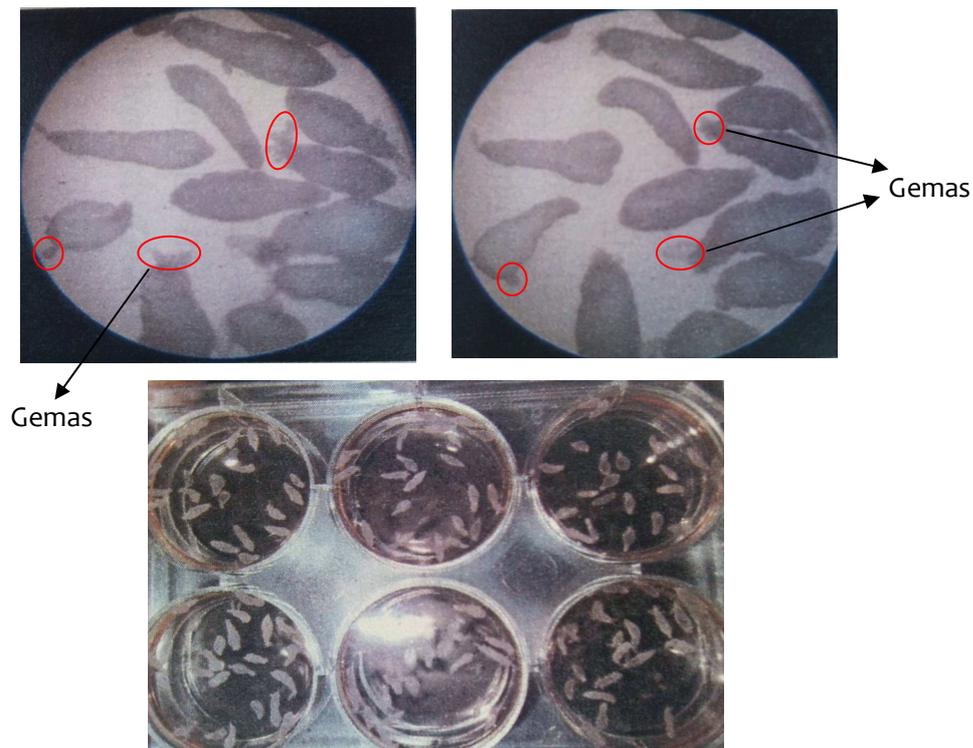


Figura 2. Cisticercos de *Taenia crassiceps*. A simple vista el cisticerco de *T. crassiceps* es una vesícula ovoide, llena de fluido vesicular, en donde en uno de sus polos se lleva a cabo la germinación (Ambrosio y col. 1994; Palomares y col. 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

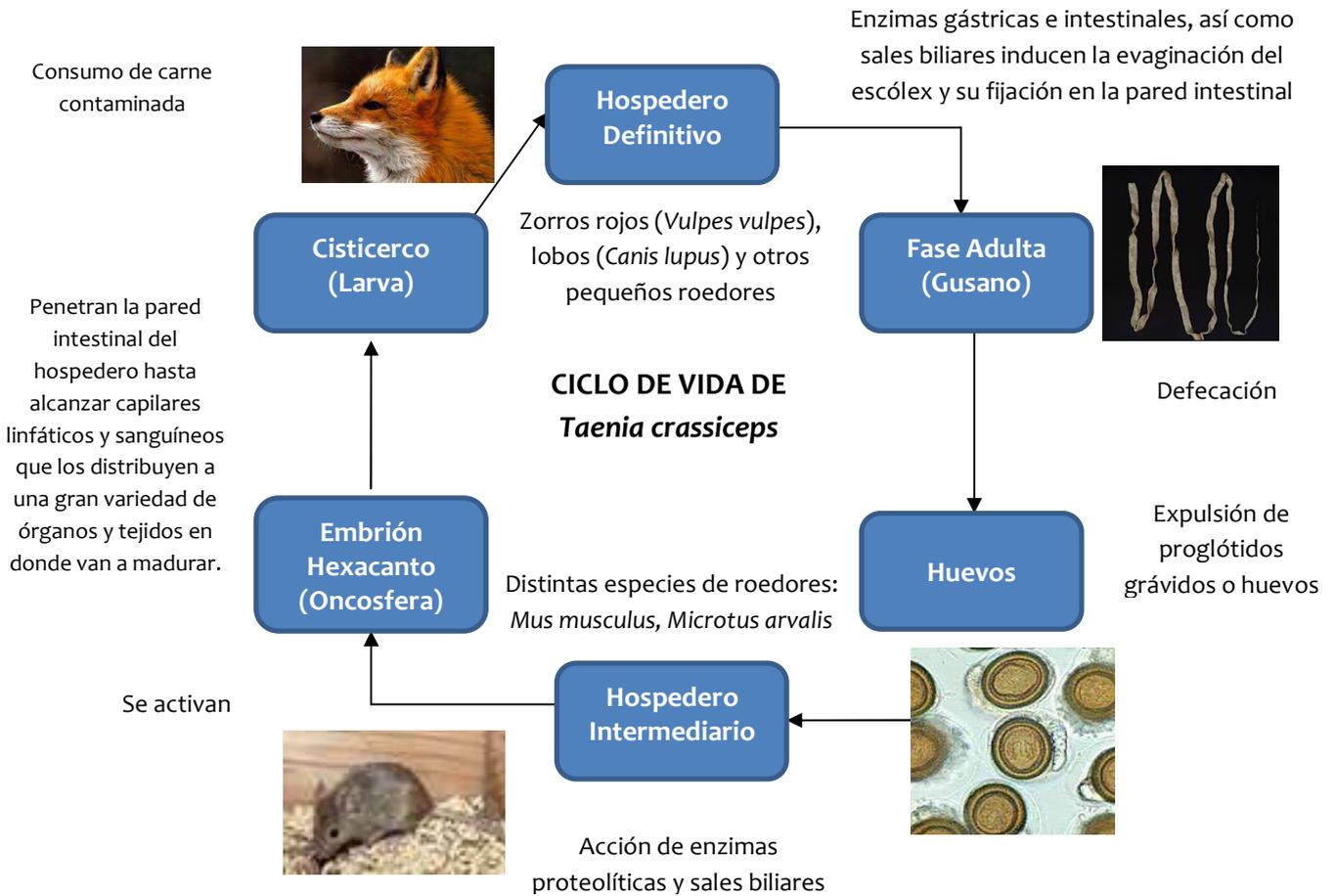


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. El ciclo de vida involucra dos hospederos: el hospedero intermediario, representado por diversas especies de roedores (*Mus musculus*, *Microtus arvalis*, entre otros) y el hospedero definitivo representado por especies de zorros rojos (*Vulpes vulpes*), o bien lobos (*Canis lupus*) (Modificado y basado en Freeman, 1962).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.3 Hormonas esteroideas: Descripción e importancia.

Las hormonas esteroideas poseen en su estructura química, tres anillos de seis carbonos más un anillo conjugado de cinco carbonos. El precursor de estas hormonas es el colesterol, son liposolubles, lo cual les permite atravesar libremente las membranas celulares y debido a su falta de hidrosolubilidad, se unen a proteínas para su transporte a través de la sangre (Soriano y col. 2007).

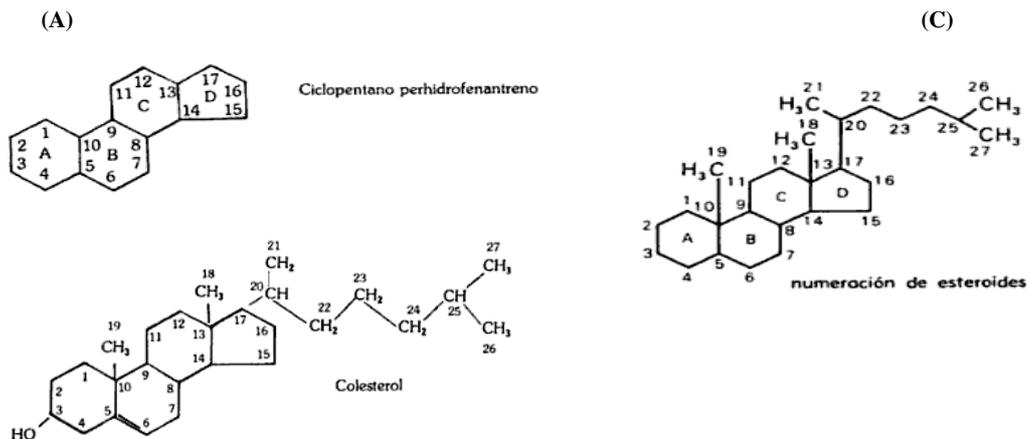


Figura 4. Estructura química de las hormonas esteroideas. (A) Estructura del núcleo del ciclopentano perhidrofenantreno, con su sistema convencional de numeración de los átomos de carbono. (B) Estructura del colesterol, componente de membranas celulares y precursor de los esteroides. (C) Numeración de esteroides, en donde la característica de estos es el esqueleto de ciclopentano perhidrofenantreno, en el que los ciclos se denominan A, B, C, y D. (Peña, 1988; Rodger, 1981).

La actividad de las hormonas esteroideas es nula, mientras se encuentran unidas a proteínas de transporte. Pero, actúan al unirse, a receptores específicos presentes en células diana (Gil y col. 2010).

El complejo formado, hormona-receptor, es capaz entonces, de influir en la actividad celular, estimulando o inhibiendo determinadas funciones biológicas. Desde el punto de vista químico, los receptores, son proteínas que tienen dos dominios funcionales. Uno para unirse al receptor y otro para la realización de los efectos celulares (Gil y col. 2010).

Los receptores de las hormonas liposolubles (hormonas esteroideas), se encuentran en el citoplasma o en el núcleo. Tras su unión con la hormona, interaccionan con zonas concretas del DNA, para estimular o inhibir la síntesis de proteínas específicas (Gil y col. 2010).

Como ya se mencionó, el colesterol es necesario para la síntesis de hormonas esteroideas y procede de diversas fuentes. Es captado de las lipoproteínas de tipo LDL por las células glandulares que deben sintetizar las hormonas, o sintetizado por esas mismas células a partir de acetyl-CoA (Koolman, 2004).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

El colesterol presente en la glándula suprarrenal y en las gónadas, en respuesta a diferentes hormonas peptídicas de la adenohipófisis, es transformado a pregnenolona. Esta última será la precursora de la progesterona, la cual a su vez será la precursora de las demás hormonas esteroideas (Soriano y col. 2007).

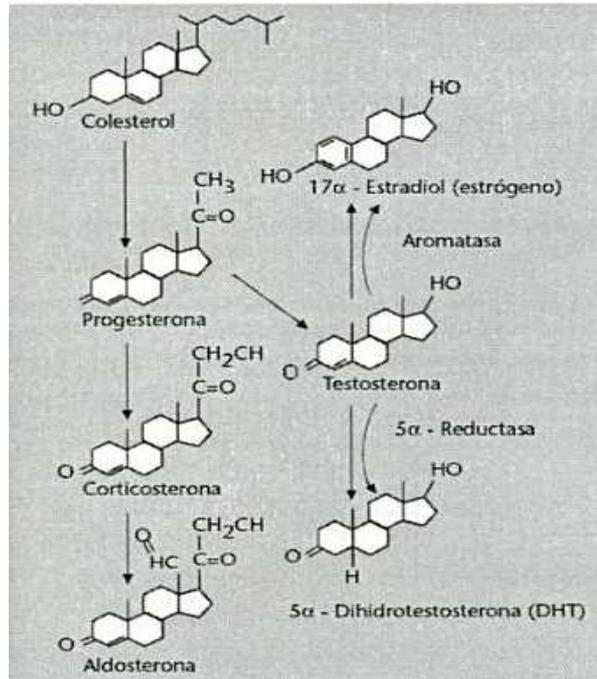


Figura 5. Síntesis y metabolismo de las hormonas esteroideas. El colesterol es el precursor tanto de los esteroideos suprarrenales como de los gonadales. En las gónadas el colesterol es transformado, por medio de procesos metabólicos en pregnenolona y esta última a su vez en progesterona. La progesterona da lugar a la testosterona, que se puede aromatizar por medio de la acción de la enzima aromatasa, convirtiéndose en estradiol. Asimismo la testosterona, se puede metabolizar en dihidrotestosterona, por medio de la enzima 5- α -reductasa (Soriano y col. 2007).

De acuerdo con su actividad biológica y aparición en la ruta de biosíntesis, las hormonas esteroideas se clasifican en progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos (Mendoza, 2008).

Los andrógenos son las hormonas sexuales de acción masculinizante segregadas por el córtex suprarrenal, por los testículos y en pequeña cantidad por los ovarios (Soriano y col. 2007).

De los andrógenos, la testosterona es la hormona más importante, porque estimula la maduración y el crecimiento de los órganos sexuales masculinos, también contribuye al desarrollo de las características sexuales secundarias, al desarrollo muscular y crecimiento de los huesos en los hombres (Acuña, 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

La testosterona se produce en las células intermedias de Leydig de los testículos y es responsable del desarrollo y función de las gónadas masculinas (Koolman, 2004).

Además, de los efectos anteriores, la testosterona y el metabolito activo 5- α -dihidrotestosterona, promueven el balance positivo de nitrógeno Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , la retención de agua y aunados a la inhibina, son los responsables de la retroalimentación negativa de las gonadotropinas (Mendoza, 2008).

En cuanto a los estrógenos naturales, tenemos que éstos, son compuestos de 18 átomos de carbono y son segregados sobre todo en los ovarios, testículos, la corteza suprarrenal y la unidad fetoplacentaria (Soriano y col. 2007).

Dentro de éstos se encuentran el estradiol y la estrona, los cuales son producidos en los ovarios y en cantidades muy pequeñas, en las glándulas adrenales (Acuña, 2006).

La progesterona es la hormona sexual femenina producida en el cuerpo lúteo (glándula endócrina dentro de los ovarios que se desarrolla después de la ovulación) (Acuña, 2006).

El estradiol que también es producido por el ovario y durante el embarazo por la placenta, controla el ciclo menstrual, estimula la proliferación de la mucosa del útero y es responsable de la expresión de los caracteres sexuales secundarios (mamas, distribución de grasa corporal, entre otras) (Koolman, 2004).

Los estrógenos también producen efectos anabólicos, pues favorecen la formación de tejido y promueven el balance positivo de nitrógeno, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y retención de H_2O , (Mendoza, 2008). Además, son los precursores de todos los andrógenos (Soriano y col. 2007).

Por su parte, los progestágenos son producidos fundamentalmente por el cuerpo lúteo, debido a la gran vascularización del mismo, que permite una importante captación de colesterol para su síntesis. El más importante es la progesterona y sus niveles varían a lo largo del ciclo menstrual (Torres y col. 2001).

La función principal de la progesterona, es el mantenimiento del embarazo y la supresión de la ovulación (Delgado, 2003).

Terapéuticamente los progestágenos se emplean en la prevención del aborto espontáneo, en el tratamiento de desordenes menstruales y como anovulatorios en asociaciones con estrógenos (Delgado, 2003).

En el tejido mamario, la progesterona, induce el desarrollo alveolar preparando la glándula para la lactancia. Aumenta la temperatura basal entre 0.5 °C y 0.8 °C, además de modular la secreción de gonadotropinas y la conducta sexual actuando en el hipotálamo. También por un efecto central, aumenta la frecuencia respiratoria (Mendoza, 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

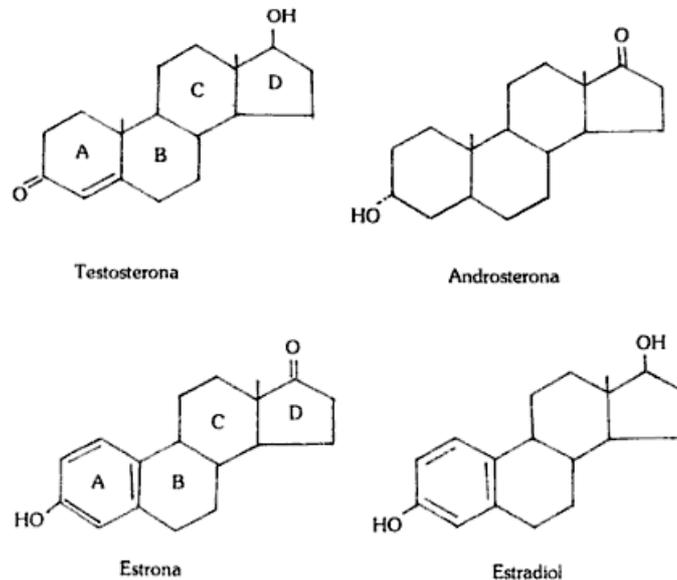


Figura 6. Estructura de algunas hormonas sexuales. Desde el punto de vista estructural, las hormonas sexuales, tienen en común la ausencia de cadena lateral en el carbono 17. La diferencia entre las hormonas masculinas o andrógenos y las femeninas o estrógenos, consiste en que estas últimas tienen un sistema de dobles ligaduras alternas (conjugadas) en el anillo A de la molécula (Peña, 1988).

4.3.1 Hormonas esteroides: Efectos sobre infecciones parasitarias.

Como ya es bien sabido, las hormonas esteroides regulan y coordinan una gran variedad de funciones celulares y fisiológicas en un organismo, por ejemplo, el crecimiento, la reproducción, la diferenciación, así como procesos de balance y aprovechamiento nutricional, mantenimiento del medio interno de un organismo y una de las funciones más importantes en este caso, es la regulación de la respuesta inmune dirigida hacia un agente patógeno (Akmaev, 1996).

En los últimos años, han existido una gran cantidad de estudios, que sugieren que el hospedero, a través de las hormonas y factores de crecimiento que él sintetiza, puede modificar diversos aspectos de la fisiología parasitaria, como infectividad, diferenciación y crecimiento (Mendonca y col. 2000; Charder y col. 1992; Escobedo y col. 2005).

Por otro lado, también existen evidencias experimentales, que sugieren la explotación del microambiente hormonal del hospedero por parte del parásito como un mecanismo más, que favorece el asentamiento de la infección. Por ejemplo el fenómeno de trans-regulación o bien, regulación cruzada del hospedero al parásito, constituye un medio muy importante por el cual, éste último aprovecha a través de estructuras semejantes a los receptores de hormonas (presentes en mamíferos), las hormonas y factores de crecimiento que el hospedero sintetiza (Escobedo y col. 2004).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

La regulación hormonal de diversas infecciones parasitarias por parte de la respuesta inmunológica del hospedero, ha sido bien observada en casos de malaria, esquistosomiasis, toxoplasmosis, cisticercosis, tripanosomiasis, leishmaniasis, entre otras (Roberts, 2001).

Por ejemplo, se ha reportado que ratones, tratados con el andrógeno adrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) e infectados con cercarias de *Schistosoma mansoni*, reducen considerablemente la intensidad parasitaria (Mendonca y col. 2000). Por otra parte, en la infección murina provocada por *Nippostrongylus brasiliensis*, existe evidencia experimental que apoya que los esteroides sexuales modulan de manera directa, el establecimiento parasitario (León y col. 1986).

Se ha observado también, que el tratamiento con cortisol aumenta el número y tamaño de gametocitos de *Plasmodium falciparum* (Lingnau y col. 1993). Similar a esto, existen estudios donde se demuestra que merozoitos tratados con insulina, E₂, P₄ y T₄, aumentan considerablemente el número de gametocitos, aumentando además el crecimiento y la reproducción del parásito en este estadio. Además, cuando estos parásitos son tratados con 16- α -bromoepiandrosterona, un análogo de la DHEA, su crecimiento se ve disminuido hasta en un 25% (Freilich y col. 2000).

En estudios semejantes se ha observado que la exposición a E₂, P₄ y T₄ *in vitro* de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, no afecta al parásito en ninguna función. Sin embargo, el tratamiento con cortisol aumenta la síntesis de DNA y la proliferación de los trofozoitos, mientras que los parásitos tratados con DHEA, muestran una disminución en los mismos parámetros, además de pérdida progresiva de adherencia y motilidad, culminando con lisis parasitaria (Carrero y col. 2006).

Un ejemplo más, se puede observar en el tratamiento con T₄ de la forma adulta de *Schistosoma haematobium*, donde disminuye la fecundidad y por tanto, la capacidad reproductiva del parásito (Remoue y col. 2002).

Adicionalmente, amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, tratados con factor de crecimiento epidermal murino (EGFm), aumentan considerablemente la síntesis de DNA, crecimiento y actividad metabólica, induciendo a receptores con actividad de cinasas de tirosina, tales como la proteína cinasa C (PKC) y diversos miembros de la cascada de activación de las MAP cinasas (Ghansah y col. 2002). Se ha descrito además, un efecto estimulante del EGFm sobre el desarrollo y la maduración de diversas filarias, particularmente la de *Brugia malayi* (Dissanayake, 2000).

Estudios similares, muestran que microfilarias de *Onchocerca volvulus* y *Oncocerca lienalis* aumentan su actividad metabólica, cuando son tratadas con 20-hidroxiecdisona (Townson y col. 1996).

Finalmente, cabe mencionar que el factor estimulante de la colonia de macrófagos-granulocitos (MG-CSF) promueve el crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* (Charlab y col. 1990).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.3.2 Hormonas esteroides: Efecto sobre la infección causada por *T. crassiceps*.

Se ha observado, que durante diversas infecciones, sobre todo parasitarias, existe un dimorfismo sexual en la susceptibilidad y/o resistencia de las mismas (Lockshin, 2001).

Este dimorfismo, se establece, cuando organismos de la misma especie pero de sexo distinto, poseen la capacidad de responder de manera diferencial a un mismo estímulo antigénico. Tal es el caso de la cisticercosis experimental murina, provocada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps*. Hablando de la cisticercosis murina podemos observar que ésta, está asociada a tres tipos de factores biológicos del hospedero, como lo son los factores genéticos, gonadales e inmunitarios (Sciutto y col. 1991).

En los factores genéticos, se observa que la susceptibilidad está asociada a la cepa del ratón, la más susceptible a la cisticercosis es la cepa BALB/c. Así mismo, la susceptibilidad a la infección se asocia al locus del complejo mayor de histocompatibilidad: H-2, (cepas con el mismo fondo genético BALB pero diferencias en el locus H-2 presentan diferentes susceptibilidades), siendo la más susceptible la BALB/c H-2 (AnN). Pero lo más interesante, es que sin importar cuál sea la cepa del ratón ni el locus presente, se ha observado que todas las hembras siempre son más susceptibles que los machos a la infección aguda, (Sciutto y col. 1991), lo cual sugiere un fuerte control por factores gonadales en esta infección.

Por ejemplo, en la infección aguda (primeras cuatro semanas), tanto los ratones machos como las hembras presentan una importante y marcada susceptibilidad al sexo, es decir, las hembras presentan cargas parasitarias cuatro veces mayores que los machos, sin embargo, en la infección crónica (mayor a cuatro semanas), los ratones machos presentan cargas parasitarias mucho mayores, que podrían ser similares a las de las hembras. Con este hecho se ha demostrado, que durante la infección crónica, los ratones machos aumentan sus niveles de estradiol 200 veces su valor normal y los valores de testosterona disminuyen al 90% así como también disminuye el peso de las vesículas seminales y los testículos (Larralde y col. 1995).

Se observado que este efecto es mediado por los testículos, pues al gonadectomizar primero, para posteriormente infectar a ratones machos, no se detectan los niveles de estradiol antes reportados, sin embargo, cuando los animales castrados son tratados con testosterona o DHT, las cargas parasitarias disminuyen 50% (Larralde y col. 1995).

Además, este cambio hormonal del macho, afecta otros aspectos fisiológicos del hospedero, como por ejemplo, pierde la respuesta de eyaculación, posteriormente, la conducta de intromisión y finalmente pierde la conducta de monta. Sin embargo, esta conducta sexual queda totalmente restaurada cuando se administra testosterona o DHT (Morales y col. 1996).

También se ha observado que la expresión de la enzima P-450 aromatasa (la cual se encarga de metabolizar a E_2 en T_4), se aumenta en los testículos de los ratones machos crónicamente parasitados al mismo nivel de las hembras, además, existe una disminución en la expresión de la enzima 5α -reductasa de esteroides tipo II, sin que se afecte la expresión de la 20,22 desmolasa. Esto sugiere, que la infección afecta específicamente al sistema encargado de metabolizar andrógenos y no a toda la vía esteroidogénica del hospedero infectado (Morales y col. 1999b).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Estudios similares, han demostrado que la exposición *in vitro* de cisticercos de *T. crassiceps* con 17 β -estradiol (E₂) y progesterona (P₄), estimulan la reproducción e infectividad del parásito, mientras que el tratamiento con testosterona (T₄) y dihidrotestosterona (DHT) tienen efectos contrarios, al inhibir la reproducción y reducir su motilidad e infectividad (Escobedo y col. 2004).

Estos efectos, se han observado desde las primeras 24 horas de cultivo y presentan sus efectos máximos a los cinco días, sin afectar su viabilidad. Además, se ha observado que E₂ y P₄ aumentan, mientras que T₄ y DHT disminuyen la expresión de *c-fos* y *c-jun* (involucrados en el control de la diferenciación celular, reproducción y apoptosis), así como la síntesis de DNA, por parte del parásito (Escobedo y col. 2004).

Un hallazgo muy importante, es que la evaginación del escólex de *T. solium*, puede ser inducida *in vitro* por el efecto de la progesterona, mientras que puede ser inhibida, por el efecto del RU486 (antagonista de progesterona) (Escobedo y col. 2010), esto es de suma importancia ya que podría ocurrir un fenómeno similar con *T. crassiceps*.

4.4 El Citoesqueleto: Descripción y función.

En los primeros tiempos de la microscopia electrónica, los biólogos pensaban que los orgánulos de una célula eucarionte, flotaban libremente en el citosol. Pero los progresos realizados tanto en la microscopia óptica y electrónica, han revelado la presencia del citoesqueleto, una red de fibras que se extiende en el citoplasma (Campbell y col. 2007).

Ésta compleja red de filamentos, está compuesta por cuatro tipos de elementos básicos; a) los microfilamentos, que están formados por actina y tienen un diámetro entre 6-10 nm, b) los filamentos intermedios, que están constituidos por una o varias de cinco familias de proteínas, su diámetro oscila entre 7-15 nm, c) los microtubulos, que están formados por α y β tubulina, su diámetro está entre 15-35 nm y d) proteínas asociadas, las cuales se unen específicamente y firmemente a un tipo de filamento o microtubulo, e intervienen de forma decisiva en su estructura, asociación con otros filamentos y orgánulos celulares, además, de su papel funcional (Ojeda, 1997).

La función más obvia del citoesqueleto, es la de proporcionar soporte mecánico a la célula y mantener su forma (Campbell y col. 2007). Aunque también, permite desplazamientos de orgánulos, organiza la separación de cromosomas en la división celular, estabiliza exvaginaciones hacia el exterior de la membrana celular y construye una red móvil, que permite las contracciones celulares y con ellas el movimiento y desplazamiento (Müller-Esterl, 2008).

Las moléculas de actina (42 kDa), se arman espontáneamente por polimerización en una estructura lineal helicoidal para formar filamentos de 6 a 8 nm de diámetro. Estos son más delgados, cortos y flexibles que los microtubulos. Las moléculas de actina libres en el citoplasma se conocen como actina G (actina globular), en contraste con la actina polimerizada de los filamentos que se denomina actina F (actina filamentosa) (Ross y col. 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Las células contienen una gran reserva de monómeros de moléculas de actina (un 50% de su actina total), de la cual se alimentan cuando se requiere la polimerización a filamentos de actina. Requisito esencial para ello, es la carga de actina con ATP, así como la presencia de cationes como K^+ y Mg^{2+} (Müller-Esterl, 2008).

El paso inicial, es la unión de un dímero de actina, el cual se destruye rápidamente. Cuando se incorpora una tercera molécula, se forma un trímero relativamente estable, que sirve solo como “germen” para la agregación avanzada (Müller-Esterl, 2008).

La asociación de monómero a trímero, produce la fase de nucleación. La actina no es una molécula simétrica, ya que en la construcción de la fibra creciente, realiza un cambio de conformación, que de nuevo confiere polaridad a los polímeros. Por lo tanto, el filamento de actina formado posee dos polos; un extremo menos de crecimiento lento y un extremo más de crecimiento mucho más rápido (Müller-Esterl, 2008).

El control y regularización del proceso de la polimerización, depende de la concentración local de actina G y de la interacción de proteínas fijadoras de actina (ABP), que pueden evitar o potenciar la polimerización (Ross y col. 2008).

Los microfilamentos son altamente dinámicos y están modulados por un gran número de proteínas ligadas a actinas (ABP's) (Hesketh y col. 1995). En su mayoría, los filamentos de actina de las células 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 la interacción con otras proteínas, es por esta razón, que la regulación de la unión a la tropomiosina, es un paso muy importante en la contracción muscular (Alberts y col. 2002).

Los microfilamentos se encuentran en el citosol para enfocarse y condensarse en una red, se encuentran cerca de la membrana plasmática compacta, con ello confieren forma y estabilidad a las células. Además, posibilitan a las células, el transporte a lo largo de una matriz sólida (migración celular), avanzar moviéndose a través de gradientes químicos (quimiotaxis) y participar en la mitosis (citoquinesis) (Müller-Esterl, 2008).

Los filamentos de actina o microfilamentos, se unen de forma remarcable a los filamentos intermedios estables y a los microtubulos estables; una parte de los microfilamentos es estable, mientras que la otra es dinámica y está sujeta a un entorno constante (Müller-Esterl, 2008).

Dentro de algunas funciones de los microfilamentos en la célula, se encuentran: mantenimiento de la forma (elementos de soporte de tensiones), cambios en la forma, contracción muscular, corriente citoplasmática, motilidad celular (como en los pseudópodos), división celular (formación del surco de segmentación) (Campbell y col. 2007).

En cuanto a los filamentos intermedios, sabemos que tienen forma de hilo, estabilizan el lado interno de la membrana nuclear en forma de una lámina y proporcionan a la célula, una nueva habilidad mecánica contra las fuerzas extremas. A diferencia de los microtubulos y microfilamentos, no constan de una única clase de proteínas, sino de más de cincuenta proteínas juntas, que pertenecen a cinco grandes grupos (Müller-Esterl, 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Tabla No. 1. Ejemplos de filamentos intermedios (Müller-Esterl, 2008).

Clase	Tipo	Medida	Localización
I	Queratina ácida	40-70 Kd	Células epiteliales
II	Queratina básica	40-70 Kd	Células epiteliales
III	Proteínas tipo vimentina		Fibroblastos, células endoteliales, leucocitos
	Vimentina	54 Kd	
	Desmina	53 Kd	Células musculares
	Proteína glial fibrilar ácida	51 Kd	Células gliales
IV	Periferina	57 Kd	Neuronas periféricas y centrales
	Proteínas neurofilamentos		
V	NF-L, NF-M, NF-H	62-200 Kd	Axones
	Láminas nucleares	60-75 Kd	Lámina nuclear de las células eucariotas
	Láminas A, B, C		

Se denominan intermedios porque su diámetro de ocho a diez nm es intermedio entre el de los filamentos de actina y el de los microtubulos. Casi todos los filamentos intermedios están compuestos por subunidades no polares muy variables, con un peso molecular de alrededor de 50 kDa (Ross y col. 2008).

Los filamentos intermedios, no desaparecen ni se vuelven a formar de la manera continua característica de la mayoría de los microtubulos y filamentos de actina, por estas razones se cree que este tipo de filamento, desempeña en principio un papel estructural dentro de la célula y que forma el eslabón citoplasmático de una cadena de filamentos citoplasmáticos, nucleares y extracelulares extendida por todos los tejidos (Ross y col. 2008).

Las proteínas de los filamentos intermedios, se caracterizan por tener un dominio bastoniforme (o en varilla) central muy variable, con dominios globulares estrictamente conservados en cada extremo. Si bien las diversas clases de filamentos intermedios, difieren en cuanto a la secuencia de aminoácidos de la región central en varilla y exhiben alguna variación con respecto a sus pesos moleculares, los integrantes de todas las clases comparten una región homóloga que es importante para el autoensamblaje (Ross y col. 2008).

Los filamentos intermedios, se arman a partir de un par de monómeros helicoidales, que se enroscan entre sí para formar dímeros superenrollados. Luego dos de estos, se enroscan entre sí en forma antiparalela (es decir, se disponen paralelos pero orientados en sentidos opuestos) para producir un tetrámero escalonado de dos dímeros superenrollados, con lo que queda formada la unidad no polarizada de los filamentos intermedios (Ross y col. 2008).

Cada tetrámero, como unidad individual se alinea a lo largo del eje del filamento. Los extremos de los tetrámeros, se unen para formar los extremos libres del filamento. Este proceso armado provee una estructura helicoidal escalonada estable, en la cual los filamentos están muy juntos y estabilizados adicionalmente por interacciones laterales de unión entre los tetrámeros contiguos (Ross y col. 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Algunas de las funciones de los filamentos intermedios en la célula son: mantenimiento de la forma (elementos de soporte de tensiones), anclaje del núcleo y otros orgánulos, además de formación de la lamina nuclear (Campbell y col. 2007).

Los microtubulos, son tubos proteicos huecos rígidos y no ramificados que pueden desarmarse con rapidez en un sitio y rearmarse en otro. En general, crecen desde el centro organizador de microtubulos (MTOC) que se ubica cerca del núcleo y se extienden hacia la periferia celular. Los microtubulos crean un sistema de conexiones dentro de la célula, con frecuencia comparado con las vías del ferrocarril que guía el movimiento vesicular (Ross y col. 2008).

Se originan por polimerización de la tubulina, un dímero proteico en forma de barra de pesas, que se conforma de dos proteínas que unen GTP: tubulina α y tubulina β . Mediante la asociación de los dímeros se origina una fibra hueca de trece protofilamentos ordenados paralelamente, en la cual los dímeros $\alpha\beta$ se disponen uno contra otro (Müller-Esterl, 2008).

Miden entre 20 y 25 nm de diámetro. Su pared tiene un espesor de unos 5 nm y consiste en 13 protofilamentos de moléculas globulares diméricas de la proteína tubulina, dispuestos en forma circular. El dímero de tubulina tiene un peso molecular de 110 kDa y está formado por una molécula de α -tubulina y una de β -tubulina, cada una de ellas con un peso molecular de 55 kDa (Ross y col. 2008).

Los dímeros de tubulina se ensamblan siempre en una orientación dada, por ello los microtubulos originales poseen dos extremos diferenciales, que se describen como extremo más y menos. Esta direccionalidad es un factor significativo, que prepara la dirección del transporte intracelular en los microtubulos (Müller-Esterl, 2008).

La velocidad de polimerización o despolimerización, también puede modificarse por la interacción con proteínas asociadas con los microtubulos (MAP) específicas. Estas proteínas como la MAP-1, 2, 3 y 4, la MAP-t y la TOGp, regulan el armado de los microtubulos y los fijan a orgánulos específicos (Ross y col. 2008).

La formación de microtubulos, puede rastrearse hasta centenares de anillos de γ -tubulina que forman una parte integral del MTOC. Los dímeros de α -tubulina y β -tubulina se añaden al anillo de γ -tubulina extremo con extremo. La polimerización de los dímeros de tubulina requiere la presencia de GTP y Mg^{2+} (Ross y col. 2008).

Los microtubulos son estructuras dinámicas, que pueden crecer en los dos extremos, aunque con diferentes velocidades. El extremo más crece unas cuatro veces más rápido que el extremo menos. La causa de ello, es el microentorno diferente en que debe instalarse el dímero de tubulina en la correcta orientación (Müller-Esterl, 2008).

Experimentos *in vitro*, han mostrado que el ensamblado de tubulina empieza con una nucleación, en la cual los dímeros de tubulina se ordenan a un oligómero, estos oligómeros son metaestables y se destruyen rápidamente de nuevo a sus componentes diméricos. Si un oligómero sobrepasa la medida crítica de unos seis o siete dímeros se produce una elongación, que añade de manera rápida otros dímeros de tubulina (Müller-Esterl, 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Por ello la velocidad de polimerización, es proporcional a la concentración de tubulina en el medio. Mediante la rápida polimerización, disminuye la concentración de tubulina libre. A una concentración umbral crítica se para la asociación y se equilibra con la disociación, alcanzando así un estado de equilibrio dinámico (Müller-Esterl, 2008).

4.5 Células flama: Descripción y función.

Las células flama (FC), son células ciliadas que se sitúan en la matriz basal del tejido neodermal de cestodos. Son consideradas como células flama terminales y como la unidad básica del sistema protonefídial (PS), que forma parte de los sistemas excretores de invertebrados (Valverde y col. 2011).

En los cestodos, así como en todos los platelmintos, los sistemas excretores como lo es el PS, juegan un papel muy importante que permitirá a los parásitos conservar agua, eliminar sales y sobrevivir en las cavidades del intestino o en el cuerpo de hospederos, es por ello que actúan como osmorreguladores (Smyth y col. 1989; Barnes 1987).

Las células flama, presentan una morfología típica: por microscopía de luz se observan como cometas, en el que el extremo anterior corresponde al cuerpo de la célula, mientras que el extremo distal contiene un penacho de cilios (Rohde y col. 1992).

En algunas infecciones causadas por parásitos del género *Taenia*, como los producidos por el metazoo de *T. solium*, las FC de los parásitos, parecen ser importantes para la supervivencia, ya que pueden realizar funciones específicas tales como la desintoxicación o transformación de sustancias nocivas para los parásitos (Smyth y col. 1989; Barnes 1987).

La detección de α -tubulina en tejidos de cisticercos, indica que esta proteína del citoesqueleto está altamente expresada en el tegumento sincitial y varias FC, la mayoría de estas células ciliadas (Aproximadamente 80-90%), se encuentran en el tejido del canal espiral del escólex invaginado (Valverde y col. 2011).

Debido a que los cestodos no tienen un sistema digestivo, la presencia de la tubulina es importante para su supervivencia y adaptación dentro de los hospederos, ya que los sistemas de absorción, excreción y secreción permiten una adecuada absorción de nutrientes, así como una eficaz eliminación de residuos (Smyth y col. 1989).

Por lo anterior, es de suma importancia el estudio de este tipo de células (FC), las cuales nos ayudarían a entender de mejor manera la composición y dinámica de estos parásitos. Pues como ya se mencionó, no cuentan con un sistema digestivo que se encargue de la absorción de nutrientes, ni de un sistema que se encargue de eliminar desechos o sustancias tóxicas, de los mismos.

Además, este tipo de estudios, no pueden ayudar al diseño de nuevos fármacos, que afecten solo a las proteínas que conforman a estas células, como lo son las del citoesqueleto.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.6 Métodos para el análisis de proteínas.

En investigación, en medicina, en biotecnología y muchas otras áreas de la actualidad, se requieren proteínas purificadas para un gran número de aplicaciones (Koolman, 2004).

Para conocer la estructura de las moléculas proteicas, se suele someter a las proteínas a determinados análisis físicos y químicos. El conocimiento químico incluye el análisis elemental (C, H, O, N y otros elementos) cualitativo y cuantitativo, la composición en aminoácidos y la secuencia de éstos en las cadenas peptídicas. Mediante análisis físicos, se puede determinar la masa molecular, mediante la medida de la presión osmótica, ultrafiltración, cromatografía de exclusión, electroforesis, etc. (Macarulla y col. 1994).

Puesto que las proteínas son muy lábiles especialmente las globulares, durante su purificación se debe trabajar a temperaturas bajas (0 a 5 °C) y emplear técnicas de separación cuidadosas (Koolman, 2004).

La purificación es un paso obligado en el estudio de las macromoléculas, pero no es necesariamente fácil. Por otro lado, el primer paso en el aislamiento de una proteína, es extraerla de la célula e incluirla en una solución. Muchas células, requieren algún tipo de ruptura mecánica para liberar su contenido (Voet y col. 2009).

La mayoría de los procedimientos para lograr la lisis de las células, se basa en alguna forma de aplastar o moler, seguida de una filtración o centrifugación para retirar las partículas insolubles más grandes. Si la proteína diana está estrechamente asociada con una membrana lipídica, puede usarse un detergente o solvente orgánico para solubilizar los lípidos y recuperar la proteína (Voet y col. 2009).

Una vez que la proteína se extrajo de su entorno natural, se expone a varios agentes que pueden dañarla en forma irreversible. Estas influencias deben controlarse con mucho cuidado en todos los pasos de un proceso de purificación (Voet y col. 2009). Para ello, deben considerarse los siguientes factores:

pH: Los materiales biológicos, se disuelven habitualmente en soluciones reguladoras eficaces en el rango de pH en el cual los materiales son estables. Si no se hace de esta manera, puede causarse su desnaturalización o degradación química (Voet y col. 2009).

Temperatura: La estabilidad térmica de las proteínas varía. Aunque algunas de ellas se desnaturalizan a bajas temperaturas, la mayoría lo hace a temperatura elevada, a veces solo unos pocos grados sobre la de su entorno natural. La purificación de proteínas normalmente se lleva a cabo a temperaturas cercanas a 0 °C (Voet y col. 2009).

Presencia de enzimas de degradación: Cuando los tejidos se destruyen para liberar la molécula de interés, se liberan también enzimas de degradación. Entre estas se incluyen proteasas y nucleasas. Estas pueden inhibirse si se ajustan el pH y la temperatura, a valores que las inactiven (siempre que no se afecte de manera adversa la proteína de interés), o si se agregan compuestos que bloqueen específicamente su acción (Voet y col. 2009).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Adsorción a superficies: Muchas proteínas se desnaturalizan por contacto con la interfaz aire-agua, o con las superficies de vidrio o plástico. Por ende, las soluciones con proteína se manipulan de manera que sea mínima la formación de espuma y se mantienen relativamente concentradas (Voet y col. 2009).

Almacenamiento a largo plazo: Todos los factores mencionados antes, deben tomarse en cuenta cuando se desee mantener estable una muestra de proteína purificada. Además, deben prevenirse los procesos de oxidación lenta o la contaminación microbiana. Las soluciones de proteínas a menudo se almacenan bajo gas nitrógeno o argón, o bien bajo congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura del nitrógeno líquido), o bajo ambas condiciones (Voet y col. 2009).

La purificación de una sustancia requiere algún método para detectarla cuantitativamente. Por consiguiente, debe diseñarse un ensayo que sea específico para la proteína diana, muy sensible y de uso conveniente (Voet y col. 2009).

La concentración de una sustancia en solución puede medirse por espectroscopia de absorbancia. Una solución que contiene un soluto que absorbe luz, lo hace de acuerdo con la ley Lambert y Beer:

$$A = \log \left[\frac{I_0}{I} \right] = \epsilon c l$$

donde **A** es la absorbancia del soluto (o como alternativa su densidad óptica), I_0 es la intensidad de la luz incidente a una longitud de onda dada λ , I es su intensidad transmitida a λ , ϵ es la absorptividad molar (o como alternativa el coeficiente de extinción molar) del soluto a λ , c es su concentración molar y l la longitud del recorrido del haz de luz en cm (Voet y col. 2009).

Los polipéptidos absorben fuertemente en la región ultravioleta UV del espectro ($\lambda = 200$ a 400 nm), sobre todo debido a que sus cadenas laterales aromáticas tienen coeficientes de extinción molar altos. Sin embargo, los polipéptidos no absorben luz visible ($\lambda = 400$ a 800 nm), por lo que son incoloros. A pesar de ello, si una proteína tiene un cromóforo que absorbe en la región visible del espectro, esta absorbancia puede utilizarse para detectar su presencia en una mezcla de otras proteínas (Voet y col. 2009).

4.6.1 Técnicas electroforéticas.

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, las diversas propiedades fisicoquímicas de la proteína de interés se usan para separarla de manera progresiva de otras sustancias (Voet y col. 2009).

Las técnicas electroforéticas, son la herramienta más potente de la que se dispone para el análisis de muestras complejas de proteínas. Estas técnicas son imprescindibles en el estudio de extractos tisulares y celulares, donde la cantidad de proteínas distintas es enorme (Miján-de la Torre, 2002).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Los sistemas electroforéticos suelen clasificarse de dos formas:

1. Sistemas disociantes, que permiten la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas, y **sistemas no disociantes** que permiten el análisis electroforético de las proteínas en su forma nativa conservando su actividad biológica (Zavala, 2005).

2. Sistemas continuos, en donde el gel, reservorios de electrodos y muestras, tienen buffers con pH igual y misma tensión iónica, y **sistemas discontinuos**, en donde el buffer utilizado en la formación del gel es diferente en cuanto a iones y pH, del buffer utilizado en los reservorios de los electrodos. En el sistema discontinuo, la muestra pasa primero en un gel concentrador que se encuentra en la parte superior del gel separador, siendo esto ventajoso ya que la muestra es concentrada electroforéticamente en una banda delgada antes de que pase al gel separador, aumentando con esto la separación electroforética (Zavala, 2005).

De los sistemas de electroforesis en poliacrilamida, el más utilizado es el SDS-PAGE en sistema de buffer discontinuo que fue descrito originalmente por Laemmli (Zavala, 2005).

Las técnicas electroforéticas habituales son de dos tipos: las que separan a las proteínas por su punto isoeléctrico, como el isoelectroenfoque (IEF) y las que separan por su masa molecular, principalmente electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La combinación IEF y SDS-PAGE es la denominada electroforesis bidimensional, que proporciona el grado más alto de capacidad resolutive de mezclas complejas de proteínas (Miján-de la Torre, 2002).

Dependiendo del tipo de proteínas que se pretenda analizar, es el tipo de gel que se va a utilizar. Existen geles bajos en sales, que se utilizan para analizar proteínas nativas, otros geles utilizan urea para analizar proteínas básicas y otros utilizan sustancias desnaturalizantes como los detergentes, para disociar las proteínas en sus subunidades polipeptídicas (Zavala, 2005).

La electroforesis de proteína generalmente se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida, con un tamaño de poro característico, de manera que la separación de las moléculas se basa en la filtración por el gel (tamaño y forma), así como en la movilidad electroforética (carga eléctrica) (Voet y col. 2009).

Algunos tipos de geles ampliamente utilizados en electroforesis son:

1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-desnaturalizantes (SDS-PAGE), donde las muestras son desnaturalizadas en presencia del detergente SDS y tanto el gel como el buffer de corrida contienen SDS. Las proteínas se separan en este sistema de acuerdo con su peso molecular (Zavala y col. 2005).

2. Geles en gradiente, en donde el gel está formado en un gradiente de concentración de acrilamida, bisacrilamida, lo cual optimiza la separación de las proteínas que tienen pesos moleculares muy cercanos (Zavala y col. 2005).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

3. Isoelectroenfoque (IEF), en este sistema, las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoeléctrico y se lleva a cabo en ausencia de detergentes (Zavala y col. 2005).

4. Geles bidimensionales, donde las proteínas son inicialmente separadas por isoelectroenfoque y después por SDS-PAGE, por lo tanto la separación de las proteínas es por su punto isoeléctrico y su peso molecular (Zavala y col. 2005).

En la electroforesis en gel de poliacrilamida, el soporte está constituido por una red tridimensional formada por la polimerización de la acrilamida con N, N'-metileno-bis-acrilamida, controlada por un sistema de catálisis con el persulfato de amonio y N, N, N', N'-tetrametiletildiamina (TEMED). La concentración de poliacrilamida puede variar de acuerdo al tamaño de la molécula que se desea separar, por ejemplo 7.5% de poliacrilamida para separar proteínas de peso molecular mediano, en cambio si se utiliza una baja concentración -5% se separan proteínas de alto peso molecular, en contraste si la concentración de poliacrilamida es alta el poro es pequeño y sirve para analizar proteínas de bajo peso molecular (Segal y col. 2005).

4.6.1.1 Electroforesis SDS-PAGE en una dimensión.

Es una forma de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), donde se utiliza el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés). Este contiene moléculas anfífilas que interfieren en las interacciones hidrófobas que por lo general estabilizan a las proteínas (Voet y col. 2009).

La matriz de poliacrilamida, se forma mediante la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida, ocurriendo esto en presencia de un agente iniciador (TEMED) y de un catalizador (ion persulfato). La poliacrilamida actúa como soporte inerte y tamiz, de acuerdo con la concentración de sus polímeros, se pueden obtener diferentes tamaños de poro, a mayor concentración de acrilamida menor tamaño de poro, lo que da como consecuencia una migración de proteínas más pequeña y un mayor rango de separación entre ellas (Zavala, 2005).

La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que rompe casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de 1.4 g de SDS por gramo de proteína, aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos (Berg y col. 2008).

La carga negativa alta que imparte el SDS enmascara la carga intrínseca de la proteína. El resultado neto, es que las proteínas tratadas con SDS tienen formas y relaciones carga-masa similares. Por lo tanto, la técnica SDS-PAGE separa las proteínas exclusivamente por efecto de la filtración del gel, esto es de acuerdo a su masa molecular (Voet y col. 2009).

También se añade mercaptoetanol (2-tioetanol) o ditioneitol para reducir los puentes disulfuro (Berg y col. 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Una vez que se tiene la mezcla de proteínas en el gel de poliacrilamida, estas son sometidas a la influencia de un campo eléctrico en donde avanzan de acuerdo con su carga neta y tamaño de su molécula. Para la electroforesis SDS-PAGE se requiere de un equipo vertical que presenta dos reservorios separados para las soluciones de corrida (Zavala, 2005).

Luego de la electroforesis, las bandas de proteína son separadas y pueden visualizarse en el gel mediante una técnica adecuada, por ejemplo, si se sumerge el gel en un colorante que se une fuertemente a las proteínas (Voet y col. 2009).

Cuando se tiñe con azul de Coomassie basta 0.1 µg de proteína (- 2 pmol) para dar una banda diferenciada y con la tinción de plata se puede distinguir incluso una cantidad menor (- 0.2 µg) (Berg y col. 2008).

Por todas estas cualidades, sabemos que la electroforesis sobre gel de poliacrilamida en SDS es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución (Berg y col. 2008).

Sin embargo, el principal inconveniente de los geles de poliacrilamida, es la toxicidad de sus componentes (acrilamida, N, N'-metilen-bis-acrilamida y persulfato de amonio), que pueden penetrar a través de la piel o por inhalación produciendo irritación y alteraciones del sistema nervioso central. Los geles una vez formados son relativamente poco tóxicos, aunque es conveniente tomar las precauciones adecuadas durante su manipulación (Fuentes y col. 1998).

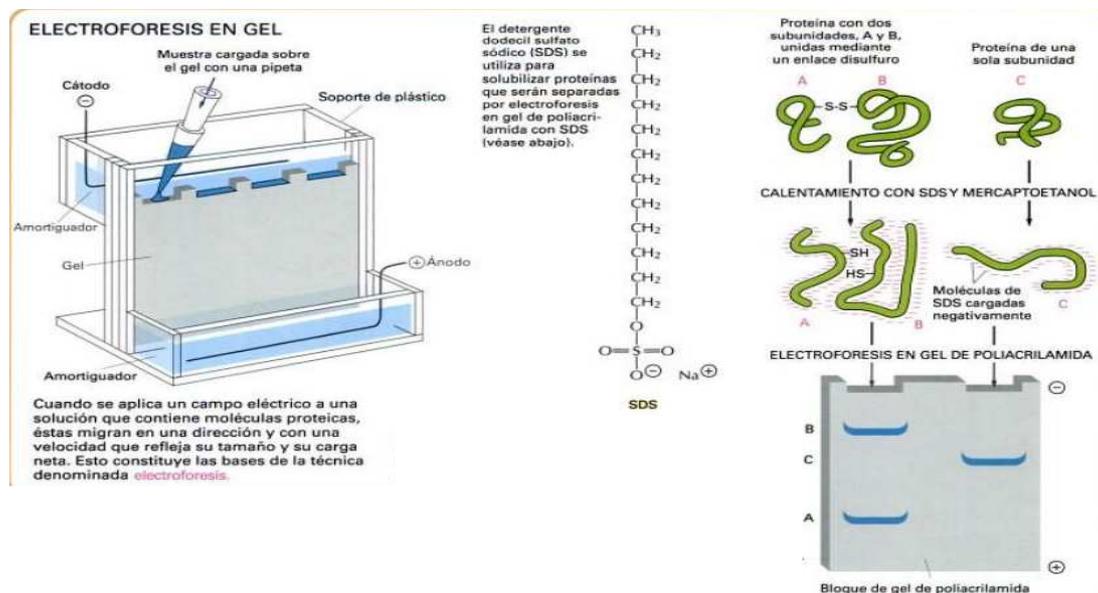


Figura No. 7. Electroforesis en gel SDS-PAGE. Las cadenas polipeptídicas forman un complejo con moléculas cargadas negativamente de dodecil sulfato de sodio (SDS) y migran por lo tanto como complejos proteína-SDS cargados negativamente a través de un bloque de gel poroso de poliacrilamida hacia el ánodo. Generalmente se agrega un agente reductor (mercaptoetanol) para romper cualquier unión -S-S- en las proteínas o entre estas. En tales condiciones las proteínas migran a una velocidad que refleja su peso molecular (Alberts y col. 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.6.1.2 Isoelectroenfoque (IEF).

Las proteínas también pueden separarse electroforéticamente en base a sus contenidos relativos de aminoácidos ácidos o básicos, es decir, en base a su punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH en el que su carga neta es cero (Berg y col. 2008). En este punto el número de cargas positivas se equilibra exactamente con el número de cargas negativas (Capmbell y col. 2007).

El IEF permite distinguir proteínas que difieren en sus pI tan poco como 0.01, lo que significa que se pueden separar proteínas que difieran en una sola carga neta (Berg y col. 2008).

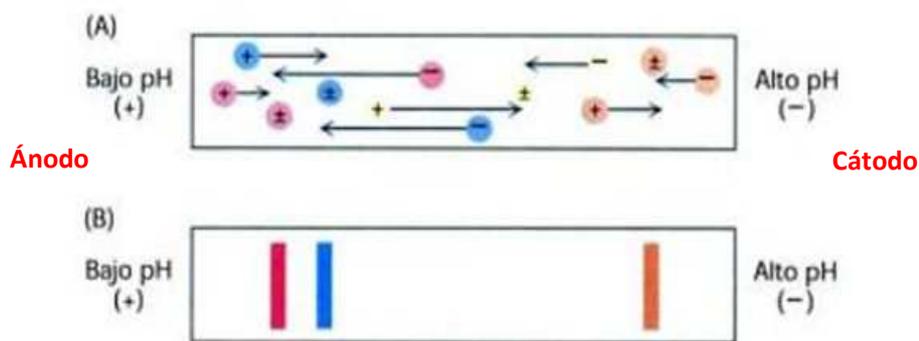


Figura No. 8. Principio del isoelectroenfoque. Antes de cargar la muestra, se establece un gradiente de pH en un gel. (A) Se carga la muestra y se aplica el voltaje. Las proteínas migran hacia su pH isoeléctrico, el lugar en el que no tiene carga neta. (B) Las proteínas forman bandas que se pueden separar y usar en experimentos futuros (Berg y col. 2008).

El IEF, se basa en la capacidad de las moléculas para variar su carga neta según cuál sea el pH del medio, en el cual existe un gradiente de pH. Este se establece añadiendo una mezcla de anfólitos con diferentes puntos isoeléctricos entre dos electrodos con carga eléctrica opuesta (Fuentes y col. 1998).

Los anfólitos que se utilizan habitualmente para obtener el gradiente de pH son mezclas de ácidos sintéticos, con numerosos grupos amino y carboxilo (algunas veces también grupos de ácido sulfónico y fosfórico) que presentan bajo peso molecular (600-900 Da) (Fuentes y col. 1998; Voet y col. 2009). Estos anfólitos deben de tener las siguientes propiedades:

- ✚ Capacidad para tamponar el pH en la zona en la que éste, es igual a su punto isoeléctrico.
- ✚ Buena conductividad.
- ✚ Estructura diferente de la de los anfólitos que forman parte de la proteína de interés, para evitar posibles interferencias durante la separación.
- ✚ Incapacidad para reaccionar o desnaturar los anfólitos que forman parte de la proteína de interés.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Además de lo anterior, los anfolitos se pueden aplicar en dos variantes. La forma más clásica consiste en distribuir uniformemente por el gel una mezcla heterogénea de anfolitos móviles, donde el gradiente de pH, se desarrolla después de aplicar una corriente como consecuencia del recorrido de los anfolitos. En cambio en la “técnica de la inmovilina”, se acoplan en primer lugar, concretos químicamente a la acrilamida y se genera una serie de inmovilinas (anfolitos inmovilizados), que se diferencian por sustituyentes ácidos y básicos (Müller-Esterl, 2008).

En un principio, el gradiente de pH era generado por anfolitos transportadores libres, los cuales creaban un gradiente de pH inestable. Esta característica y la necesidad de utilizar siempre los mismos reactivos y soluciones buffer, limitaba la reproducibilidad de los geles entre laboratorios. Es por ello que el 1982, se desarrolla una variante, las IPG, que son unas tiras comerciales usadas para llevar a cabo el isoelectroenfoque o primera dimensión, en las que el gradiente de pH esta generado por inmovilinas, unidas covalentemente a la acrilamida (Cristobo, 2008).

Para llevar a cabo el isoelectroenfoque, se utiliza un gel de poliacrilamida levemente entrecruzado, en forma de cilindro o lamina. Estos geles suelen contener urea en concentración cercana a 6 M, que es un poderoso agente desnaturizante de proteínas, pero que a diferencia del SDS, no posee carga y por lo tanto no puede afectar en forma directa la carga de las proteínas (Voet y col. 2009).

Después de establecer el gradiente de pH en el medio, se agrega la mezcla de proteínas y se aplica una diferencia de potencial eléctrico (alrededor de 1000 V), cada anfolito migrará hacia uno u otro electrodo en función de su propia carga y se detendrá cuando el pH del medio que le rodea es igual a su punto isoeléctrico (Fuentes y col. 1998; Voet y col. 2009).

Si se desconocen los componentes de una muestra, lo más adecuado es trabajar con gradientes de pH que se muevan dentro de unos intervalos amplios (por ejemplo, entre 3 y 10). Por el contrario, cuando se conocen al menos de forma aproximada, los puntos isoeléctricos de los componentes de interés, se debe trabajar con gradientes de pH situados dentro de intervalos más restringidos (Fuentes y col. 1998).

4.6.1.3 Electroforesis en doble dimensión (Proteómica).

El proteoma comprende todas las proteínas presentes en una célula en un momento determinado. El número de copias de cada proteína varía enormemente, de menos de 20 000 moléculas por célula para los tipos más raros, hasta 100 millones de copias, para los más comunes. Se considera que cualquier proteína que está presente con un número de copias superior a 50 000 por célula es relativamente abundante (Brown, 2008).

El término proteoma se acuñó en el congreso de Siena en 1994, para definir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma y fue propuesto por Wilkins (Wilkins y col. 1995).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Los estudios del proteoma son importantes, ya que éste, desempeña un papel fundamental como vínculo entre el genoma y la capacidad bioquímica de la célula. El estudio del transcriptoma solo aporta una indicación exacta de qué genes están activos en una determinada célula, pero la información de las proteínas es menos exacta (Brown, 2008).

Esto se debe, a que los factores que influyen en el contenido de proteínas, comprenden no solo la concentración de mRNA, sino también la velocidad de traducción de mRNA a proteínas y la velocidad de degradación de éstas. Además, la proteína que es el producto inicial de la traducción, quizá no sea activa, ya que algunas proteínas deben sufrir modificación física o química antes de volverse funcionales. Por ello, es crucial determinar la concentración de la forma activa de una proteína, para así conocer la bioquímica de una célula o tejido (Brown, 2008).

La electroforesis en dos dimensiones, es una herramienta útil para la proteómica, un campo de estudio abocado a la catalogación de todas las proteínas expresadas por una célula, con importancia en su cuantificación, localización, modificaciones, interacciones y actividades (Voet y col. 2009). Combina dos métodos electroforéticos; el isoelectroenfoque (IEF), como primera dimensión y la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) como la segunda. El método fue descrito originalmente por O'Farrel en 1975, habiéndose incorporado numerosas innovaciones, mejoras y optimizaciones, siendo la más relevante la del desarrollo de las tiras con gradiente de pH inmovilizado (IPG strips) (Pallás y col. 2008).

En primer paso, se fraccionan las proteínas de acuerdo a su punto isoelectroforético por medio de isoelectroenfoque y se crea un gradiente de pH. En el segundo paso, las proteínas se separan de acuerdo con su tamaño por medio de electroforesis en gel con SDS (Watson y col. 2008). Una vez separadas las proteínas en el gel, se observan una serie de manchas que deben ser visualizadas, para lo que se recurre a técnicas de tinción de proteínas (Cristobo, 2008).

La tinción de los geles es crucial en cualquier experimento de proteómica, sobre todo en los estudios de proteómica comparativa, ya que determina el número de proteínas visualizadas, la reproducibilidad entre geles y la precisión en la cuantificación de una banda proteica. Algunos métodos de tinción inespecífica, incluyen el Coomassie coloidal, nitrato de plata y métodos basados en reactivos fluorescentes. Las diferencias entre uno y otro son la sensibilidad, rango dinámico y compatibilidad con la identificación posterior por huella peptídica (Pallás y col. 2008).

El análisis cualitativo de los geles una vez teñidos, se puede hacer mediante un examen visual de los mismos. Por su parte, el análisis cuantitativo requiere la digitalización de las imágenes y su estudio mediante un software específico como por ejemplo PDQuest, Melanie, ImageMaster o DeCyder (Cristobo, 2008).

Una vez separadas las proteínas es esencial su identificación, para lo cual pueden utilizarse diversos métodos entre los que incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, la detección con anticuerpos específicos o el análisis de la composición de aminoácidos. Todos estos métodos son un poco lentos, por lo que no solo resultan apropiados para su utilización a gran escala (Cristobo, 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Dada su rapidez, hoy en día se recurre a la espectrometría de masas para la identificación de las proteínas, en donde deben convertirse primeramente en péptidos mediante proteólisis, generalmente con tripsina (Cristobo, 2008).

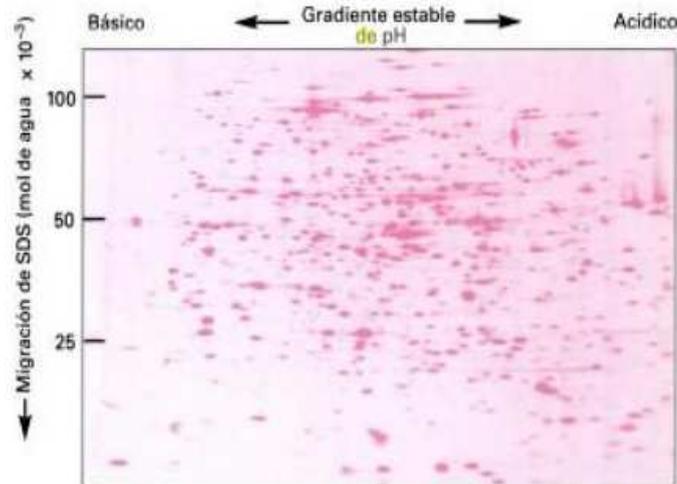


Figura No. 9. Corrimiento electroforético en una dimensión. En primer paso las proteínas, son fraccionadas de acuerdo a su punto isoeléctrico por medio de isoelectroenfoque y se crea un gradiente de pH. En el segundo paso, las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño por medio de electroforesis en gel con SDS (Watson y col. 2008).

4.6.2 Técnicas inmunoquímicas.

Las técnicas inmunoquímicas permiten, a diferencia de las anteriores, la detección específica de proteínas concretas. Todas ellas, se basan en la capacidad de reconocimiento de una proteína, por parte de un anticuerpo específico contra ella (Miján-de la Torre, 2002).

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas, son glucoproteínas producidas por células específicas del sistema inmunitario, en respuesta a una proteína extraña o antígeno (Ross y col. 2008).

Estos anticuerpos pueden obtenerse mediante la inmunización de animales de laboratorio, contra el antígeno (la proteína, el polisacárido, el ácido nucleico u otro tipo de molécula) con el que se desea obtener los anticuerpos. En este caso, las inmunoglobulinas son producidas por varios clones de plasmocitos contra diferentes epítopos o determinantes antigénicos del antígeno; por tal motivo estos anticuerpos se denominan policlonales (Ceccotti y col. 2007).

Otra manera de obtener anticuerpos, consiste en fusionar células inmortales de un plasmocitoma o mieloma murino, que es una neoplasia maligna (las células malignas son inmortales en cultivo de tejidos), de los plasmocitos con linfocitos B, aislados del timo de un ratón con sensibilización previa contra la sustancia que se desea detectar (antígeno). En el laboratorio se aíslan en las fases iniciales, colonias celulares (clones) cada una de ellas provenientes de una única célula, de ahí que los anticuerpos producidos se denominen monoclonales (Ceccotti y col. 2007).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Una vez producidos en el laboratorio, estos anticuerpos pueden purificarse de la sangre y conjugarse con un colorante fluorescente. En general los colorantes fluorescentes (fluorocromos), son sustancias químicas que absorben luz de longitudes de onda diferentes (por ejemplo; luz ultravioleta) y luego emiten luz visible de una longitud de onda específica (por ejemplo; verde, amarillo, rojo) (Ross y col. 2008).

La fluoresceína, el colorante de uso más frecuente absorbe la luz ultravioleta y emite luz verde. Los anticuerpos acoplados con fluoresceína pueden aplicarse a cortes de tejido (tanto obtenidos por congelación como provenientes de muestras sometidas a una fijación leve), sobre portaobjetos de vidrio para localizar un antígeno en las células y los tejidos. Luego la reacción del anticuerpo pueden examinarse y fotografiarse con un microscopio de fluorescencia o microscopio confocal que produce una reconstrucción tridimensional del tejido examinado (Ross y col. 2008).

4.6.2.1 Inmunofluorescencia.

La técnica original se desarrolló a principios de la década de 1940, sin embargo la técnica no se expandió ni ganó reconocimiento hasta varias décadas después, cuando se convirtió en una herramienta valiosa, en particular, en la clasificación de varias enfermedades renales y en numerosas enfermedades mediadas por fenómenos inmunológicos (Ceccotti y col. 2007).

Es una técnica rápida, que se utiliza para la identificación de un antígeno, exponiéndolo a anticuerpos conocidos marcados y observando la característica reacción antígeno-anticuerpo (García y col. 2006).

El fundamento de las técnicas de inmunofluorescencia se basa en el principio de que ciertas sustancias fluorescen, es decir, tienen la capacidad de irradiar luz de otra longitud de onda (color) al ser iluminados (Ceccotti y col. 2007).

Existen dos tipos de fluorescencia:

1. **La fluorescencia primaria o autofluorescencia**, que es la propiedad que poseen determinadas sustancias de producir fluorescencia de manera espontánea.
2. **La fluorescencia secundaria**, que consiste en la emisión de fluorescencia de sustancias que no poseen esta propiedad pero se tiñen con sustancias fluorescentes, fluorocromos para producir fluorescencia (García y col. 2006).

Los fluorocromos más utilizados en la inmunofluorescencia son la fluoresceína, la rodamina y la ficoeritrina. La fluoresceína se utiliza en forma de isotiocianato (FITC), absorbe luz azul y emite fluorescencia verde. La rodamina se emplea en forma de isotiocianato tetrametilrodamina (TRITC), absorbe luz verde y emite fluorescencia rojo-anaranjada. La ficoeritrina (PCE) absorbe luz azul y produce fluorescencia roja (García y col. 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

La unión del fluorocromo al anticuerpo va a depender del tipo de fluorocromo. La fluoresceína y rodamina se unen mediante enlace covalente con los grupos amino y carboxilo de las proteínas a un pH alcalino. Cuando se trata de conjugar el fluorocromo con anticuerpos, deben usarse moléculas purificadas de anticuerpos para evitar que se unan a otras proteínas (García y col. 2006).

Como sabemos, el propósito de las reacciones inmunocitoquímicas, es localizar el complejo específico antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) en la sección del tejido, puesto que este complejo no es visible directamente al microscopio, se han desarrollado varios métodos de detección del complejo Ag-Ac, unos directos y otros indirectos (Armengol-Butrón de Mujica y col. 1995).

La inmunofluorescencia directa se vale de un anticuerpo primario (policlonal o monoclonal), marcado con un fluorocromo que reacciona con el antígeno dentro de la muestra. Es un procedimiento de un solo paso y comprende un solo anticuerpo marcado. La visualización de las estructuras no es ideal a causa de la poca intensidad de la emisión de la señal (Ross y col. 2008).

La inmunofluorescencia indirecta tienen una sensibilidad mucho mayor que los métodos directos y con frecuencia recibe el nombre de “técnica del emparedado” o “de la capa doble”. En vez de conjugar un fluorocromo con un anticuerpo (primario) específico, dirigido contra el antígeno de interés, el fluorocromo se conjuga con un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario. Una ventaja adicional del método de marcación indirecta, es que un solo anticuerpo secundario puede usarse para localizar la unión de varios anticuerpos primarios diferentes (Ross y col. 2008).

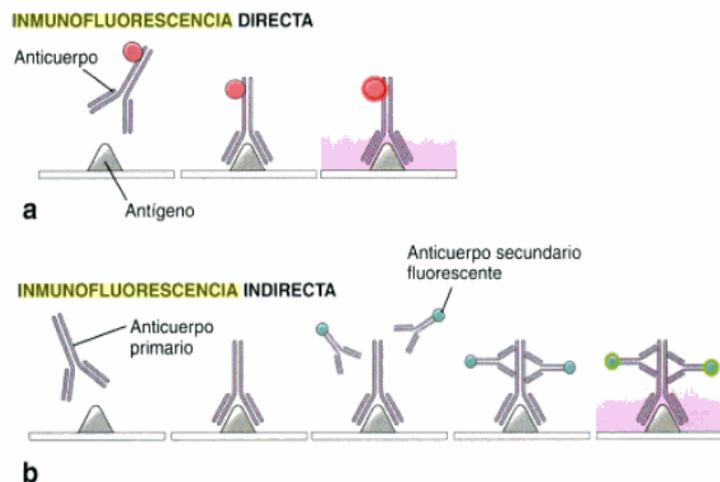


Figura No. 10. Inmunofluorescencia directa e indirecta. En la inmunofluorescencia directa (a), un anticuerpo primario marcado con un fluorocromo reacciona con un antígeno específico dentro de la muestra de tejido. El método indirecto (b) comprende dos procesos, primero los anticuerpos primarios específicos reaccionan con el antígeno de interés, después los anticuerpos secundarios que están marcados con fluorocromo, reaccionan con los anticuerpos primarios (Ross y col. 2008).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

4.6.2.2 Citometría de Flujo.

Algunos tipos celulares difieren en densidad, lo suficiente como para ser separados de acuerdo con esta propiedad física. Por ejemplo los glóbulos blancos (leucocitos) y los glóbulos rojos (eritrocitos), tienen densidades muy diferentes debido a que los eritrocitos no tienen núcleo, por ende estas células pueden ser separadas por centrifugación en equilibrio de densidad. Dado que la mayoría de los tipos celulares no pueden ser diferenciados con tanta facilidad, para separarlos pueden usarse otras técnicas como la citometría de flujo (Lodish y col. 2006).

La citometría de flujo, identifica diferentes células con la medición de la luz que dispersan y la fluorescencia que emiten a medida de que fluyen a través de un rayo láser, así puede clasificar células de un tipo en particular presentes en una mezcla (Lodish y col. 2006).

Los citómetros de flujo analizan las células en suspensión que interfieren individualmente sobre una fuente de luz. Cada célula cuando interfiere sobre el láser, provoca la emisión de señales luminosas permitiendo, diferenciar distintas poblaciones celulares dentro de una muestra analizada. Distingue varias características celulares tales como: tamaño, granulaciones, o reactividad con fluorocromos incubados con anticuerpos monoclonales. Es decir, la citometría de flujo se utiliza para el análisis de los distintos tipos celulares en una mezcla o suspensión, en base a las particularidades de los diferentes tipos celulares (García y col. 2006).

Mediante la citometría de flujo se pueden realizar numerosos tipos de ensayo, como la estimación del contenido en ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membrana y pH, así como la detección de antígenos, tanto en la superficie como en el citoplasma y orgánulos de las células por medio de anticuerpos marcados directa o indirectamente con fluorocromos. Permite también, la separación física de subpoblaciones de células según las características antigénicas, siempre que el citómetro disponga del sistema adecuado para ello (Canda-Sánchez, 2007).

Un citómetro de flujo, dispone de un tubo donde se pipetea la muestra que queremos analizar, la muestra pasa por una sonda de silicona que tiene un conducto estrecho (aprox. 60 nm), con objeto de que las células vayan alineadas unas detrás de otras. Las células que pasan por este conducto entran en un cilindro terminado en forma cónica, en el cual se absorbe a presión un líquido envolvente, que las empuja y las termina de alinear, para ello hay que ajustar la presión de dicho líquido (García y col. 2006).

Las células que van perfectamente alineadas, tienen que interseccionar con el rayo láser (sistema óptico). Cuando el rayo láser incide sobre las células produce una sombra, siendo ésta directamente proporcional al tamaño de las partículas. Dispone de un detector que transforma las señales luminosas en impulsos eléctricos. Si esta luz incide sobre una partícula que no es totalmente opaca puede atravesarla, la dispersión de esa luz es pequeña, pero al incidir sobre esa célula, si tiene muchas organelas su dispersión es mayor. El aparato posee un detector que se encuentra a 90° y emite una señal proporcional a la dispersión de luz recogida, esta dispersión es función directa de la granularidad, el detector envía la orden y éste la almacena (García y col. 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Las gotas del medio que envuelven las células previamente seleccionadas en función de diversos parámetros, son cargadas eléctricamente. Estas gotas con las células, al pasar entre dos condensadores son atraídas en función de su carga y colocadas en tubos separados (García y col. 2006).

De forma general un citómetro de flujo está compuesto por tres sistemas:

a) **Sistema de pipeteo y análisis**, es el sistema que recoge la muestra y la envuelve mediante un fluido.

- ✚ Inyección de la muestra.
- ✚ Cámara de flujo.

b) **Sistema óptico (fuentes de luz y detectores)**, está compuesto por dos tipos de ópticas, la óptica de excitación y la de lectura.

- ✚ Óptica de excitación, está formada por el láser y las lentes para enfocar y dirigir el haz de luz.
- ✚ Óptica de lectura, formada por las lentes de recolección de luz emitida, esta luz emitida es debida a la interacción del haz de láser y las partículas, el sistema de espejos y filtros que sirven para direccionar longitudes de onda específicas hacia los detectores.
- ✚ Filtros ópticos, filtran longitudes de onda hacia el detector. Estos filtros pueden ser de interferencia o de absorción.

- Filtros de interferencia, reflejan la longitud de onda no deseada.
- Filtros de absorción, absorben las longitudes de onda no deseadas.

Existen tres tipos:

- ✓ Filtro Band Pass, estos dejan pasar un rango de longitudes de onda.
- ✓ Filtro Short Pass, dejan pasar por debajo de una longitud de onda determinada.
- ✓ Filtro Long Pass, dejan pasar por encima de una longitud de onda determinada.

c) **Sistema eléctrico**, es el que transforma toda la información en señales digitales que se almacenan en el sistema informático.

- ✚ Amplificador – Convertidor.
- ✚ Sistema informático (García y col. 2006).

Los datos que se obtienen en un citómetro de flujo son el tamaño celular, la complejidad de la membrana y con el uso de fluorocromos se puede detectar hasta tres colores con un mismo láser (García y col. 2006).

La utilización de fluorocromos se basa en la particularidad de ciertas moléculas para emitir luz a una longitud de onda determinada, cuando son excitadas por un haz de luz con menor longitud de onda (por tanto mayor capacidad energética) (Canda-Sánchez, 2007).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Estas propiedades se encuentran en moléculas como la fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), u otros compuestos de nueva generación como pueden ser los Alexa-Fluor (Canda-Sánchez, 2007).

Habitualmente estas moléculas se emplean unidas covalentemente a anticuerpos, estreptavidina o cualquier otra que reconozca específicamente la característica que tengamos la intención de analizar (Canda-Sánchez, 2007).

Cuando las células o partículas a analizar atraviesan el punto de detección, la luz del láser es dispersada por la propia célula detectándose tanto la dispersión frontal (“Forward scatter” o FSC), que nos da una idea del volumen; como la dispersión lateral (“Side scatter” o SSC) que nos informa de la complejidad (Canda-Sánchez, 2007).

La representación gráfica de estos dos parámetros, permite diferenciar las poblaciones a analizar y descartar, la información procedente de restos celulares, agregados del medio extracelular o células apoptóticas que puedan alterar el análisis (Canda-Sánchez, 2007).

Señales de dispersión, la dispersión se produce al interaccionar la luz con una partícula, la cual produce un cambio de dirección, en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que producen dispersión celular son: el tamaño de la célula, la membrana, el núcleo y los gránulos contenidos en el citoplasma. Los citómetros de flujo miden dos señales de dispersión:

1. La luz dispersada en ángulo cónico pequeño que coincide con la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter), es proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
2. La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter), es proporcional a la complejidad interna de la partícula (García y col. 2006).

Señales de fluorescencia, en este caso se utilizan fluorocromos que son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior de menos energía. El espectro de absorción es el rango en el que un fluorocromo absorbe luz y el espectro de emisión es el rango en el que un fluorocromo emite luz (García y col. 2006).

Los citómetros detectan señales de fluorescencia de los complejos antígeno-anticuerpo, marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula (García y col. 2006).

Las células fluorescentes entran en la cámara de flujo de una en una y al pasar por delante del haz de luz láser, emiten luz fluorescente y dispersada, que es separada según la longitud de onda determinada por filtros y espejos. Estas señales se recogen por detectores y la información se analiza en el sistema informático (García y col. 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

5. JUSTIFICACIÓN.

Con base en los antecedentes expuestos, se ha demostrado que las hormonas sexuales, juegan un papel muy importante sobre la infección parasitaria causada por *T. crassiceps*, es por ello, que los experimentos realizados con las hormonas E₂, P₄, DHT y T₄ también tendrán un efecto directo sobre dicho parásito.

Los efectos que pueden tener estas hormonas sobre la organización, expresión de proteínas del cisticerco, así como en el proceso de crecimiento, establecimiento, reproducción o eliminación de sustancias tóxicas sin la participación del hospedero no han sido bien explorados, por lo que se supone, que dichos efectos son mediados a través de diversos mecanismos que presenta el parásito.

El demostrar que la organización y expresión de proteínas, así como de células que participan en la excreción de sustancias tóxicas para el parásito, son afectadas directamente por los esteroides sexuales (E₂, P₄, DHT y T₄), nos dará la pauta para entender y conocer más a fondo la proteómica, genómica y fisiología de este parásito, además, de proponer a los esteroides sexuales como candidatos para el diseño de fármacos (análogos), que actúen solo sobre el parásito y no sobre el hospedero.



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

6. HIPÓTESIS.

La expresión, organización e integridad de las proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps*, será modificada por el efecto de las hormonas sexuales (estradiol, progesterona, dihidrotestosterona, testosterona).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

7. OBJETIVOS.

7.1 Objetivo general.

Determinar el efecto *in vitro* que producen los esteroides sexuales (E2, P4, T4 y DHT), sobre la expresión y organización de las proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*, mediante análisis proteómico y microscópico.

7.2 Objetivos particulares.

Rrealizar el análisis diferencial del perfil proteómico de cisticercos de *Tenia crassiceps*, cultivados en presencia de estradiol, progesterona, testosterona y dehidrotestosterona.

Evaluar el efecto *in vitro* que producen las hormonas esteroides estradiol, progesterona, testosterona y dehidrotestosterona sobre la expresión de actina, miosina, tubulina y paramiosina en el cisticercos de la *Tenia crassiceps* por microscopia confocal.

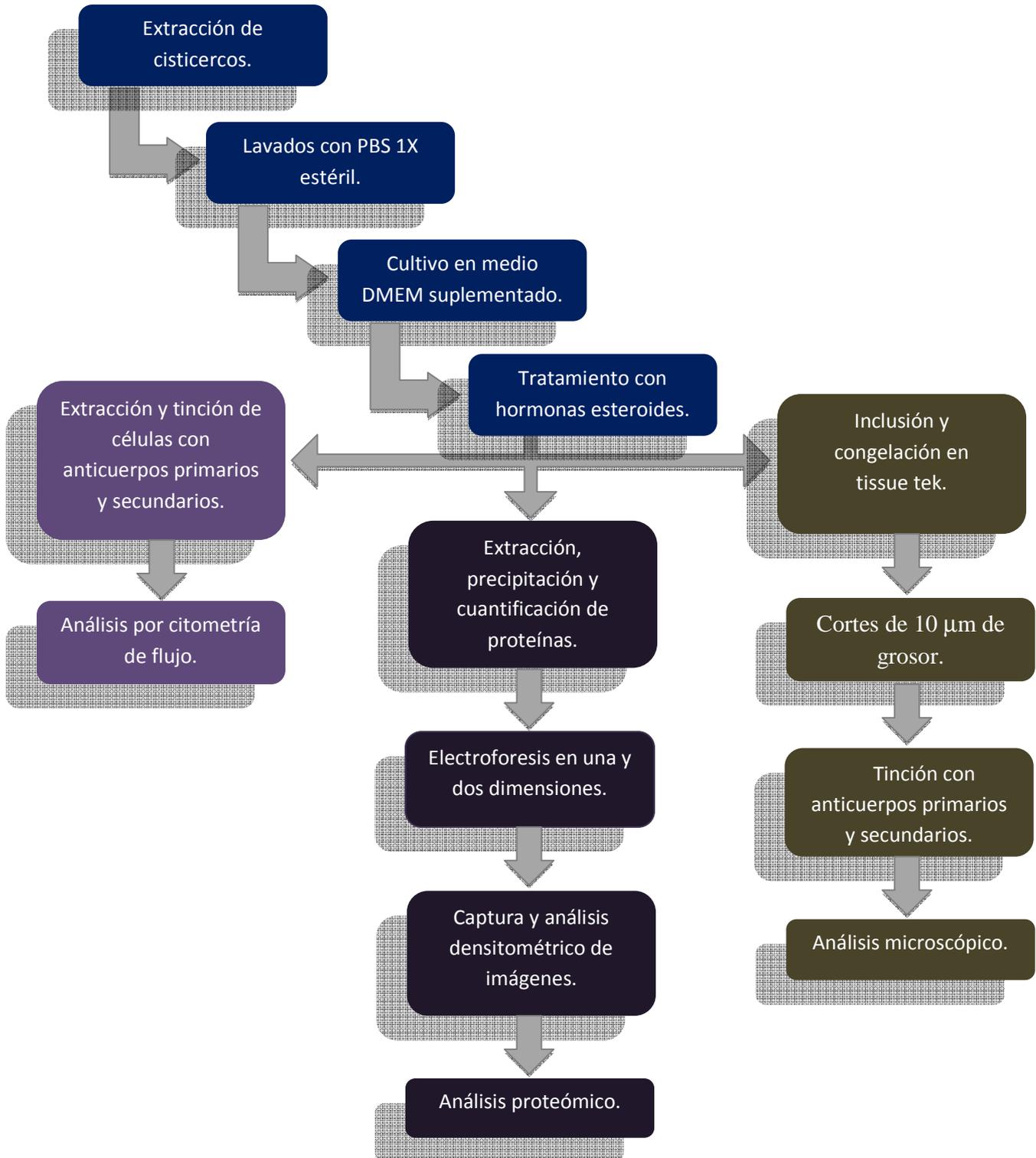
Determinar el efecto *in vitro* que producen las hormonas esteroides estradiol, testosterona y dehidrotestosterona sobre la expresión de actina, miosina, tubulina y paramiosina en el cisticercos de la *Taenia crassiceps* por citometría de flujo.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Diagrama general.





Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

8.2 Preparación de medio DMEM suplementado.

Para suplementar el medio de cultivo DMEM es necesario agregar los siguientes reactivos:

- HEPES al 5%
- Aminoácidos no esenciales al 2%
- L- Glutamina al 2%
- Antibiótico al 2% (penicilina- estreptomicina)

Pero debido a que se utilizó el medio de cultivo comercial DMEM: Advanced D-MEM 1X Gibco 12491-015 (D-Glucosa, aminoácidos no esenciales, 110 mg de piruvato de sodio, L-glutamina), solo se agregó: HEPES al 5% y antibiótico al 2%.

La preparación del medio de cultivo se realizó bajo condiciones estériles, el material utilizado se esterilizó previamente. Una vez suplementado el medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y una atmósfera de presión.

8.3 Preparación de hormonas esteroides (soluciones stock).

Se prepararon soluciones stock (un ml para cada una) de las diferentes hormonas esteroides. Para disolver el estradiol y la progesterona se utilizó medio de cultivo comercial DMEM sin suplementar, para disolver la dihidrotestosterona y la testosterona se utilizó etanol al 96%. Las hormonas utilizadas fueron de la marca Sigma-Aldrich.

Las concentraciones de soluciones stock y de dosis de hormona ocupada en cada tratamiento se muestran en la siguiente tabla.

Tabla No. 2. Concentración y dosis de hormonas para el cultivo de cisticercos de *T. crassiceps*.

Hormona	[Stock]	Cantidad agregada al medio	[Cultivo]
Control	-----	-----	-----
EtOH (vehículo)	96%	60 µL	-----
E ₂	10 µg/µL	40 µL	40 µg/mL
P ₄	10 µg/µL	20 µL	20 µg/mL
DHT	1 µg/µL	40 µL	4 µg/mL
T ₄	1 µg/µL	60 µL	6 µg/mL

8.4 Obtención de parásitos.

Se preparó una solución stock de PBS con una concentración de 10X, utilizando los siguientes reactivos:

- Cloruro de sodio (NaCl); Baker, 1 Kg, No. de Catálogo 3624-19
- Cloruro de potasio (KCl); Baker, 500 g, No. de Catálogo 3040-01
- Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄); Baker, 2.5 g, No. de Catálogo 3828-05
- Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)
- Agua MilliQ recién tomada del equipo.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

A partir de la solución de PBS 10 X, se preparó una solución con concentración de 1X, la cual se esterilizó y se utilizó para extraer los parásitos.

Empleando el modelo de cisticercosis experimental murina, se sacrificó por dislocación cervical un ratón stock hembra BALB/CA_nN, con 18 semanas de infección. Con el área perfectamente desinfectada se realizó una incisión en la cavidad peritoneal, de donde se extrajeron los cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF-WFV). Estos fueron colectados en PBS 1X estéril suplementado con 100 U/mL de antibiótico (Gibco, Grand Island) y se realizaron tres lavados con la misma solución. La extracción de parásitos se llevó a cabo en condiciones estériles.

8.5 Cultivo de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Se seleccionaron alrededor de cien cisticercos de tamaño y apariencia similares para cada tratamiento y se colocaron en botellas falcón, se les agregó 10 ml de medio DMEM suplementado y la dosis de hormona necesaria, ver tabla No. 2.

Posteriormente, los parásitos fueron incubados a 37 °C bajo una atmósfera constante de CO₂ al 5 %, durante cinco días. El cambio de medio de cultivo así como la adición de hormonas se realizó al primer día de cultivo, al tercero y al quinto día.

8.6 Extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas se preparó una solución de PBS 1X y una solución con inhibidores de proteasas a la cual llamamos solución A con inhibidores de proteasas, utilizando los siguientes reactivos:

- 🧪 **Fosfato de Sodio Monobásico (0.2 M)**; Baker, 500 g, No. de Catálogo 3818-01
- 🧪 **Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro (0.2 M)**; Baker, 2.5 g, No. de Catálogo 3828-05
- 🧪 **Cloruro de Potasio**; Baker, 500 g, No. de Catálogo 3040-01
- 🧪 **Cloruro de Magnesio**; Sigma, 100 g, No. de Catálogo M8266-100G
- 🧪 **Agua MilliQ** recién tomada del equipo.
- 🧪 **Inhibidores de proteasas**; Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, No. de Catálogo 04693 116 001.

Para preparar la solución A con inhibidores de proteasas, se tomaron 9.5 ml de una solución de fosfato de sodio monobásico (0.2 M) y 40.5 ml de una solución de fosfato de sodio dibásico anhidro (0.2 M), estos volúmenes se unieron y se aforaron a 100 ml con agua miliQ (buffer de fosfatos 0.1 M pH=7.4).

Posteriormente se tomaron 6.7 ml del buffer de fosfatos 0.1 M pH=7.4 y se le adiciono 0.281 g de KCl y 0.020 g de MgCl₂. Esta solución se aforo a 70 ml con agua miliQ y se ajustó el pH a 6.7, finalmente la solución se aforo a 100 ml.

A la solución final se le agregó la cantidad necesaria de inhibidores de proteasas: 1 tableta pesa aprox. 0.085 g la cual se disuelve en 50 ml de solución A.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Después de cinco días de cultivo los cisticercos fueron retirados de la incubadora, se les extrajo el medio de cultivo, se lavaron tres veces con cinco ml de PBS 1X no estéril (recién preparado) y por último se lavaron tres veces con cinco ml de solución A con inhibidores de proteasas.

Los parásitos fueron colocados en tubos falcón de quince ml y se homogenizaron en presencia de solución A con inhibidores de proteasas, haciendo uso de un homogenizador de tejidos Homogenizer PRO Scientific Inc, con una velocidad máxima durante diez segundos, este proceso se repitió tres veces. Posteriormente cada extracto se sonicó (Sonics and Materials Inc. Newtown, CT, USA), tres veces a una amplitud de 50% por treinta segundos cada uno, con un intervalo de un minuto entre cada sonicado, todo esto se realizó en un baño de hielo para evitar la degradación de proteínas.

8.7 Precipitación de proteínas.

Se prepararon dos soluciones: la primer solución con 10% de ácido tricloroacético (TCA) y 20 mM de ditioneitol (DTT) y la segunda solo con 20 mM de ditioneitol (DTT), las dos soluciones se diluyeron con acetona fría (a -20 °C).

- ✚ **Ácido tricloroacético (TCA)**, (10%); Fluka BioChemika 100 g, No. de Catálogo 91228.
- ✚ **Solución de DTT** (20 mM) en acetona a -20 °C, Plus One 1 g, Amersham Biosciences, No. de Catálogo 17-1381-01.

Los extractos de cada tratamiento se colocaron en tubos eppendorf, a los cuales se les agregó una solución de TCA al 10 % y 20 mM de DTT en acetona a -20 °C, en relación 1:1 respecto a la muestra. Esta mezcla se sonicó tres veces por diez segundos con una amplitud de 30%, esperando un minuto entre cada sonicado en baño de hielo, posteriormente estos tubos se incubaron a -20°C durante dos horas para llevar a cabo la precipitación.

Transcurrido el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante quince minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante, se adicionó al botón un ml de DTT (20 mM en acetona fría), se resuspendió la pastilla y se volvió a centrifugar a 10, 000 rpm durante quince minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100 µl de solución A con inhibidores de proteasas.

8.8 Cuantificación de proteínas.

Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas, se preparó una solución stock de albúmina con concentración de 10 mg/ml y se utilizaron los siguientes reactivos:

- ✚ **Solución de albúmina** (BSA) al 10 mg/ml; Sigma, Fracción V, 96.99%.
- ✚ **Solución A con inhibidores de proteasas**, ver apartado 8.6.
- ✚ **Reactivo A; solución alcalina de tartrato de cobre**, Bio-Rad, DC Protein Assay, Reagent A, 250 ml, No. de Catálogo 500-0113
- ✚ **Reactivo B; Folin diluido**, Bio-Rad, DC Protein Assay, Reagent A, 250 ml, No. de Catálogo 500-0114.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Se preparó una curva patrón con seis sistemas de diferentes concentraciones a partir de una solución stock de BSA (10 mg/ml), para llevar a cabo la cuantificación se utilizó el kit DC Protein Assay Reagents (Bio-Rad DC Protein Assay. Bio-Rad Laboratories), que utiliza como principio el método de Lowry.

Tabla No. 3. Curva patrón para la cuantificación de proteínas (microplaca). La curva patrón se realizó a partir de una solución stock de albúmina con concentración de 10 mg/ml, la cual fue diluida en solución A con inhibidores de proteasas.

Sistema	(μ l) Sol. Stock BSA [10 mg/ml]	(μ l) Sol A con inhibidores de proteasas	Conc. Final [mg/ml]
1	0	200	0
2	10	190	0.5
3	20	180	1
4	40	160	2
5	60	140	3
6	100	100	5

Se tomaron cinco μ L de cada sistema de la curva patrón y se depositaron cada uno, en un pozo diferente de una microplaca de noventa y seis pozos (Maxi Sorp), a estos se les agregó veinticinco μ L del reactivo A más doscientos μ L del reactivo B (kit DC protein assay reagents).

Se realizaron varias diluciones de la muestra problema, hasta obtener la dilución óptima para que cayera dentro de la curva patrón, encontrándose que la dilución óptima fue de 1:5 (un μ L de muestra más cuatro μ L de Sol. A con inhibidores de proteasas), a todo esto también se le agregó veinticinco μ L del reactivo A más doscientos μ L del reactivo B, las cuantificaciones se realizaron por triplicado y fueron leídas a una absorbancia de 750 nm mediante un espectrofotómetro (Microplate, BIO-TEK Instruments).

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se sacaron los promedios por cada tres lecturas y se calculó la concentración de proteínas presentes en la muestras, a través del método de regresión lineal. Finalmente se realizaron alícuotas de cada muestra, las cuales fueron guardadas a -70 °C para su posterior uso.

8.9 Electroforesis en una dimensión.

8.9.1 Preparación de gel de poliacrilamida.

En este caso se utilizó el tipo de electroforesis discontinua, en la cual fue necesario la preparación de dos geles; un gel concentrador con una concentración de 4% y un gel separador con una concentración del 10%.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Para la preparación de estos geles de poliacrilamida, fueron necesarios los siguientes reactivos:

- ✚ **Acrilamida al 30%**; Electrophoresis Purity Reagent, Bio-Rad, 500 g, No. de Catálogo 161-0101
- ✚ **Buffer Tris pH= 8.8**; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, J.T. Baker, 1Kg, No. de Catálogo 161-0719
- ✚ **Buffer Tris pH= 6.8**; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, J.T. Baker, 1Kg
- ✚ **SDS al 10%**; Sodium dodecyl sulfate, Electrophoresis Purity Reagent, 100 g Bio-Rad, No. de Catálogo 161-0301
- ✚ **TEMED**; N, N, N', N'- Tetra-methyl-ethylendiamine, 5 ml, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0800.
- ✚ **PSA al 10%**; Ammonium Persulfate 10 g, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0700
- ✚ **Agua MilliQ** recién tomada del equipo.

Tabla No. 4. Preparación de geles de poliacrilamida. El gel concentrador se preparó con una concentración al 4% y el gel separador se preparó con una concentración al 10%.

Gel concentrador al 4%.				
Reactivo	2 geles	4 geles	6 geles	Observaciones
Acrilamida al 30%	665 µl	1.33 ml	1.995 ml	No desgasificar
Buffer tris pH=6.8	1.25 ml	2.50 ml	3.75 ml	
Agua miliQ	3.0 ml	6.1 ml	9.0 ml	
SDS al 10%	50 µl	100 µl	150 µl	
Temed	5 µl	10 µl	15 µl	
PSA	25 µl	50 µl	75 µl	
Gel separador al 10%.				
Reactivo	2 geles	4 geles	6 geles	Observaciones
Acrilamida al 30%	7.42 ml	14.85 ml	22.27 ml	Desgasificar durante 20 minutos
Buffer tris pH=6.8	5.62 ml	11.25 ml	16.87 ml	
Agua miliQ	9.22 ml	18.45 ml	27.66 ml	
SDS al 10%	225 µl	450 µl	675 µl	Agregar después de desgasificar
Temed	11.25 µl	22.5 µl	33.75 µl	
PSA	112.5 µl	225 µl	337.5 µl	

Los cristales para preparar los geles de poliacrilamida, fueron lavados y secados perfectamente, antes de ser utilizados. Posteriormente se limpiaron con metanol para deslipidizarlos, se colocaron sobre un soporte y se procuró que quedaran a la misma altura para evitar derrames del gel.

Primero se preparó el gel separador (concentración al 10%), el cual se agregó inmediatamente hasta una altura aproximada de 1 cm del final del cristal pequeño. Posteriormente se agregó la cantidad necesaria de agua destilada para cubrir el gel y evitar la oxidación del mismo.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Una vez polimerizado el gel separador, se eliminó toda el agua destilada con ayuda de un papel filtro y se agregó el gel concentrador (concentración al 4%), preparado minutos antes. Rápidamente fue colocado un peine con cuidado para evitar la formación de burbujas. Una vez polimerizado el gel concentrador, se retiró el peine y el gel se utilizó para llevar a cabo la electroforesis en una dimensión.

8.9.2 Reducción de proteínas.

Las muestras fueron descongeladas y colocadas en un baño de hielo, se sonicaron tres veces a una amplitud de 20% por 10 segundos, con un intervalo de un minuto entre cada uno. Se preparó una solución de β -mercaptoetanol más Laemmli sample buffer, de acuerdo a lo siguiente:

Por cada 950 μ l de Laemmli sample buffer, se agregan 50 μ l de β -mercaptoetanol. En este caso se prepararon 250 μ l de Laemmli sample buffer, a los cuales se les agregó 13.16 μ l de β -mercaptoetanol. Los reactivos utilizados son los siguientes:

- ✚ **2-Mercaptoethanol (β -mercaptoethanol)**, 25 ml, molecular sigma biology, M-3148.
- ✚ **Laemmli sample buffer**, 30 ml BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0737.
- ✚ **P.M. (para teñir con Azul de Coomassie)**; Precision Plus Protein, All Blue Standards 500 μ l, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0373.
- ✚ **Control de actina**; Actina de Worthington, músculo de conejo 1 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation.

Se tomaron los volúmenes necesarios de cada muestra, correspondientes a 30 μ g de proteína (ver tabla No.5) y se colocaron en presencia de sustancias reductoras en proporción 1:1 (β -mercaptoetanol más Laemmli sample buffer), de acuerdo a la tabla No. 5, posteriormente se colocaron en baño María a ebullición durante cinco minutos y se procedió inmediatamente a cargar el gel de poliacrilamida recién preparado.

8.9.3 Separación electroforética en una dimensión.

La separación de proteínas se realizó en una cámara de electroforesis 1D mini-protean 3 (Bio-Rad) con buffer de corrida 1X, a 80 V por aproximadamente 30 minutos y posteriormente a 120 V durante 4°C.

Se preparó un buffer de corrida 5 X para electroforesis 1D (BIO-RAD) pH= 8.3, utilizando los siguientes reactivos:

- ✚ **Tris base**; Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 1 Kg, electrophoresis purity reagent, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0719.
- ✚ **Glicina**; Electrophoresis purity reagent, BIO-RAD, 1 Kg, No. de Catálogo 161-0718.
- ✚ **SDS**; Sodium dodecyl sulfate, 100 g, electrophoresis purity reagent, BIO-RAD, 100 g, No. de Catálogo 161-0301.
- ✚ **Agua destilada**, recién tomada.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

A partir del buffer de corrida 5X, se preparó un buffer con concentración de 1X.

Tabla No. 5. Distribución de muestras en el gel para electroforesis de una dimensión.

No. de Carril	µg de proteína (cargados)	µL de proteína (cargados)	µL BL+βME (agregados a cada muestra)	µL totales (cargados en el carril)
1. Vacío	----	----	----	----
2. P.M.	----	6	----	6
3. Control	30	10.67	10.67	21.34
4. Estradiol	30	10.65	10.65	21.3
5. Progesterona	30	16.21	16.21	32.42
6. DHT	30	12.13	12.13	24.26
7. Testosterona	30	11.08	11.08	22.16
8. Etanol	30	15.78	15.78	31.56
9. Actina	10	4	----	4
10. Vacío	----	----	----	----

8.9.4 Tinción con azul de Coomassie.

Para llevar a cabo la tinción de las proteínas, una vez terminada la separación electroforética, los geles fueron colocados en azul de Coomassie, durante una hora en agitación constante. Transcurrido el tiempo de tinción, se procedió a eliminar el exceso de colorante colocando el gel en una solución de desteñido hasta lograr el contraste deseado.

Para llevar a cabo la tinción y desteñido de los geles se utilizaron los siguientes reactivos:

🧪 **Azul de Coomassie**; Phast Gel Blue, Pharmacia.

Desteñido de geles 1D (solución de desteñido):

🧪 **Metanol al 50%**; J.T. Baker, 20 L, No. de Catálogo 9070-07

🧪 **Ácido acético al 10%**.

🧪 **Agua destilada**, recién tomada.

8.9.5 Captura y análisis de imágenes.

Para llevar a cabo la captura de las imágenes de los geles corridos en 1D, se utilizó el equipo Chemidoc XRS de Bio-Rad, con un filtro 3004 62 mm (ámbar), además del programa Quantity One version 4.6. Mediante este programa, se realizó un análisis densitométrico para observar los cambios en la intensidad de cada proteína separada, así como en el número de las mismas, correspondientes a cada tratamiento hormonal.

8.10 Electroforesis en doble dimensión.

Para llevar a cabo la electroforesis en doble dimensión se utilizaron geles prehechos de la marca invitrogen:

🧪 **Geles pre hechos**; Invitrogen, NUPAGE 4-12% BT 1.0, No. de Catálogo NP03306.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

8.10.1 Reducción de proteínas.

Observada la integridad de las proteínas en los geles corridos en 1D, se procedió a la realización de la separación en doble dimensión. Para ello se realizaron los cálculos necesarios para cargar los geles con 200 μg de proteína (tinción con azul de Coomassie), de acuerdo a la tabla No. 6.

Se corrieron tres geles por cada tratamiento, por lo tanto en total se corrieron dieciocho geles. Cada volumen de muestra (tratamiento), fue colocado en presencia de reactivos reductores: urea 7M, tiourea 2M, chaps al 4%, DTT 60 mM y anfolitos al 2%. Estas concentraciones debían estar en el volumen correspondiente a 200 μg de proteína. Para ello se pesaron las siguientes cantidades de reactivos:

Tabla No. 6. Cantidad necesaria de reactivos para reducir 600 μg de proteína.

Estrógenos		Andrógenos	
Control		Etanol	
Urea 7M	0.08978 g	Urea 7M	0.13271 g
Tiourea 2M	0.03251 g	Tiourea 2M	0.04805 g
Chaps 4%	0.008542 g	Chaps 4%	0.01262 g
DTT 60 mM	22.5 μL	DTT 60 mM	22.5 μL
Anfolitos 2%	7.5 μL	Anfolitos 2%	7.5 μL
Estradiol		DHT	
Urea 7M	0.08955 g	Urea 7M	0.10202 g
Tiourea 2M	0.03242 g	Tiourea 2M	0.03694 g
Chaps 4%	0.00852 g	Chaps 4%	0.00970 g
DTT 60 mM	22.5 μL	DTT 60 mM	22.5 μL
Anfolitos 2%	7.5 μL	Anfolitos 2%	7.5 μL
Progesterona		Testosterona	
Urea 7M	0.13638 g	Urea 7M	0.09317 g
Tiourea 2M	0.04938 g	Tiourea 2M	0.03373 g
Chaps 4%	0.01297 g	Chaps 4%	0.00886 g
DTT 60 mM	22.5 μL	DTT 60 mM	22.5 μL
Anfolitos 2%	7.5 μL	Anfolitos 2%	7.5 μL

Para el DTT se preparó una solución stock con concentración de 1M y a partir de ésta, se tomó la cantidad necesaria para tener una concentración de 60 mM en 125 μL de muestra, cantidad necesaria para hidratar una tira de isoelectroenfoque.

El volumen que se agregó de anfolitos a la muestra, fue el necesario para tener una concentración final del 2%, en los 125 μL de muestra.

Las cantidades pesadas de reactivos que se muestran en la tabla No. 6, están por triplicado, ya que se corrieron tres geles por tratamiento. Por tanto, cada muestra se aforó a 375 μL con solución de rehidratación, ya que cada tira se hidrata con 125 μL .



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Reducción de proteínas (2D):

- Urea 7M; Carbamide, Amersham Biosciences, Plus One.
- Tiourea 2M; extra pure, Riedel-de-Haën 1 Kg, No. de Catálogo 16217.
- Chaps 4%; Sigma, Ultra minimum 98% TLC, 5 Kg, No. de Catálogo C5070-5G.
- DTT 60 mM, Ditioneitol, Plus One, 1 g No. de Catálogo 17-1318-01.
- Anfolitos 2%, IPG buffer, pH= 3-10 Lineal, GE Healthcare, for rewelling of immobiline Dry Strip, simple preparation and loading, 1 ml concentrate, No. de Catálogo 17-6000-87.

Para poder llevar a cabo el aforo de las muestras, fue necesario la preparación de una solución de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, Chaps 4%, Azul de Bromofenol 0.2%).

Solución de rehidratación para aforar cada muestra a 125 µl:

- Urea 7M
- Tiourea 2M
- Chaps 4%
- Azul de bromofenol 0.2%

8.10.2 Hidratación de tiras.

Se colocaron charolas con carriles y en cada uno de ellos, se colocó una tira para isoelectroenfoque, cada tira se puso en contacto con 125 µL de muestra (previamente puesta en contacto con reactivos reductores), hasta observar que la tira aumentó su volumen y absorbió todo el líquido. Posteriormente se agregó un ml de aceite mineral por cada tira, para evitar la oxidación de las mismas. Estas tiras se dejaron en incubación por 16 horas a temperatura ambiente, protegidas y en un lugar nivelado.

Hidratación de tiras para Isoelectroenfoque:

- Tiras Isoelectroenfoque, Immobiline Dry Strip pH= 3-10 Lineal 7 cm, GE Healthcare, No. de Catálogo 17-6001-11.
- Aceite mineral; Mineral Oil, BIO-RAD, 500 ml, No. de Catálogo 163-2129

8.10.3 Isoelectroenfoque (separación por pI).

Transcurrido el tiempo de incubación de las tiras (16 horas), se colocaron puentes de papel filtro en cada electrodo de la cámara para isoelectroenfoque, previamente humedecidos con 10 µL de agua MilliQ. Las tiras fueron colocadas de manera que los geles (de las tiras), tocaran el puente de papel filtro. Finalmente se agregó un ml de aceite mineral sobre cada tira, se tapó la cámara y se comenzó a correr el isoelectroenfoque. Para ello se utilizó la unidad Protean IEF cell (Bio-Rad), 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. Al término del isoelectroenfoque las tiras fueron colocadas en una charola limpia y se congelaron a -70°C, para el día siguiente llevar a cabo la separación en base al peso molecular.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

🚧 **Puentes de papel filtro**; Protean IEF System, BIO-RAD, Electrode Wicks, 500 piezas, No. de Catálogo 1654071.

8.10.4 Rehidratación de tiras.

Para llevar a cabo la separación de las proteínas por peso molecular, fue necesario rehidratar las tiras corridas en el isoelectroenfoco. Para ello se preparó una solución de equilibrio (Tris Base pH=8.8, Urea 6M, Glicerol al 30%, SDS al 2%, Azul de Bromofenol al 0.4%). Una vez preparada esta solución se dividió en dos partes, a una de éstas se le agregó de DTT al 1% y a la otra se le agregó iodoacetamida al 2.5%.

Rehidratación de tiras:

✓ **Buffer de equilibrio**

- 🚧 Tris Base pH= 8.8
- 🚧 Urea 6M
- 🚧 Glicerol al 30%; Plus One, 1L, No. de Catálogo 17-1325-01
- 🚧 SDS al 2%
- 🚧 Azul de Bromofenol 0.4%

✓ **Buffer de equilibrio con DTT al 1%**; Ditiotreititol, Plus One, 1 g No. de Catálogo 17-1318-01.

✓ **Buffer de equilibrio con Iodoacetamida al 2.5%**; GE Healthcare, Amersham, 25 g, No. de Catálogo RPN6302V.

Las tiras se sacaron del congelador y fueron colocadas primeramente en la solución de equilibrio con DTT durante 15 minutos, en agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo, las tiras fueron puestas en contacto con la otra solución de equilibrio, con iodoacetamida y de igual manera fueron colocadas en agitación constante, durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Posteriormente cada tira fue lavada con 1 ml de agua milliQ para eliminar residuos tóxicos.

8.10.5 Separación electroforética por peso molecular (Doble dimensión).

Las tiras ya rehidratadas, se colocaron sobre geles prehechos 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 a 200 V y 4°C, en una mini cámara XCell Sure. Se preparó buffer de corrida 1X (Invitrogen), a partir de uno 20X.

Corrida de electroforesis 2D (Invitrogen):

- 🚧 **Buffer de corrida 1 X** a partir de un buffer 20 X; Invitrogen, NUPAGE, MES SDS Running Buffer 20 X, No. de Catálogo NP0002.
- 🚧 **Antioxidante**; Invitrogen, NUPAGE, No. de Catálogo NP0005.
- 🚧 **Geles pre hechos**; Invitrogen, NUPAGE 4-12% BT 1.0, No. de Catálogo NP03306.
- 🚧 **P.M. (para teñir con Sypro Ruby)**; Precision plus protein standards, Unstained, 500 µl, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0363.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

8.10.6 Tinción con azul de Coomassie.

Terminada la separación de las proteínas por peso molecular, los geles fueron colocados en azul de Coomassie, durante una hora en agitación constante y temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de tinción se procedió a eliminar el exceso de colorante, colocando los geles en una solución de metanol al 50 % y ácido acético al 10% en agua destilada, hasta lograr el contraste deseado.

8.10.7 Captura de imágenes (Quantity one).

Para llevar a cabo la captura de la imagen de cada gel, se utilizó el equipo Chemidoc XRS de Bio-Rad, además del programa Quantity One versión 4.6 con un filtro 3004 62 mm ámbar.

8.10.8 Análisis de imágenes (PD Quest).

Una vez capturadas las imágenes, se llevo a cabo el análisis de los mismas mediante el programa PD Quest versión 7.4.0 (Bio-Rad), en donde se procedió a obtener un gel “master” a partir de las tres repeticiones de cada tratamiento. A partir de este programa se pudieron obtener datos como la intensidad de cada proteína (isoforma).

8.11 Citometría de flujo.

8.11.1 Obtención de parásitos.

Se preparó una solución stock de PBS con una concentración de 10X, de acuerdo al apartado 8.4. A partir de la solución de PBS 10 X, se preparó una solución con concentración de 1X, la cual se esterilizó y se utilizó para extraer los parásitos.

Utilizando el modelo de cisticercosis experimental murina, se sacrificó un ratón stock hembra BALB/CAnN, con 18 semanas de infección, por dislocación cervical. En un ambiente estéril, se realizó una incisión en la cavidad peritoneal del ratón y se extrajeron los cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF-WFV). Estos se colectaron en PBS 1X estéril suplementado con 100 U/mL de antibiótico (Gibco, Grand Island) y se realizaron tres lavados con la misma solución.

8.11.2 Cultivo de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Se seleccionaron alrededor de treinta cisticercos de tamaño y apariencia similares (aproximadamente de 2 mm de diámetro), por cada tratamiento y se colocaron en placas estériles de 24 pozos. Por cada pozo, se colocaron diez cisticercos y a cada pozo se les agregó 1 ml de medio DMEM suplementado, además de la dosis de hormona necesaria (ver tabla No. 2).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Posteriormente, los parásitos fueron incubados a 37 °C bajo una atmósfera constante de CO₂ al 5 %, durante cinco días. El cambio de medio de cultivo así como la adición de hormonas, se realizó cada 48 horas.

8.11.3 Extracción de células.

La metodología para la extracción de células de cisticercos de *Taenia crassiceps* se realizó de acuerdo a lo descrito por Nava-Castro y col. 2011. Transcurridos los días de cultivo, los parásitos fueron macerados completamente con una malla de nylon tipo "sándwich" (150 mm. Small Parts) y un émbolo de una jeringa.

Las células maceradas, fueron colectadas en 1ml de buffer de FACS, empleándose células de bazo de ratón como control de calibración del FACS. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 100 µl de buffer de fijación (PBS, 2% de paraformaldehído). Se incubaron a 37 °C durante 10 minutos y a continuación, las células se permeabilizaron con 1 ml de metanol a -20°C durante 30 minutos en un baño de hielo. Transcurrido el tiempo, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se lavaron tres veces con buffer de tinción (PBS, 2% de FBS, 0,02% de azida de sodio).

8.11.4 Tinción con anticuerpo primario.

Posteriormente, las células fueron centrifugadas y el botón se resuspendió con 1 ml de buffer de FACS. Finalmente se volvieron a centrifugar y el botón se resuspendió en:

- 100 µl B. FACS → para los tratamientos
- 200 µl B.FACS → para los controles

Los volúmenes anteriores (100µl y 200µl), fueron divididos en diferentes tubos eppendorf; 30µl de muestra en cada tubo. A cada uno de éstos se les agregó 30 µl de α-FC (1:100 Blocking), para evitar un pegado inespecífico del anticuerpo secundario y se incubaron 30 minutos en baño de hielo. Transcurrido el tiempo, se agregó a cada tubo, 1 ml de buffer de FACS, se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 30 µl de anticuerpo primario: anti α-actina de conejo, tubulina y miosina 1 µg/µl de Santa Cruz, Biotech. Las muestras se incubaron 10 minutos en baño de hielo.

8.11.5 Tinción con anticuerpo secundario.

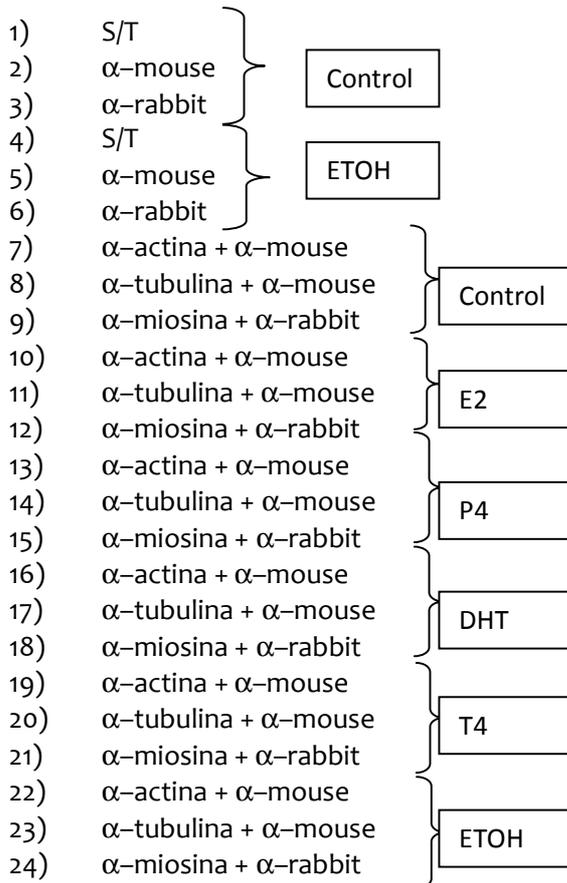
Transcurrido el tiempo se agregó 1 ml de buffer de FACS a las muestras, se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 30 µl de anticuerpo secundario conjugado a FITC 1:200 (α-ratón, α-conejo). Las muestras se incubaron 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se les agregó 1 ml de buffer de FACS, se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 100 µl de paraformaldehído. Los tubos se almacenaron a 4°C protegidos de la luz, hasta el momento del análisis.

8.11.6 Análisis por citometría de flujo.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo utilizando un FACS Calibur (BD, Biosciences) y los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo. La siguiente lista, muestra el orden en que fueron capturadas y analizadas las muestras en el citómetro de flujo:



8.12 Microscopía confocal.

8.12.1 Obtención de parásitos.

La obtención de parásitos se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 8.4 y 8.11.1.

8.12.2 Cultivo de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Se seleccionaron alrededor de treinta cisticercos de tamaño y apariencia similares por cada tratamiento y se colocaron en placas estériles de 24 pozos. Por cada pozo se colocaron diez cisticercos y a cada pozo se les agregó 1 ml de medio DMEM suplementado, además de la dosis de hormona necesaria (ver tabla No.2).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Posteriormente, los parásitos fueron incubados a 37 °C bajo una atmósfera constante de CO₂ al 5 %, durante cinco días. El cambio de medio de cultivo así como la adición de hormonas se realizó al primer día de cultivo, al tercero y al quinto día.

8.12.3 Obtención y fijación de tejidos.

Transcurridos los días de cultivo, los cisticercos fueron colocados en cápsulas beem y se sumergieron en una solución de inclusión “tissue-tek” (Sakura, USA) y se congelaron a -70°C, hasta el día de su análisis.

Posteriormente, se realizaron cortes de cada parásito (10 µm de espesor) a través de un criostato (CM Leica 1100), los cuales se recibieron en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

Los cortes de tejido, se fijaron con acetona fría (-20 °C) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se realizó un lavado con PBS (1X) y los tejidos fueron incubados por 5 minutos a temperatura ambiente (Valverde y col. 2011).

8.12.4 Unión con anticuerpos.

Posterior a la fijación, se realizó un lavado con PBS 1X + Tw₂₀, y después un lavado con PBS (1X). Estos pasos se repitieron 2 veces, para un total de tres lavados con PBS (1X) y tres lavados con PBS 1X + Tw₂₀. Se decantó completamente el líquido y se agregó solución de bloqueo. Los tejidos se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron 1 hora a 37°C.

Transcurrido el tiempo, se decantó la solución de bloqueo y se realizaron tres lavados con PBS (1X) y tres lavados con PBS 1X + Tw₂₀. Enseguida se agregó a cada tejido la cantidad necesaria de anticuerpo, éstos fueron diluidos con solución de bloqueo y se agregaron de la siguiente manera:

Para la detección de actina, las muestras se incubaron en presencia de Alexa-Fluor®594 faloidina (Invitrogen™) dilución 1:40.

Para la detección de miosina II, las muestras se incubaron con anticuerpo policlonal generado contra la miosina II de *T. solium* (Kumar y col. 2003), diluido 1:1000, después, se incubaron con un anticuerpo biotinilado anti IgG de conejo (H + L) (Vector Lab. Burlingame), diluido 1:30 y finalmente, se incubaron con una solución de avidina-rodamina (1:50).

Para la detección de α-tubulina, las criosecciones se incubaron con anticuerpo DM-1A, diluido 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a FITC diluido 1:30. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda, durante 1 hora, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Los núcleos se tiñeron con DAPI (50 µg/ml) (Sigma®) durante 30 min a temperatura ambiente, 5 min antes de que los tejidos se examinaran. Todas las preparaciones se lavaron con PBS. Los



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

controles fueron preparados como se describió anteriormente pero sin utilizar el anticuerpo primario.

Microscopía Confocal:

- ✓ PBS 1X
- ✓ PBS 1X + Tw₂₀ 0.3% (100 ml)
 - ✚ 99.7 ml PBS 1X + 0.3 ml Tw₂₀

- ✓ Sol. de Bloqueo; PBS 1X + Tw₂₀ 0.3% + BSA (albúmina) 2% (5 ml)
 - ✚ 5 ml PBS 1X + Tw₂₀ 0.3% + 0.1 g de BSA

8.12.5 Detección de la reacción mediante microscopia confocal.

Antes de la observación, los portaobjetos se lavaron con PBS y se montaron en solución de montaje comercial para preservar la fluorescencia (Dako, CA, EE.UU.).

Las secciones fueron analizadas en un microscopio confocal Olympus FluoView™ FV 1000 a 10X (UPLSAPO), 40X (UPLFLN) y 100X (UPLSAPO).

La observación de las muestras control, se realizó en secciones criogénicas de parásitos, incubadas sólo con los anticuerpos secundarios.

9. RESULTADOS.

9.1 Cuantificación de proteínas.

Tabla No. 7. Concentración final de los sistemas de la curva patrón.

Sistema	Cantidad (µg) en 5 µL del Stock que se agregó a c/sistema	Concentración (µg/µL)	Absorbancia (Promedio)
1	0	0	0
2	2.5	0.5	0.068
3	5	1	0.126
4	10	2	0.246
5	15	3	0.309
6	25	5	0.500

Las absorbancias mostradas son el promedio obtenido de cada sistema. A partir de estos datos, se realizó un análisis mediante regresión lineal y se obtuvieron los siguientes parámetros:

$$b = 0.0205$$

$$m = 0.0196$$

$$r = 0.9955$$

$$r^2 = 0.9910$$



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Posteriormente, con los parámetros de la regresión lineal, se logró obtener la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras diluidas (1:5), ver apartado 8.8.

Tabla No. 8. Concentración final de las muestras (proteínas).

Tratamiento	Absorbancia (Promedio)	[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] Alícuotas
C	0.2956	2.80954
E ₂	0.2963	2.81668
P ₄	0.2016	1.84960
EtOH	0.2066	1.90066
DHT	0.2626	2.47254
T ₄	0.2856	2.70742

Las absorbancias mostradas son el promedio de cada tratamiento.

9.2 Separación electroforética en una dimensión.

La siguiente imagen muestra las bandas correspondientes al corrimiento electroforético de proteínas extraídas de cisticercos de *Taenia crassiceps*, tratadas con las hormonas esteroideas ya descritas, ver apartado 8.9. Las imágenes de los geles unidimensionales, así como de sus respectivos densitogramas fueron capturadas y analizadas con el programa Quantity One.

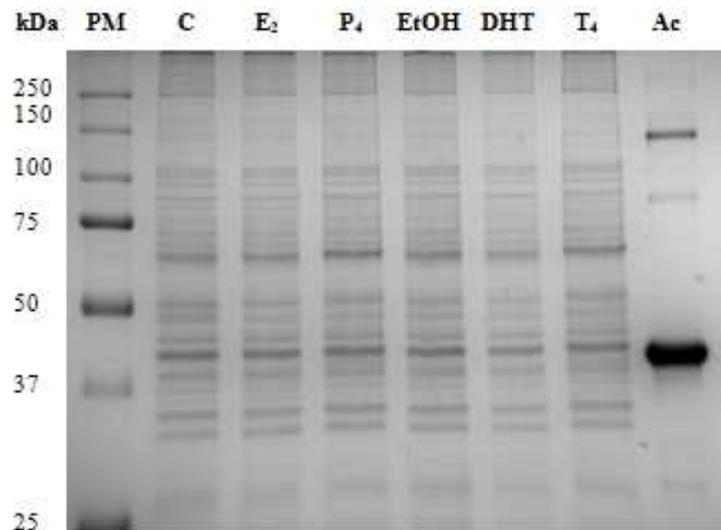


Figura No. 11. Corrimiento electroforético en una dimensión, de proteínas extraídas de cisticercos de *T. Crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Geles de poliacrilamida al 10% con 30 μg de proteína en cada pozo.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

La siguiente imagen muestra los cambios presentados en el número de proteínas, correspondientes al corrimiento electroforético en una dimensión.

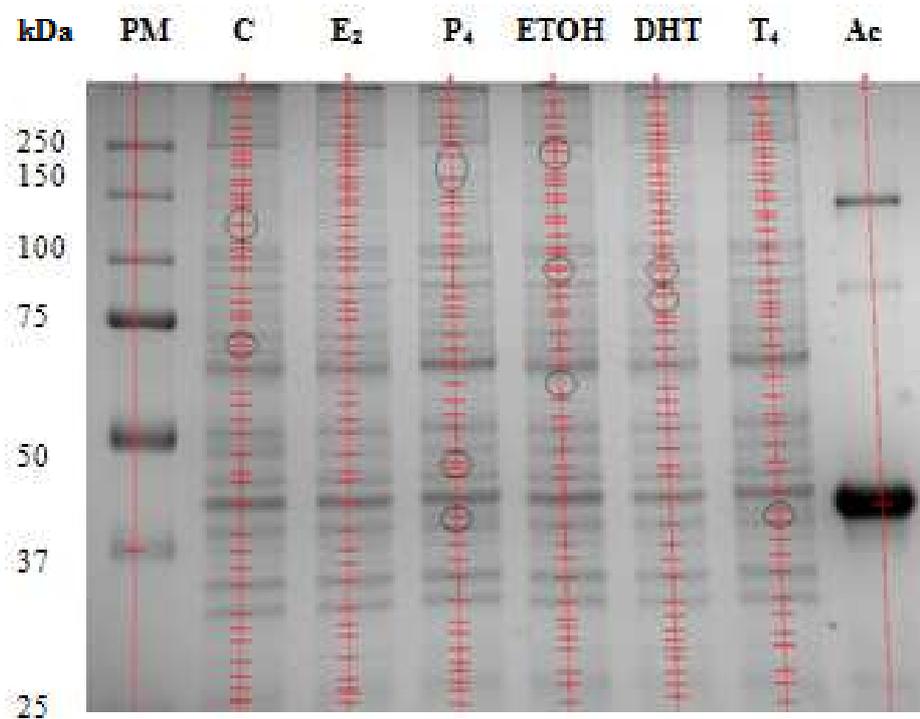


Figura No. 12. Cambios en el número de bandas del corrimiento electroforético en una dimensión. Proteínas extraídas de cisticercos de *T. Crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroides. Geles de poliacrilamida al 10% con 30 μg de proteína en cada pozo.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

El siguiente densitograma, muestra los cambios efectuados en la intensidad de bandas, correspondientes al corrimiento electroforético de proteínas extraídas de cisticercos de *Taenia crassiceps* tratadas con estradiol.

En color rojo se observa la intensidad de las proteínas control, mientras que en el color verde se observan las proteínas tratadas con estradiol.

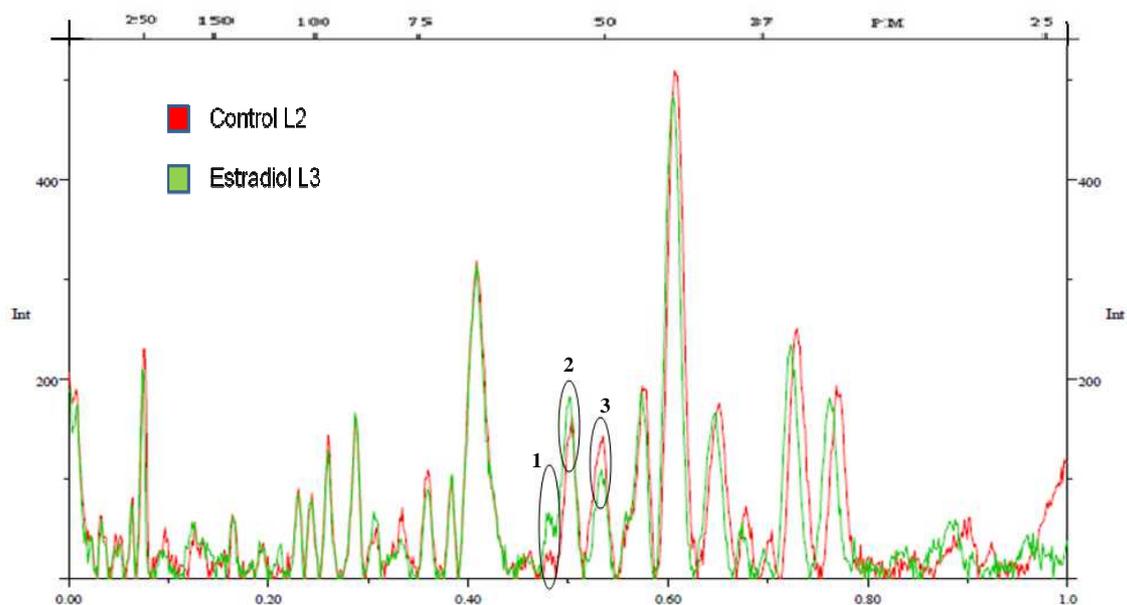


Figura No. 13. Análisis densitométrico de proteínas control (rojo) y proteínas tratadas con estradiol (verde). En el eje de las ordenadas (Y) se observa la intensidad de cada proteínas, mientras que en el eje de las abscisas (X), se observa el frente relativo (parte inferior) y el peso molecular (parte superior).

En la imagen observamos que las proteínas marcadas con los números uno y dos presentaron un aumento en la intensidad, mientras que la proteína marcada con el numero tres, presentó una disminución en la intensidad con respecto al control.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

El siguiente densitograma, muestra los cambios efectuados en la intensidad de las bandas, correspondientes al corrimiento electroforético de proteínas extraídas de cisticercos de *Taenia crassiceps*, tratadas con progesterona.

En color rojo se observa la intensidad de las proteínas control, mientras que en el color verde se observan las proteínas tratadas con progesterona.

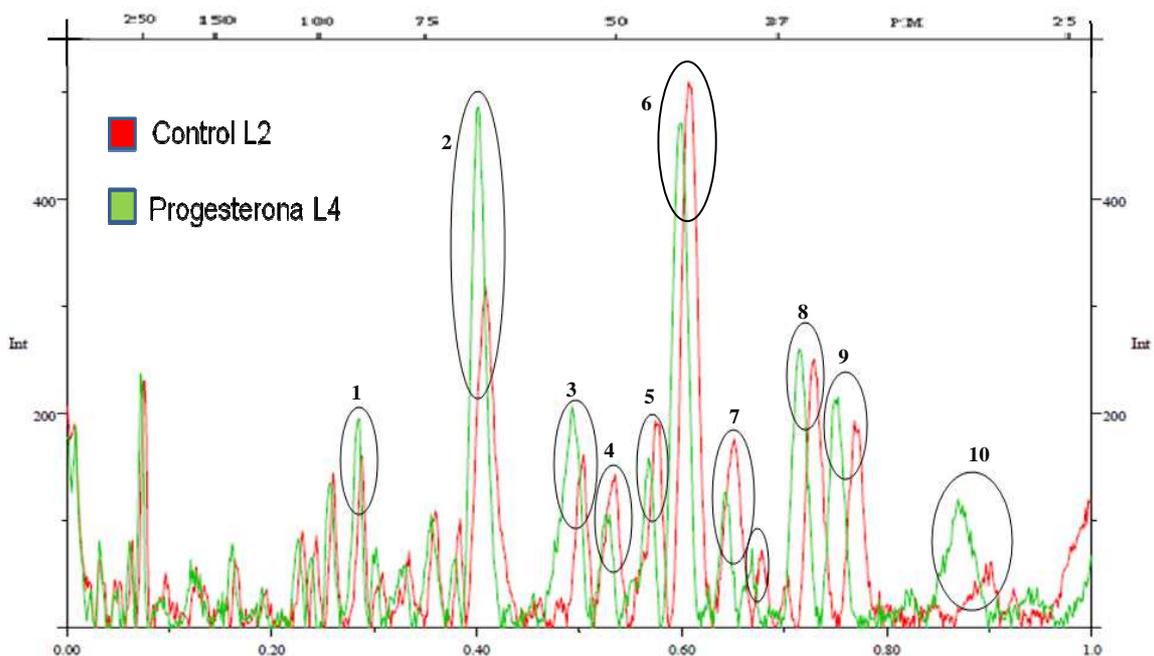


Figura No. 14. Análisis densitométrico de proteínas control (rojo) y proteínas tratadas con progesterona (verde). En el eje de las ordenadas (Y), se observa la intensidad de cada proteína, mientras que en el eje de las abscisas (X), se observa el frente relativo (parte inferior) y el peso molecular (parte superior).

En la imagen observamos que las proteínas marcadas con los números cuatro, cinco, seis y siete presentaron una disminución en la intensidad, mientras que las proteínas marcadas con



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Los números uno, dos, tres, ocho, nueve y diez presentaron un aumento en la intensidad con respecto a las proteínas control.

El siguiente densitograma, muestra los cambios efectuados en la intensidad de las bandas correspondientes al corrimiento electroforético de proteínas extraídas de cisticercos de *Taenia crassiceps* tratadas con dihidrotestosterona.

En color rojo se observa la intensidad de las proteínas control, mientras que en el color verde se observan las proteínas tratadas con dihidrotestosterona.

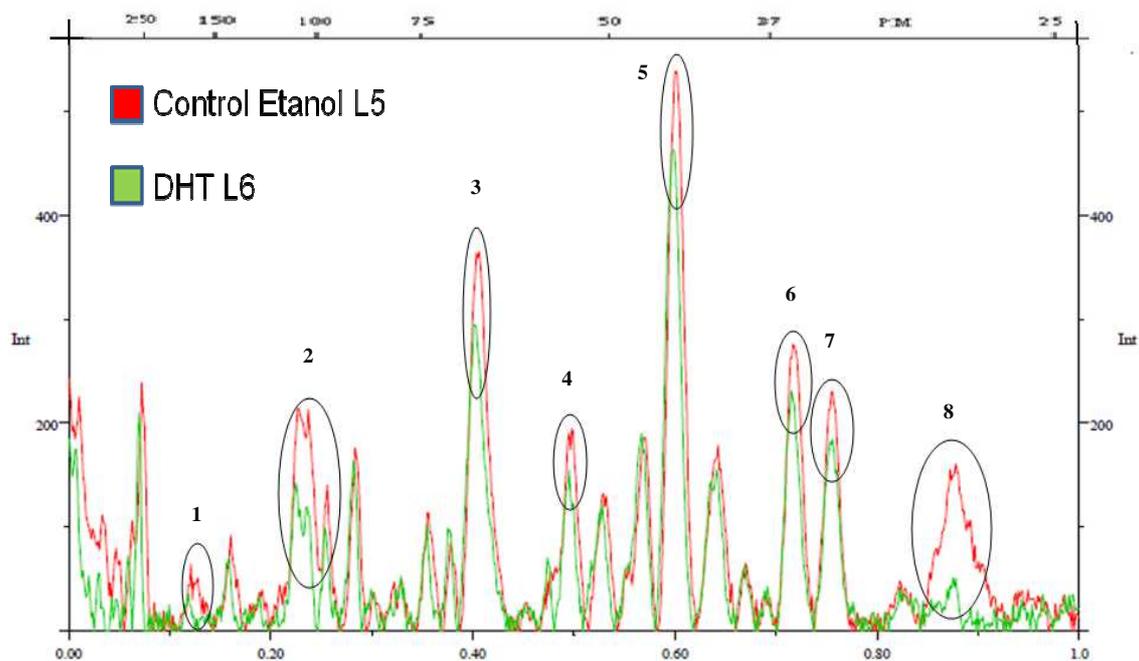


Figura No. 15. Análisis densitométrico de proteínas control (rojo) y proteínas tratadas con dihidrotestosterona (verde). En el eje de las ordenadas (Y), se observa la intensidad de cada proteína, mientras que en el eje de las abscisas (X), se observa el frente relativo (parte inferior) y el peso molecular (parte superior).

En la imagen podemos observar que todas las proteínas marcadas, presentaron una disminución en la intensidad, con respecto a las proteínas control con vehículo (Etanol).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

El siguiente densitograma, muestra los cambios efectuados en la intensidad de las bandas correspondientes al corrimiento electroforético de proteínas extraídas de cisticercos de *Taenia crassiceps* tratadas con testosterona.

En color rojo se observa la intensidad de las proteínas control, mientras que en el color verde se observan las proteínas tratadas con testosterona.

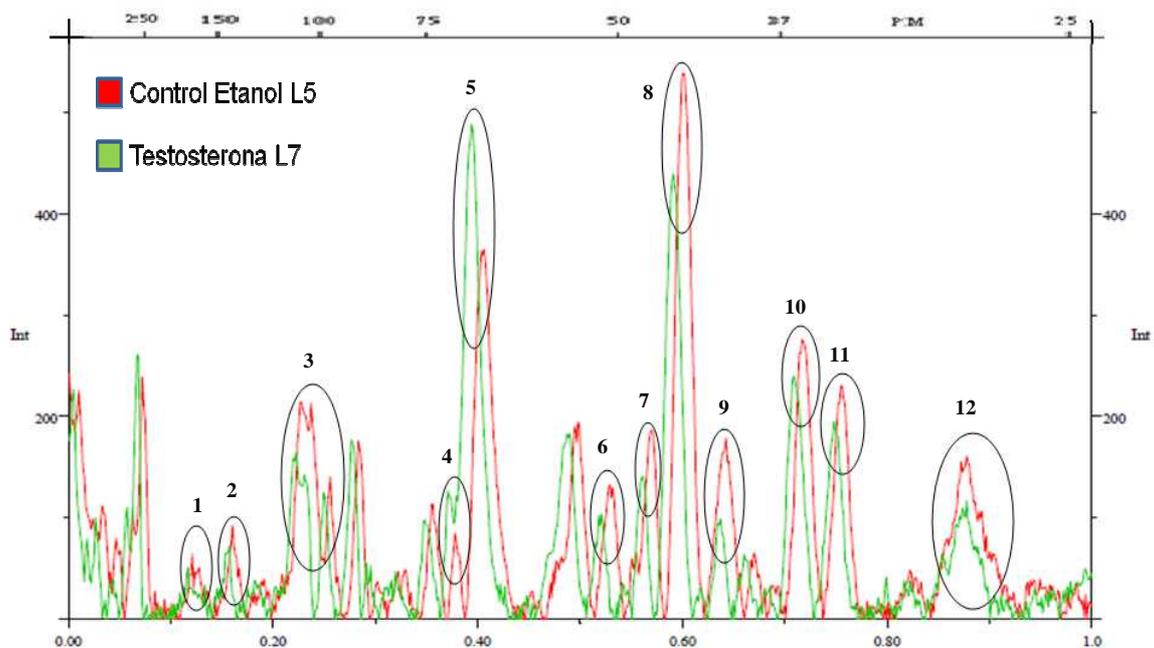


Figura No. 16. Análisis densitométrico de proteínas control (rojo) y proteínas tratadas con testosterona (verde). En el eje de las ordenadas (Y), se observa la intensidad de cada proteínas, mientras que en el eje de las abscisas (X), se observa el frente relativo (parte inferior) y el peso molecular (parte superior).

En la imagen observamos que las proteínas marcadas con los números uno, dos, tres, seis, siete, ocho, nueve, diez, once y doce presentaron una disminución en la intensidad, mientras



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

que las proteínas marcadas con los números cuatro y cinco presentaron un aumento en la intensidad con respecto a las proteínas control con vehículo (etanol).

Una vez que se obtuvieron los densitogramas en base al programa Quantity one, se obtuvo la intensidad (expresión) de cada proteína, así como su RF (Frente Relativo).

A continuación se muestran las tablas correspondientes a los cambios ocurridos entre cada tratamiento con respecto a los controles.

Control contra estradiol.

Tabla No. 9. Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con estradiol. Cambios presentes con respecto a las proteínas control.

No. Cambio	C	E ₂	RF
1	29.4	66.4	0.488
2	158	179	0.507
3	144	112	0.539

Control contra progesterona.

Tabla No. 10. Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con progesterona. Cambios presentes con respecto a las proteínas control.

No. Cambio	C	P ₄	RF
1	159	194	0.291
2	321	488	0.408
3	158	197	0.499
4	144	106	0.534
5	193	157	0.572
6	179	121	0.647
7	73.3	69.4	0.672
8	255	263	0.720
9	192	217	0.754
10	60.4	122	0.878

Control (etanol) contra dihidrotestosterona.

Tabla No. 11. Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con dihidrotestosterona. Cambios presentes con respecto a las proteínas control.

No. Cambio	EtOH	DHT	RF
1	51.9	37.6	0.127



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

2	185	140	0.236
3	365	298	0.411
4	198	155	0.502
5	542	469	0.605
6	280	232	0.720
7	232	186	0.758
8	158	61.4	0.878

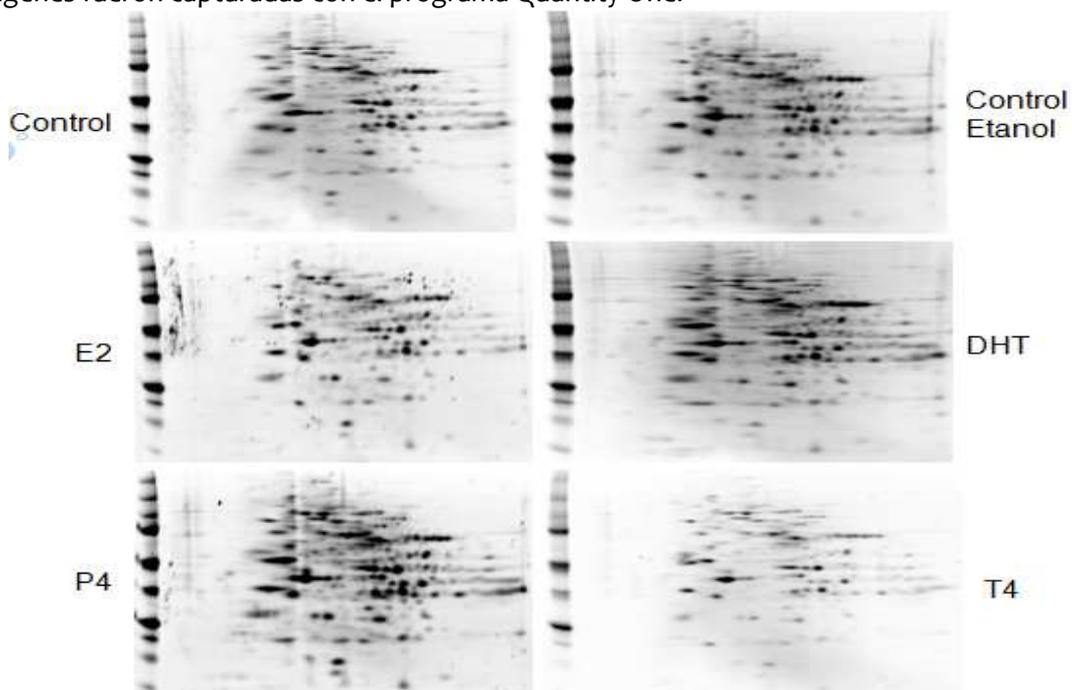
Control (etanol) contra testosterona.

Tabla No. 12. Intensidad y frente relativo de las proteínas tratadas con testosterona. Cambios presentes con respecto a las proteínas control.

No. Cambio	EtOH	T ₄	RF
1	51.9	50.3	0.127
2	84.7	72.1	0.165
3	185	167	0.236
4	80.7	125	0.386
5	365	494	0.411
6	135	108	0.525
7	196	147	0.574
8	542	435	0.605
9	200	96.6	0.640
10	280	244	0.720
11	232	191	0.758
12	158	116	0.878

9.3 Electroforesis en doble dimensión.

Los siguientes mapas proteómicos, corresponden al corrimiento electroforético en doble dimensión, de geles prehechos cargados con 50 µg de proteína y teñidos con Sypro Ruby, ver apartado 8.10. Se corrió un gel por cada tratamiento con las hormonas ya descritas. Las imágenes fueron capturadas con el programa Quantity One.





Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 17. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas previamente con hormonas esteroideas. Control; estradiol (E2); progesterona (P4), control de etanol (vehículo); dihidrotestosterona (DHT), testosterona (T4). Geles prehechos cargados con 50 µg de proteína y teñidos con Sypro Ruby.

Los siguientes mapas proteómicos cargados con 200 µg y teñidos con azul de Coomassie, muestran el corrimiento en doble dimensión de proteínas control extraídas de cisticercos de taenia crassiceps. En la parte superior izquierda podemos observar al gel master, mientras que en las otras tres imágenes podemos observar las tres repeticiones de las mismas proteínas. El análisis para la electroforesis en doble dimensión, se realizó con el programa PDQuest. El gel master se obtiene del análisis con el programa y se entiende como el conjunto de datos de las tres repeticiones.

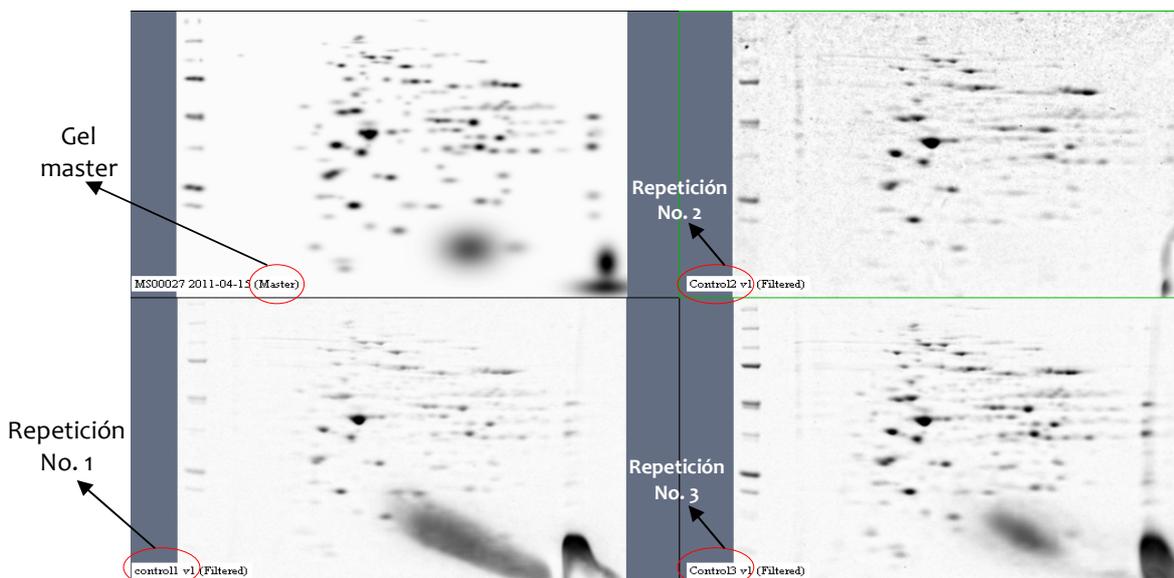


Figura No. 18. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Geles Control. Teñidos por azul de Coomassie.



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

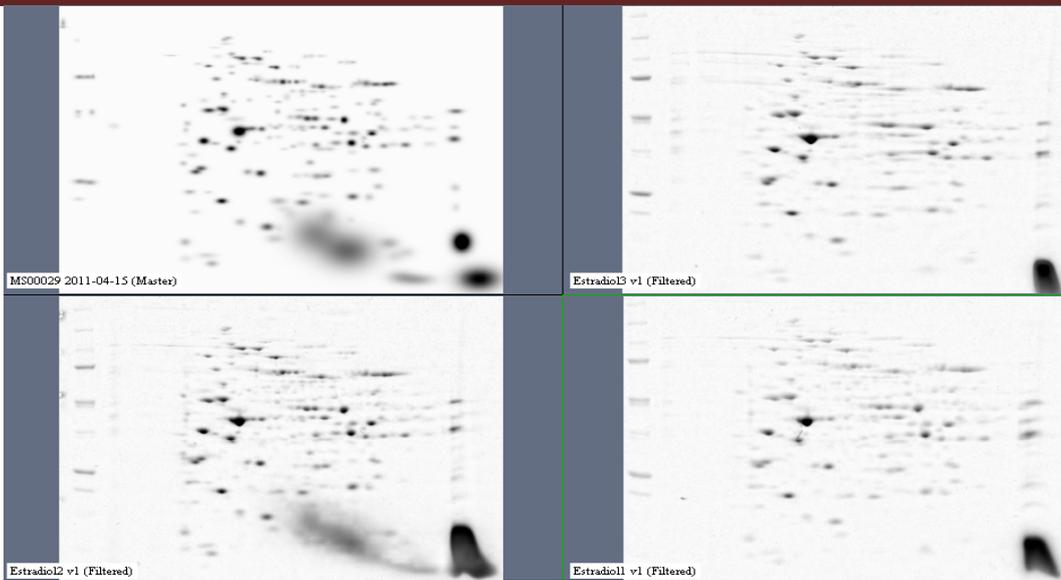


Figura No. 19. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Tratamiento estradiol. Teñidos por azul de Coomassie.

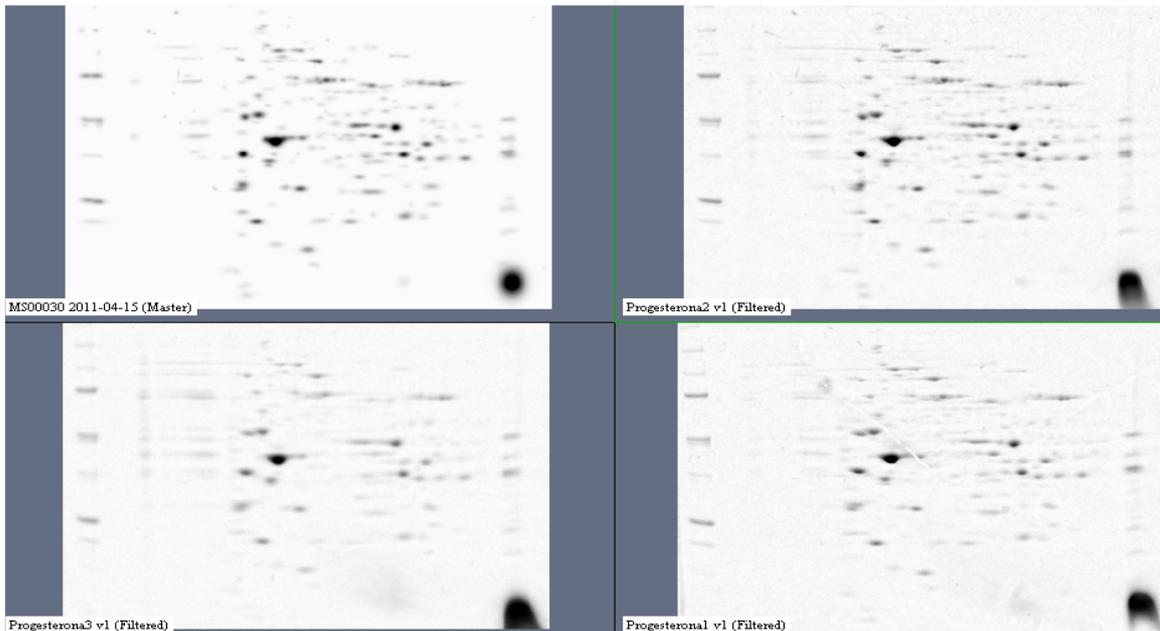


Figura No. 20. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Tratamiento progesterona. Teñidos por azul de Coomassie.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

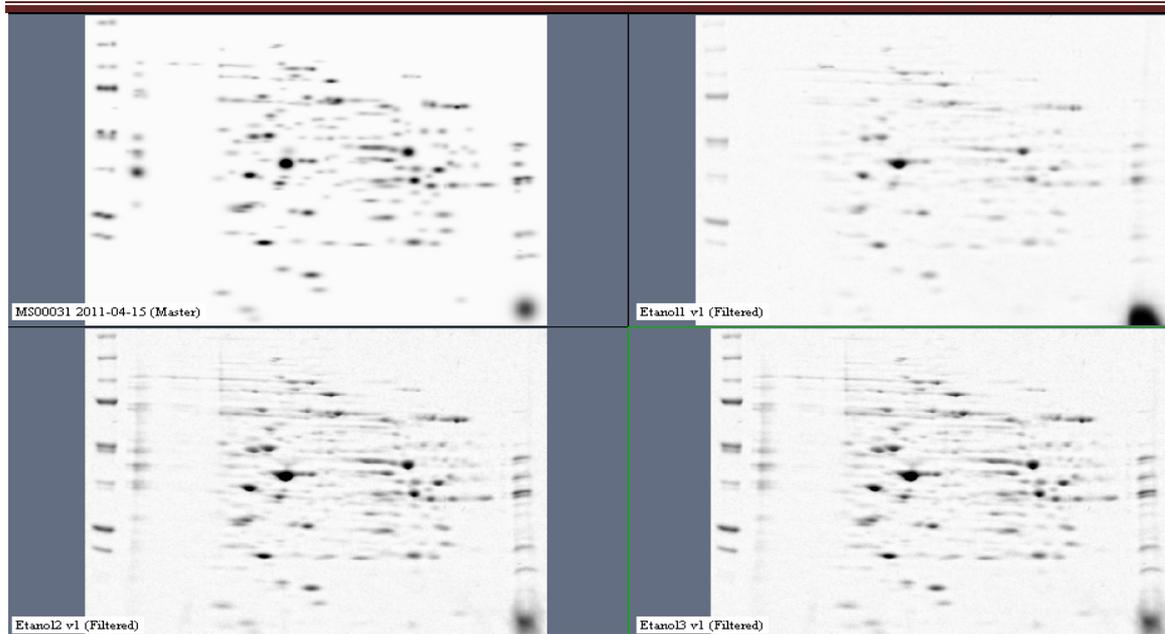


Figura No. 21. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Geles control de etanol (diluyente). Teñidos por azul de Coomassie.

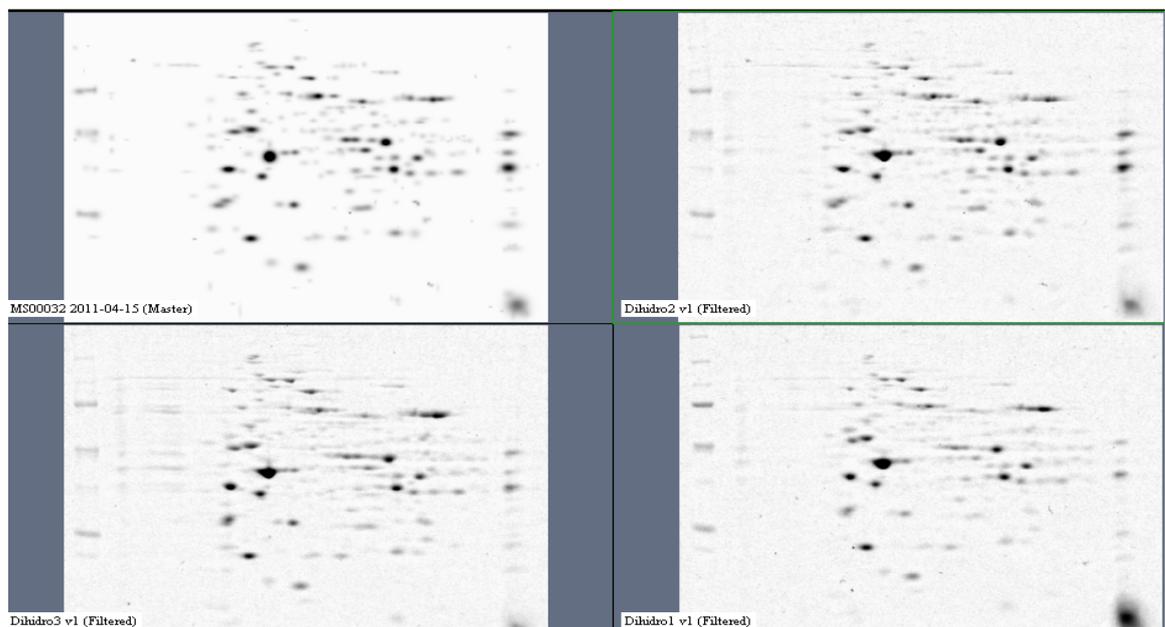


Figura No. 22. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Tratamiento dihidrotestosterona. Teñidos por azul de Coomassie.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

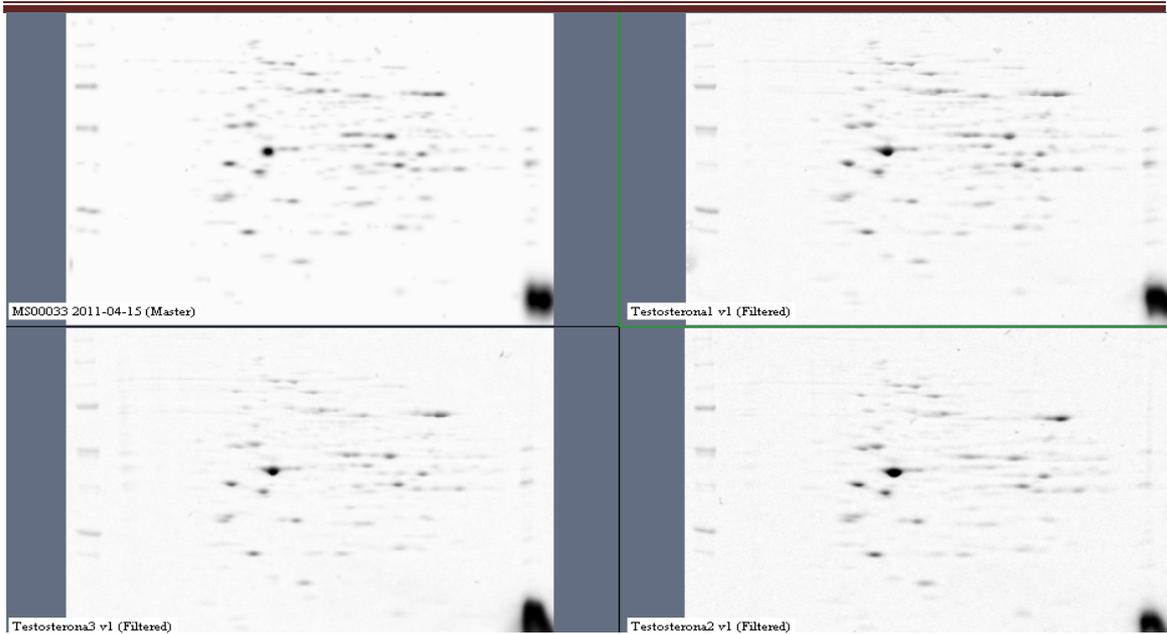
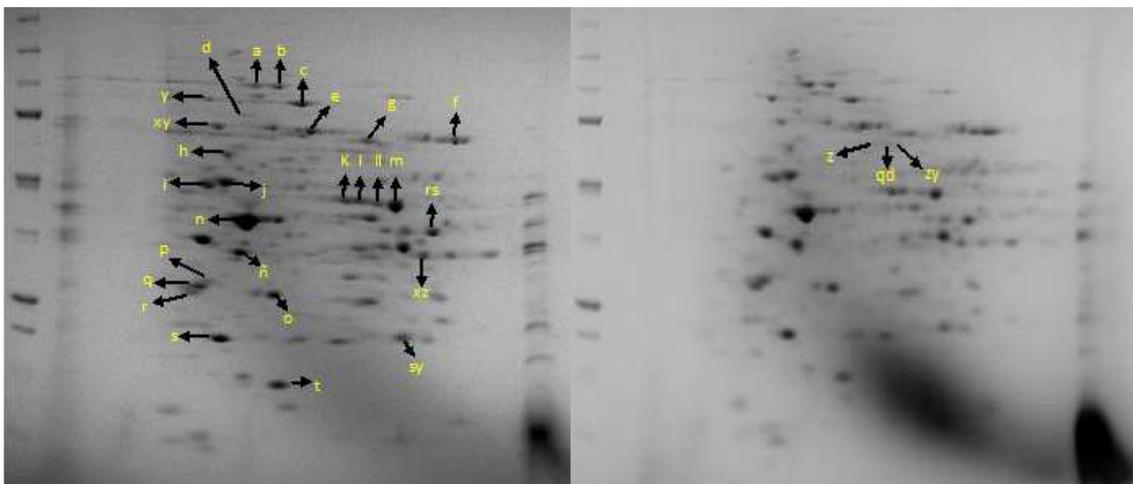


Figura No. 23. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Tratamiento testosterona. Teñidos por azul de Coomassie.

Una vez obtenidos los geles “master”, se realizó una comparación entre el corrimiento electroforético de las proteínas tratadas con hormonas y las proteínas control. Se obtuvo un cambio significativo en la intensidad de 30 proteínas, las cuales se encuentran marcadas con letras.





Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 24. Secuencia de proteínas analizadas mediante programa PDQuest. Mapas proteómicos de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*, teñidos por azul de Coomassie.

Se realizó un análisis densitométrico de cada gel master, en donde se obtuvo la intensidad de cada proteína mediante el programa PDQuest.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico mediante el programa SigmaPlot 11.0, el cual calculó las medias de las intensidades entre cada tratamiento con su respectivo control y la significancia estadística, que suele representarse mediante la letra p.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$. Dichos valores o cambios en intensidad que mostraron ser estadísticamente significativos, de acuerdo a los análisis realizados, se marcaron con un asterisco (*), como se muestra en las siguientes tablas.

Tabla No. 13. Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto del estradiol con respecto al control.

Tabla No. 14. Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto de la progesterona con respecto al control.



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

Punto	X Control	X E2	A o D	p	Cambio?
a	83717.333	83113.667		0.975	No
b	63772.333	61077.333		0.58	No
c	182024.667	108411.667		0.058	No
d	24373.333	21364.667		0.581	No
e	141473.667	146542.333		0.908	No
f	253839.667	158028.667	D	0.061	No
g	86085.667	166637.000	A	0.271	No
h	76510.333	48978.333	D	0.108	No
i	184235.000	149509.667		0.561	No
j	231674.000	252802.000		0.628	No
k	129770.667	94021.333	D	0.528	No
l	119061.000	189182.667		0.272	No
ll	64679.000	78833.667	A	0.186	No
m	257743.333	197569.667		0.388	No
n	804965.333	809373.000		0.965	No
ñ	263594.333	230323.667		0.565	No
o	186494.333	230323.667		0.291	No
p	30681.667	33042.000		0.89	No
q	240940.000	148833.333	D	0.362	No
r	108029.667	99878.000		0.4	No
s	293468.333	244610.667		0.455	No
t	192537.000	206953.000	A	0.803	No
y	67534.000	59286.667		0.712	No
z	17055.667	16521.667		0.835	No
qd	20945.000	23243.333		0.347	No
zy	29884.667	23042.000		0.275	No
xy	73773.667	62991.000		0.4	No
ra	176534.667	178245.333		0.957	No
sy	126325.333	151998.333		0.565	No
xz	103379.000	104896.000		0.94	No

Tabla No. 15. Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto de la dihidrotestosterona con respecto al control de etanol.

Punto	X Control	X P4	A o D	p	Cambio?
a	83717.333	62223.333	D	0.332	No
b	63772.333	37496.000	D	0.04	Si *
c	182024.667	96330.000	D	0.028	Si *
d	24373.333	6877.000	D	0.023	Si *
e	141473.667	98361.333	D	0.303	No
f	253839.667	45452.000	D	0.002	Si *
g	86085.667	57663.667	D	0.41	No
h	76510.333	42671.667	D	0.065	No
i	184235.000	121089.000		0.185	No
j	231674.000	168322.000		0.051	No
k	129770.667	108043.333		0.689	No
l	119061.000	92532.333		0.324	No
ll	64679.000	66409.000		0.891	No
m	257743.333	215652.333		0.459	No
n	804965.333	721574.667		0.193	No
ñ	263594.333	111911.000	D	0.04	Si *
o	186494.333	111470.000		0.07	No
p	30681.667	12871.667	D	0.291	No
q	240940.000	81058.667	D	0.135	No
r	108029.667	114885.000		0.902	No
s	293468.333	139753.000	D	0.048	Si *
t	192537.000	82021.667	D	0.055	No
y	67534.000	29670.667	D	0.145	No
z	17055.667	9274.667		0.185	No
qd	20945.000	18272.333		0.485	No
zy	29884.667	23042.000		0.275	No
xy	73773.667	39431.000	D	0.032	Si *
ra	176534.667	98332.333	D	0.041	Si *
sy	126325.333	92146.333		0.397	No
xz	103379.000	74318.667	D	0.188	No

Tabla No. 16. Diferencias en la intensidad de proteínas por efecto de la testosterona con respecto al control de etanol.



**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

Punto	X EtOH	X DHT	A o D	p	Cambio?
a	93544.333	54284.333	D	0.022	Si
b	56736.667	27612.000	D	0.023	Si
c	137606.667	68343.000	D	0.004	Si
d	17453.333	12385.667		0.533	No
e	166641.000	90093.333	D	<0.001	Si
f	77654.000	146708.000	D	0.258	No
g	108394.667	53440.667	D	0.009	Si
h	75353.000	41212.000	D	0.007	Si
i	161644.000	95822.667	D	0.01	Si
j	213839.000	142284.333	D	0.003	Si
k	98829.000	74854.333	D	0.291	No
l	190253.000	75064.000	D	0.006	Si
ll	80324.333	43085.667	D	0.004	Si
m	370919.667	179431.000	D	0.001	Si
n	797943.667	572230.667	D	0.004	Si
ñ	138958.000	139087.000		0.994	No
o	173141.333	84114.333	D	0.003	Si
p	42561.000	60293.333	A	<0.001	Si
q	189213.000	80261.000	D	0.4	No
r	74379.000	41463.667	D	0.114	No
s	74379.000	169443.000	A	<0.001	Si
t	210168.333	115653.000	D	0.004	Si
y	29929.667	28326.000		0.83	No
z	5387.000	10383.000	A	0.026	Si
qd	19929.667	17986.333		0.608	No
zy	35494.667	7792.333	D	0.063	No

Punto	X Control	X EtOH	A o D	p	Cambio?
a	83717.333	93544.333		0.61	No
b	63772.333	56736.667		0.243	No
c	182024.667	137606.667		0.086	No
d	24373.333	10836.000		0.400	No
e	141473.667	166641.000		0.486	No
f	253839.667	77654.000	D	0.003	Si
g	86085.667	108394.667		0.456	No
h	76510.333	75353.000		0.941	No
i	184235.000	161644.000		0.593	No
j	251674.000	215839.000		0.533	No
k	129770.667	98829.000		0.551	No
l	119061.000	190253.000		0.065	No
ll	64679.000	80324.333		0.149	No
m	257743.333	370919.667		0.083	No
n	804965.333	797943.667		0.7	No
ñ	263594.333	138958.000		0.065	No
o	186494.333	173141.333		0.657	
p	30681.667	42561.000		0.375	No
q	240940.000	189213.000		0.606	No
r	108029.667	74379.000		0.445	No
s	293468.333	74379.000		0.016	Si
t	192537.000	210168.333			
y	67334.000	29929.667		0.152	No
z	17055.667	5387.000	D	0.012	Si
qd	20945.000	19929.667		0.837	No
zy	29884.667	35494.667		0.644	No
xy	73773.667	81327.333		0.646	No
rs	176534.667	179932.667		0.907	No
sy	126325.333	179705.000		0.216	No
xz	103379.000	133352.000		0.277	No

Punto	X EtOH	X T4	A o D	p	Cambio?
a	93544.333	52906.000	D	0.034	Si
b	56736.667	47721.667	D	0.136	No
c	137606.667	86243.667	D	0.083	No
d	17453.333	17883.000		0.4	No
e	166641.000	104265.667		0.12	No
f	77654.000	201157.000	D	0.004	Si
g	108394.667	68876.667	D	0.16	No
h	75353.000	34493.667	D	0.033	Si
i	161644.000	92857.333	D	0.024	Si
j	213839.000	144482.667	D	0.021	Si
k	98829.000	124431.000	A	0.4	No
l	190253.000	117638.333	D	0.018	Si
ll	80324.333	74096.333		0.567	No
m	370919.667	177772.667	D	0.01	Si
n	797943.667	585824.000	D	0.007	Si
ñ	138958.000	129853.667		0.776	No
o	173141.333	107147.000	D	0.008	Si
p	42561.000	13174.000	A	0.1	No
q	189213.000	96090.000	D	0.127	No
r	74379.000	76439.000		0.844	No
s	74379.000	147572.667	A	0.036	Si
t	210168.333	102817.000	D	0.005	Si
y	29929.667	30238.667		0.96	No
z	5387.000	9435.000	A	0.444	No
qd	19929.667	17967.000		0.4	No
zy	35494.667	18315.333	D	0.238	No
xy	81327.333	39058.000	D	0.035	Si
rs	179932.667	111187.667	D	0.032	Si
sy	179705.000	69777.333	D	0.009	Si
xz	133352.000	69413.667	D	0.029	Si

Tabla No. 17. Diferencias en la intensidad de proteínas entre el control y control de etanol.

Tabla No. 18. P punto isoeléctrico que presentaron intensidad



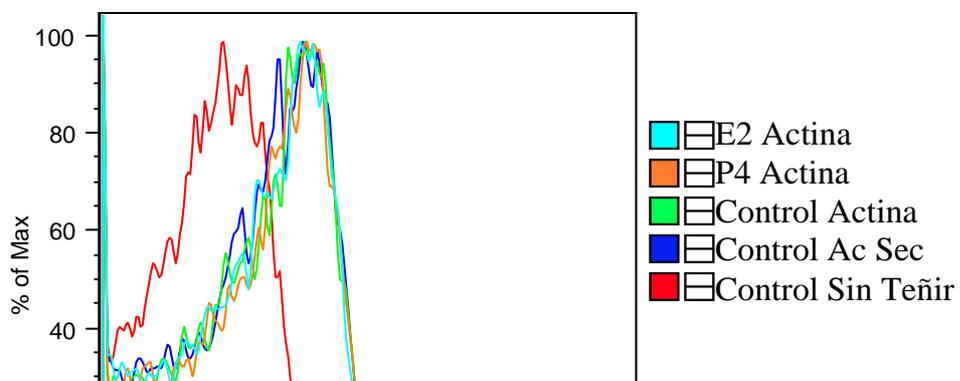
**Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.**

*

*

No. de Punto	PM (kDa)	pI
a	117.7	5.6
b	111	5.96
c	93.9	6.28
d	70.5	5.43
e	77.6	6.47
f	74.3	8.47
g	73.4	7.23
h	65.9	5.29
i	52.9	5.05
j	53.7	5.31
k	47.8	6.95
l	48	7.1
ll	47.6	7.4
m	46.8	7.64
n	40.3	5.54
ñ	36.7	5.4
o	27.5	5.97
p	30.2	5.04
q	28.8	4.84
r	27.5	4.77
s	20.6	5.26
t	15.8	6.13
y	95	5.02
z	68.2	6.65
qd	68.2	6.85
zy	68.2	7.05
xy	80.1	5.16
rs	39.7	8.17
sy	21.5	7.79
xz	37.3	8.05

9.4 Citometría de flujo.





Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 25. Expresión de actina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con estradiol y progesterona.

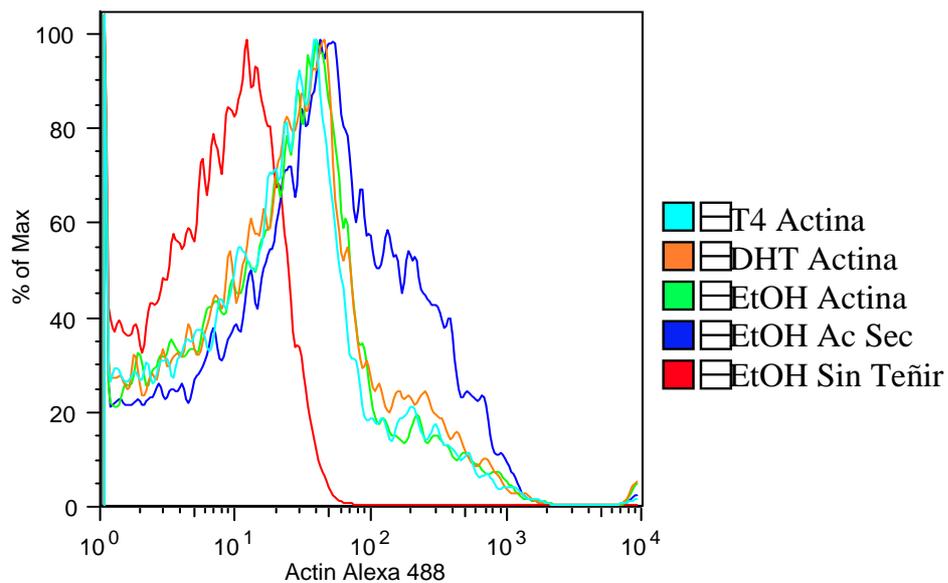
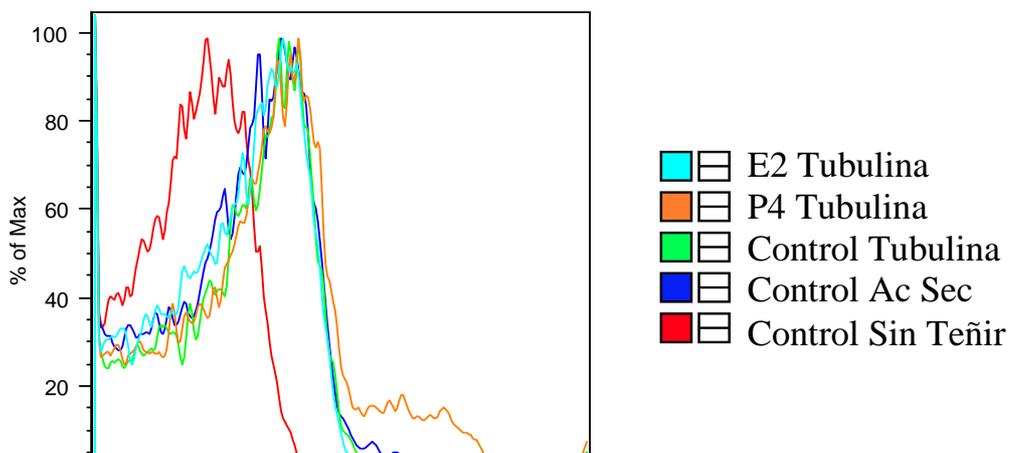


Figura No. 26. Expresión de actina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con testosterona y dihidrotestosterona.





Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 27. Expresión de tubulina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con estradiol y progesterona.

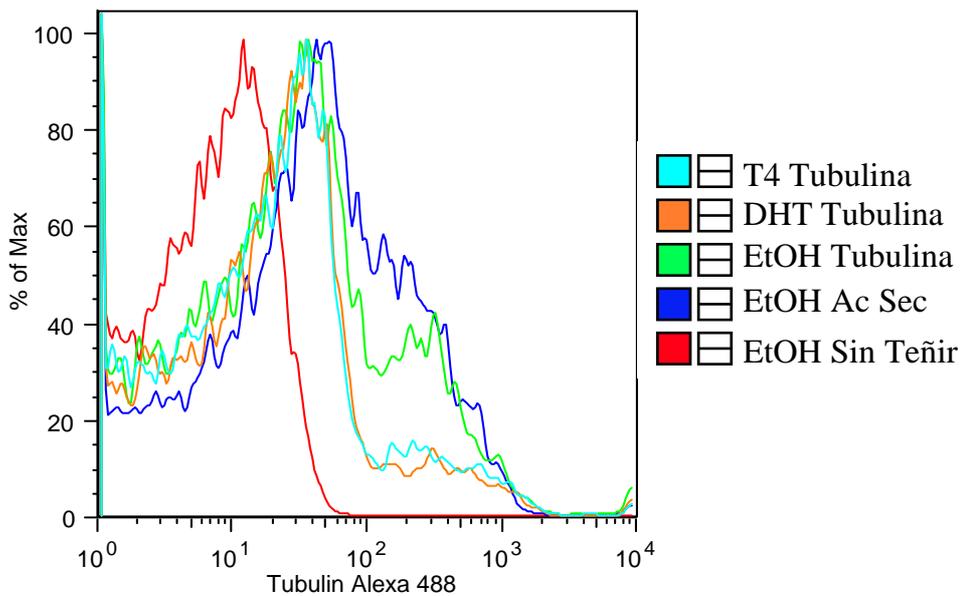
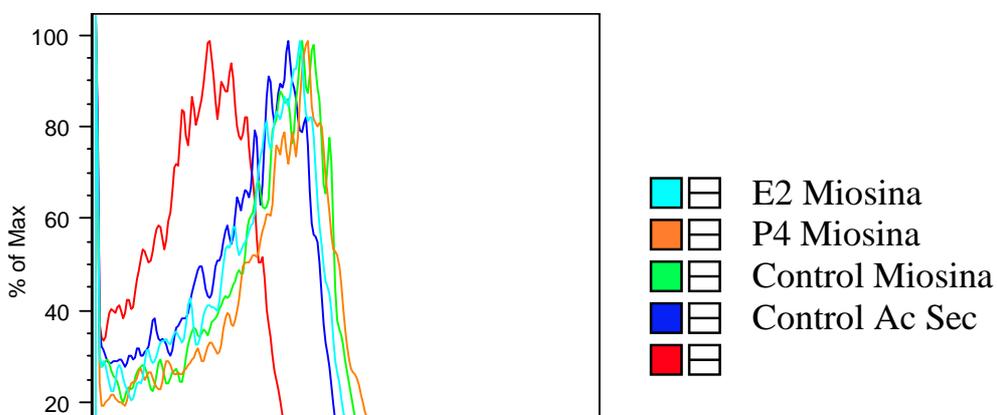


Figura No. 28. Expresión de tubulina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con testosterona y dihidrotestosterona.





Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

Figura No. 29. Expresión de miosina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con estradiol y progesterona.

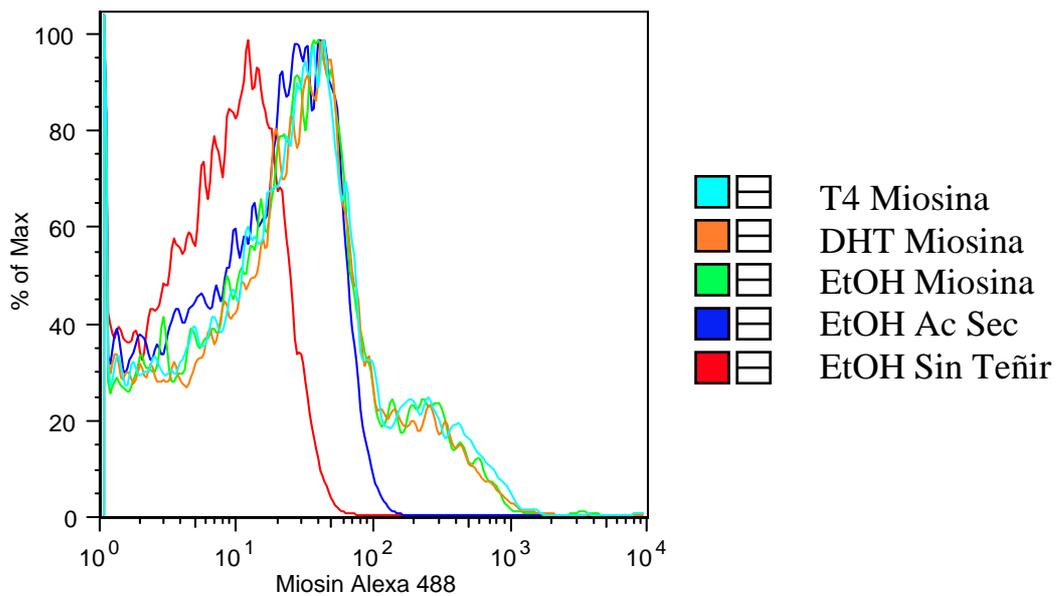


Figura No. 30. Expresión de miosina de células extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratadas con testosterona y dihidrotestosterona.

9.5 Microscopía Confocal.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

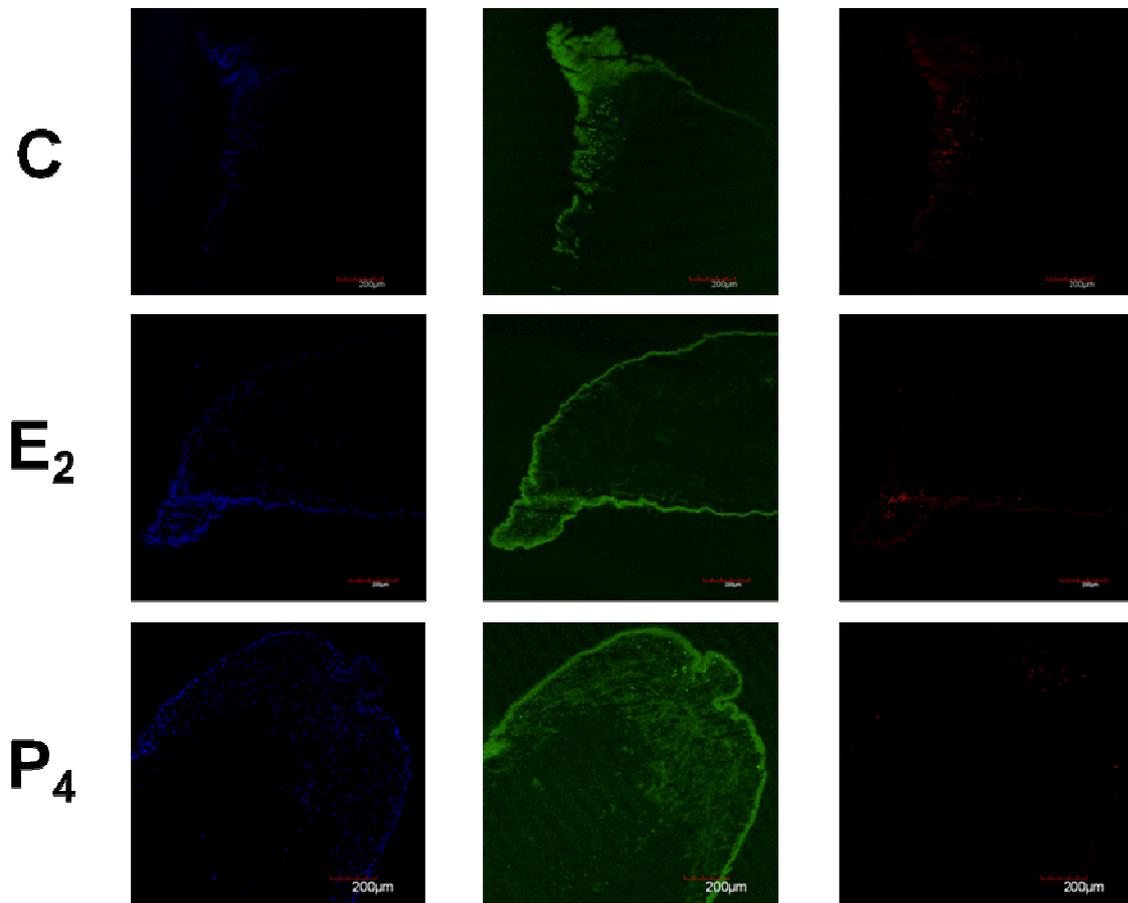


Figura No. 31. Expresión de actina (rojo) y tubulina (verde) de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con estradiol y progesterona, 200 μm.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

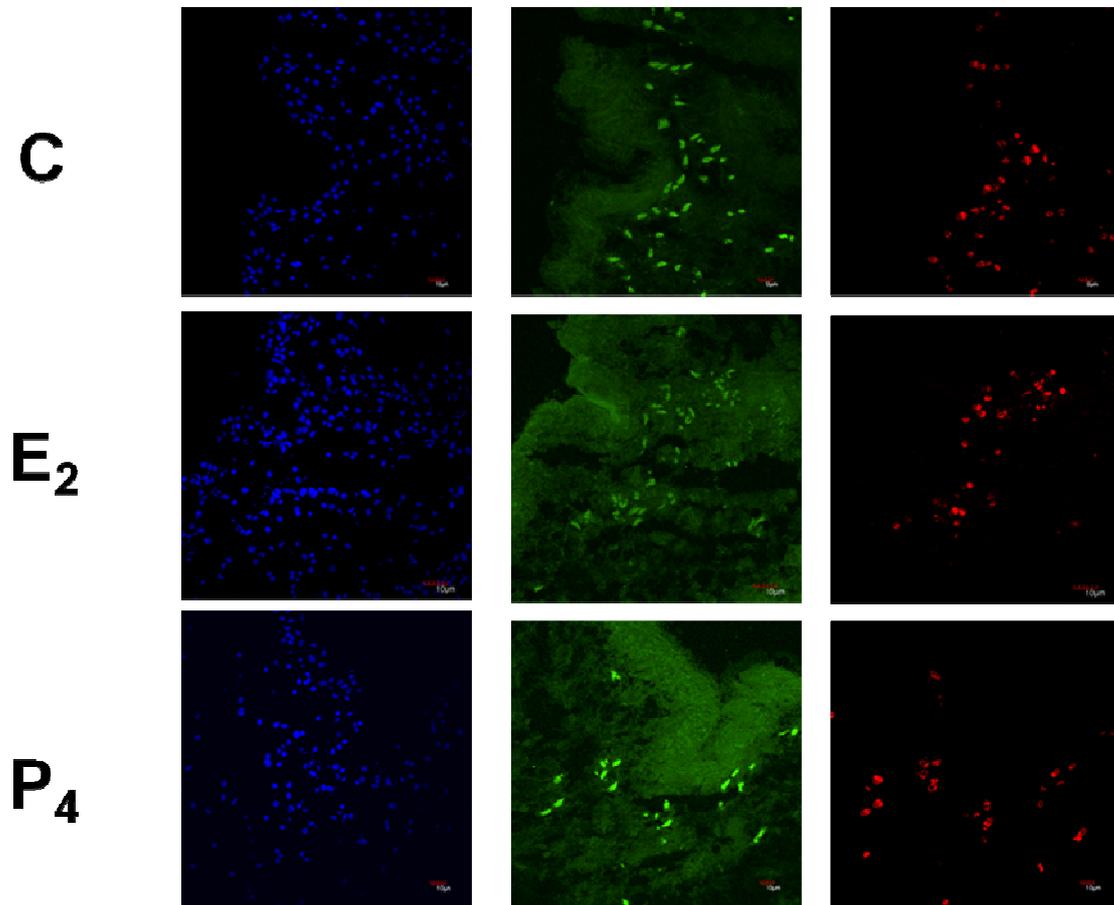


Figura No. 32. Expresión de actina (rojo) y tubulina (verde) de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con estradiol y progesterona, 10 µm.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

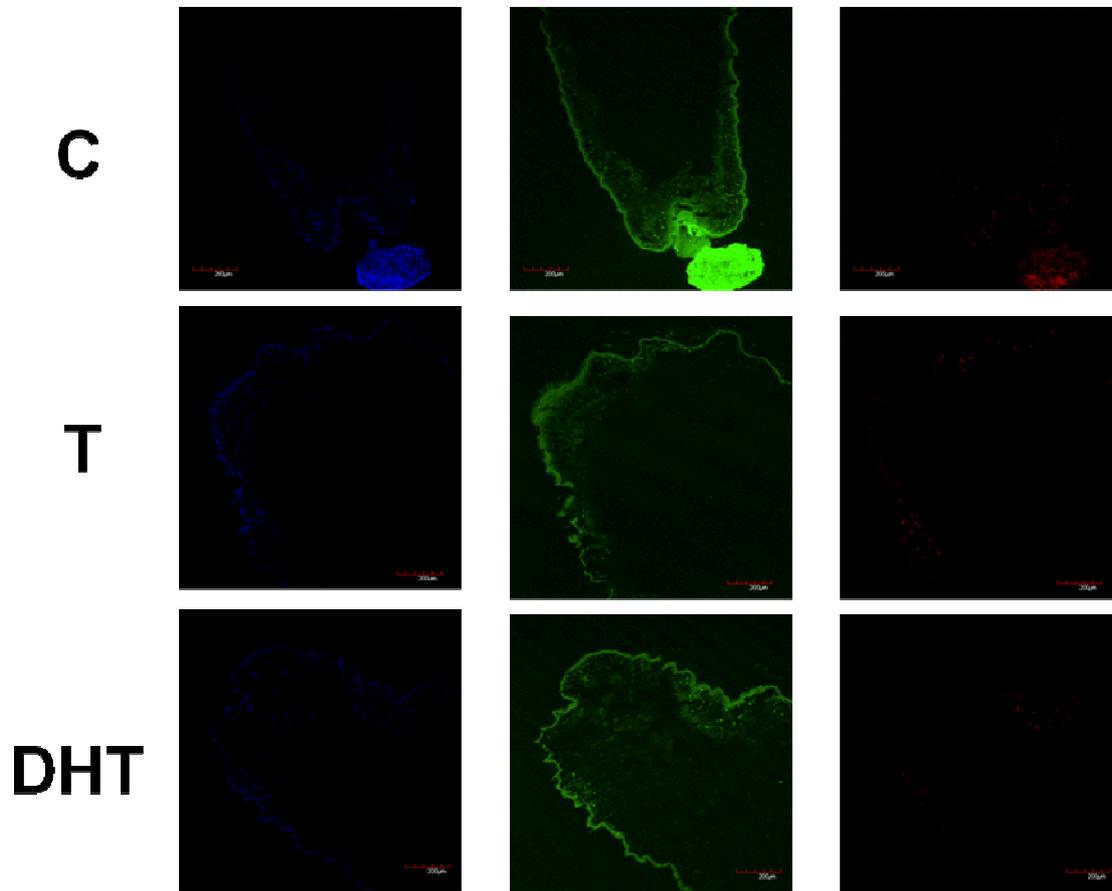


Figura No. 33. Expresión de actina (rojo) y tubulina (verde) de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con testosterona y dihidrotestosterona, 200 μm .



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

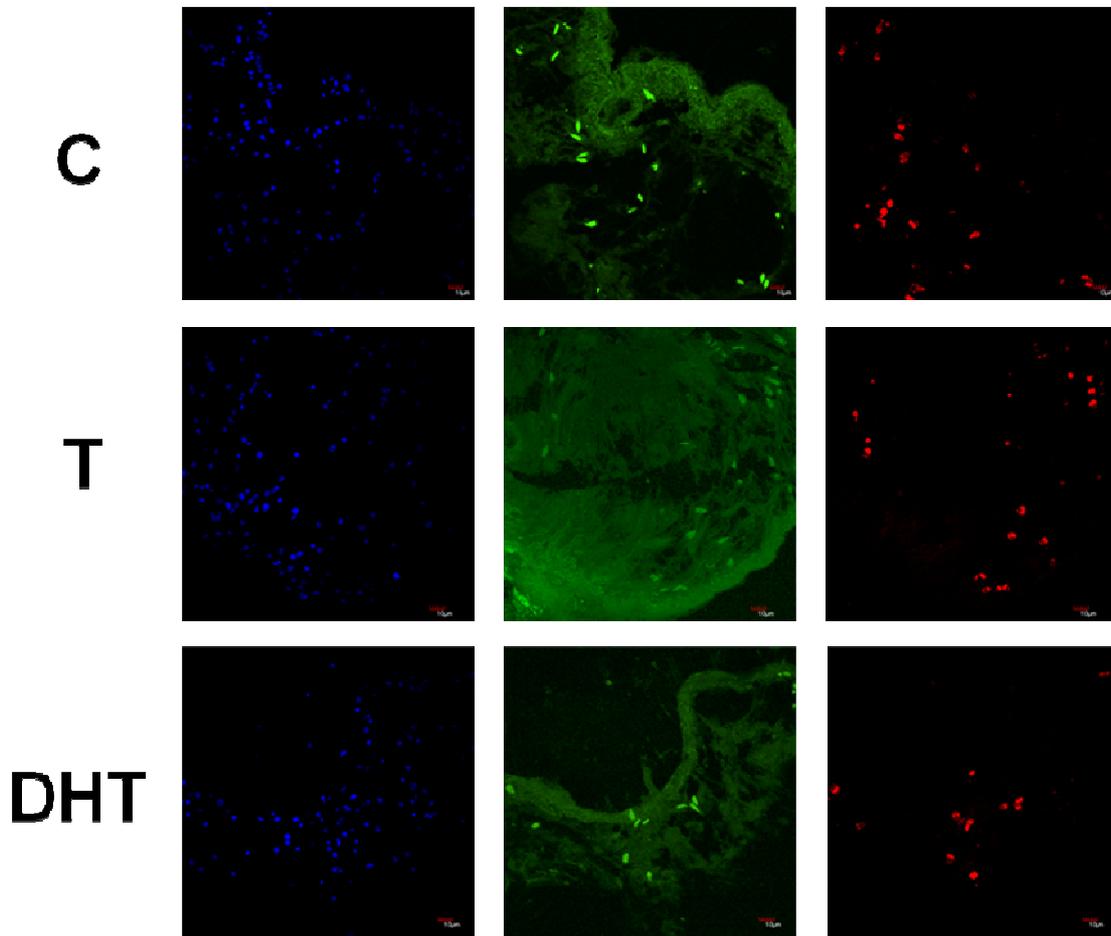


Figura No. 34. Expresión de actina (rojo) y tubulina (verde) de células flama extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados testosterona y dihidrotestosterona, 10 μm.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*:
Análisis proteómico y microscópico.

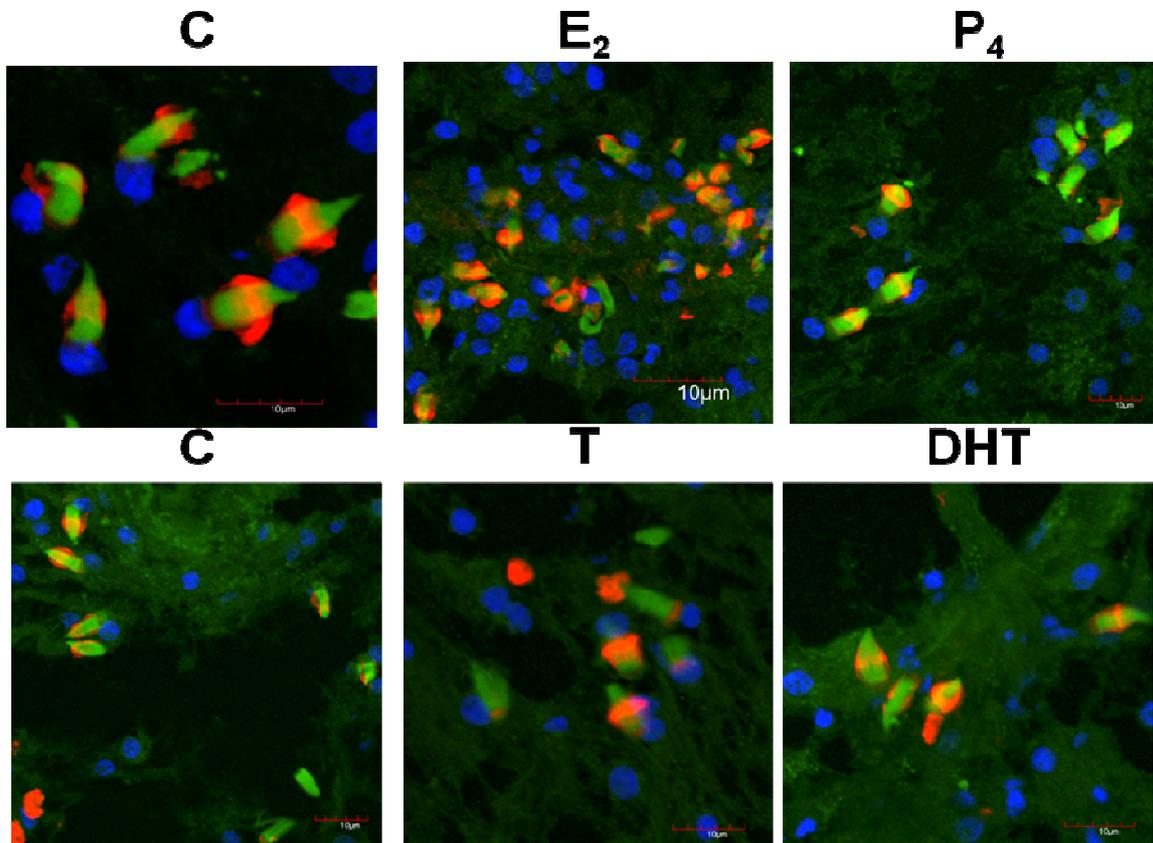


Figura No. 35. Células flama de cisticercos tratados con hormonas sexuales. 10 μm , morfología típica de las células flama, por microscopía de luz se observan como cometas, en el que el extremo anterior corresponde al cuerpo de la célula, mientras que el extremo distal contiene un penacho de cilios (Rohde y col. 1992).

10. DISCUSIÓN.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

En los últimos años han existido una gran cantidad de estudios, que sugieren que un hospedero, a través de las hormonas y factores de crecimiento que él sintetiza, puede modificar diversos aspectos de la fisiología parasitaria, como infectividad, diferenciación y crecimiento (Mendonca y col. 2000; Charder y col. 1992; Escobedo y col. 2005).

Además, existen evidencias experimentales que sugieren la explotación del microambiente hormonal del hospedero por parte del parásito como un mecanismo más, que favorece el asentamiento de la infección.

Por ejemplo, el fenómeno de trans-regulación o bien, regulación cruzada del hospedero al parásito, constituye un medio muy importante por el cual este último, aprovecha a través de estructuras semejantes a los receptores de hormonas (presentes en mamíferos), las hormonas y factores de crecimiento que el hospedero sintetiza (Escobedo y Morales-Montor, 2004).

De acuerdo a la hipótesis de esta tesis, se plantea que la expresión, organización e integridad de las proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *T. crassiceps*, será modificada por el efecto de las hormonas sexuales estradiol, progesterona, dihidrotestosterona y testosterona.

Para demostrar lo anterior, fue necesario el uso de una estrategia experimental alternativa para el estudio de la cisticercosis.

En este caso se utilizó la cisticercosis experimental murina, la cual es causada por la inoculación intraperitoneal del metacéstodo de *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962; Smith y col. 1972; Dorais y col. 1969) y está caracterizada por la rápida reproducción asexual de los parásitos en el hospedero (Larralde y col. 1995).

Se inocularon a ratones hembra BALB/CAnN con cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF-WFV). Después de 18 semanas de infección, los ratones hembra fueron sacrificados por dislocación cervical y los parásitos se colectaron, para su posterior cultivo con las hormonas esteroides ya descritas. Ver del apartado 8.2 al 8.5.

Se utilizaron ratones BALB/CAnN, ya que los cisticercos de *T. crassiceps* pueden reproducirse en la cavidad peritoneal de éstos, además de ser excelentes hospederos, para el estudio de la cisticercosis (Freeman, 1962; Sciutto y col. 1991).

Las concentraciones de hormonas utilizadas en este estudio, se basaron en otros estudios realizados anteriormente (Larralde y col. 1995; Morales y col. 1996; Morales y col, 1999; Morales y col. 2001).

T. crassiceps se ha obtenido de varias cepas, (Freeman, 1962), sin embargo la cepa ORF se ha convertido en la más estudiada (Larralde y col. 1989; Escobedo y col. 2004; Jiménez y col. 2006).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Posterior al cultivo de cisticercos de *T. crassiceps*, con las respectivas hormonas (ver apartado 8.5), se realizó la extracción, precipitación y cuantificación de las proteínas de dicho parásito. Ver apartados del 8.6 al 8.8.

Cuando los tejidos se destruyen para liberar una molécula de interés, se liberan también enzimas de degradación. Entre estas se incluyen proteasas y nucleasas (Voet y col. 2009).

Debido a esto, para llevar a cabo la extracción de proteínas, los cisticercos fueron tratados primeramente con una solución que contenía un inhibidor de proteasas comercial, esto con el fin de evitar la degradación de las proteínas. Ver apartado 8.6.

Posteriormente los cisticercos se disgregaron con un homogeneizador de tejidos y se sonicaron, para fraccionar cada tejido de los mismos y liberar el contenido celular, en este caso las proteínas.

La mayoría de los procedimientos de purificación, se basa en alguna forma de aplastar o moler, seguida de una filtración o centrifugación para retirar las partículas insolubles más grandes y para lograr la lisis de las células. Si la proteína diana, está estrechamente asociada con una membrana lipídica, puede usarse un detergente o solvente orgánico para solubilizar los lípidos y recuperar la proteína (Voet y col. 2009).

Una vez disgregados los cisticercos, se precipitaron las proteínas presentes en los mismos, para ello, fue necesario tratar las muestras con una solución de TCA al 10 % y 20 mM de DTT en acetona a -20°C , las cuales posteriormente se incubaron a -20°C durante dos horas para llevar a cabo el proceso de precipitación. Ver apartado 8.7.

El ácido tricloroacético (TCA) es un ácido orgánico, derivado del ácido acético. Se prepara por reacción del ácido acético y cloro en presencia de un catalizador. En cuanto al ditioneitol (DTT), es un agente reductor que evita que los enlaces disulfuro intra e intermoleculares se formen entre los residuos de cisteína de las proteínas (Berg, 2008).

La multiplicidad de grupos ácidos y básicos de una proteína, hace que su solubilidad dependa de las concentraciones de las sales disueltas, la polaridad del solvente, el pH y la temperatura. Las distintas proteínas varían en gran medida en sus solubilidades en un conjunto dado de condiciones (Voet y col. 2006).

La solubilidad de una proteína en solución acuosa, es sensible a las concentraciones de sales disueltas. Por otro lado, esta solubilidad también se ve afectada por la adición de un solvente orgánico, como lo es la acetona o el alcohol, ya que al agregarlos en una solución de proteínas, la constante dieléctrica del disolvente disminuye, desplazando así, las moléculas de agua asociadas con la proteína. Esto reduce la concentración de agua en la solución y por lo tanto se disminuye la solubilidad de la proteína (Voet y col. 2006; Teijón y col. 2001).

La solubilidad de una proteína, también se ve influenciada por el pH. La fuerza iónica baja, hace que una proteína se solubilice, ya que aumenta su solubilidad. Pero cuando se eleva, disminuye la solubilidad y la proteína precipita (Teijón y col. 2001).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Las proteínas, pueden precipitarse por diversos iones positivos o negativos. Los iones positivos de uso común para precipitar proteínas son los metales pesados: Zn^{++} , Cd^{++} , Hg^{++} , Fe^{+++} , etc. En cuanto a los precipitantes de proteínas por acción de iones negativos, se encuentran el ácido wolfrámico, pícrico, tánico, tricloroacético, etc. (Teijón y col. 2001).

El manejo de las proteínas, se realizó siempre a temperaturas bajas, ya que el sobrecalentamiento de las mismas, podría desnaturalizarlas. Algunas proteínas se desnaturalizan a bajas temperaturas, sin embargo, la mayoría lo hace a temperatura elevada, a veces solo unos pocos grados sobre la de su entorno natural. La purificación de proteínas normalmente se lleva a cabo a temperaturas cercanas a $0^{\circ}C$ (Voet y col. 2009).

Después de la purificación de una sustancia, se requiere algún método para detectarla cuantitativamente. Por consiguiente, debe diseñarse un ensayo que sea específico para la proteína diana, muy sensible y de uso conveniente (Voet y col. 2009).

En esta investigación, para llevar a cabo la cuantificación de proteínas, se utilizó un kit comercial (DC Protein Assay Bio-Rad Laboratories), que utiliza como principio el método de Lowry. Ver apartado 8.8. El kit consta de tres reactivos, el reactivo A que es tartrato de cobre alcalino, el reactivo B que es reactivo de Folin y el reactivo C que es un tensoactivo.

El método de Lowry (1951), utiliza tres sistemas para producir coloración por la presencia de proteínas. En primer lugar el Cu^{+} , forma complejos de coordinación con dos enlaces peptídicos, consecutivos de las proteínas, dando lugar a un compuesto coloreado azul. En segundo lugar, este compuesto es capaz de reducir al reactivo de Folin (ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), dando un color más azulado. Por último el reactivo de Folin, también reacciona con los restos tirosinil (residuos de tirosina) de la cadena polipeptídica, produciendo así mismo un color azul por la reducción del fosfomolibdato en medio básico (Roca y col. 2003).

El espectro de absorción no corresponde a una única sustancia, por lo que puede emplearse un amplio margen de longitudes de onda, entre 500 y 700 nm, para la lectura de la absorbancia. Este método es unas 100 veces más sensible que el de biuret. La sensibilidad es una ventaja cuando se miden concentraciones muy bajas de proteínas (Roca y col. 2003).

Los resultados de la cuantificación de proteínas pueden observarse en el apartado 9.1, tabla No. 8. Una vez cuantificadas las proteínas, se procedió a llevar a cabo la electroforesis en una dimensión. Para ello primeramente fue necesario, la preparación de geles de poliacrilamida. Ver apartado 8.9.

Posteriormente se llevo a cabo la reducción de proteínas, mediante la adición de β -mercaptoetanol y buffer de Laemmli, en presencia de calor. Ver apartado 8.9.2. El fin de añadir mercaptoetanol (2-tioetanol) a las proteínas, es para reducir los puentes disulfuro (Berg, 2008).

Al término de la reducción de las proteínas, se realizó el corrimiento electroforético de las mismas en una dimensión, es decir en base a su peso molecular. Ver apartado 8.9.3.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

La electroforesis de proteínas, generalmente se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida, con un tamaño de poro característico, de manera que la separación de las moléculas se basa en la filtración por el gel (tamaño y forma) y en la movilidad electroforética (carga eléctrica) (Voet y col. 2009).

Dentro de la electroforesis en geles de poliacrilamida, el más utilizado es el SDS-PAGE, en sistema de buffer discontinuo que fue descrito originalmente por Laemmli (Zavala, 2005).

La matriz de poliacrilamida se forma mediante la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida, ocurriendo esto en presencia de un agente iniciador (TEMED) y de un catalizador (ion persulfato). La poliacrilamida actúa como soporte inerte y tamiz, de acuerdo con la concentración de sus polímeros se pueden obtener diferentes tamaños de poro, a mayor concentración de acrilamida menor tamaño de poro, lo que da como consecuencia una migración de proteínas más pequeña y un mayor rango de separación entre ellas (Zavala, 2005).

En este tipo de electroforesis, las muestras son desnaturalizadas en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS), en donde tanto el gel como el buffer de corrida contienen SDS. El SDS interfiere en las interacciones hidrófobas que por lo general estabilizan a las proteínas (Voet y col. 2009; Zavala, 2005).

La alta carga negativa que imparte el SDS, enmascara la carga intrínseca de la proteína. El resultado neto es que las proteínas tratadas con SDS tienen formas y relaciones carga-masa similares. Por lo tanto, la técnica SDS-PAGE separa las proteínas exclusivamente por efecto de la filtración del gel, esto es de acuerdo, con su masa molecular (Voet y col. 2009).

Después de llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se realizó la tinción de las mismas mediante el colorante de azul de Coomassie. Ver apartado 8.9.4.

Para poder visualizar en el gel las proteínas separadas por electroforesis, es necesario sumergir el gel en un colorante que se una fuertemente a las proteínas (Voet y col. 2009). Cuando se tiñe con azul de Coomassie basta 0.1 µg de proteína para dar una banda diferenciada (Berg, 2008).

Una vez teñido el gel de poliacrilamida, en donde se llevo a cabo el corrimiento electroforético de las proteínas, se procedió a capturar la imagen del mismo y a realizar el análisis densitométrico de las bandas separadas. Esto se realizó mediante el uso del equipo Chemidoc XRS de Bio-Rad, con un filtro 3004 62 mm (ámbar), además del programa Quantity One version 4.6.

El corrimiento electroforético de las proteínas, puede observarse en la figura No. 11. Por otro lado, la figura No. 12, muestra el cambio en el número de bandas, o bien proteínas, correspondientes al corrimiento electroforético de proteínas tratadas con hormonas. A simple vista, se puede observar en esta figura, que el tratamiento con estradiol y progesterona, favorece la presencia de proteínas que se encuentran alrededor de un peso molecular entre 150 y 100 kDa, además de otras que se encuentran alrededor de un peso molecular entre 75 y 50 kDa.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

También se observa, la ausencia de proteínas que se encuentran alrededor de un peso molecular entre 250 y 150 kDa con el tratamiento de progesterona. Así como otras bandas que se encuentran alrededor de 50 y 37 kDa.

En cuanto las proteínas tratadas con andrógenos se puede observar que aparecen proteínas, alrededor de los 350 y 150 kDa. Por otro lado, con el tratamiento de dihidrotestosterona, se observa la desaparición de algunas proteínas que se encuentran entre 100 y 75 kDa, mientras que otras aparecen alrededor de 75 y 50 kDa.

Respecto al tratamiento con testosterona, se puede observar la desaparición de proteínas presentes alrededor de 100 y 50 kDa, mientras que aparece una, que se encuentra entre los 50 y 37 kDa.

Si nos centramos en algunas de las proteínas que conforman el citoesqueleto, podemos observar que a la altura de los 250 kDa (donde se encontraría aproximadamente la miosina), encontramos la aparición proteínas tratadas con dihidrotestosterona y testosterona, con respecto al control de etanol.

Por otro lado a la altura de los 100 kDa, (donde se encontraría aproximadamente la paramiosina), se observa la presencia de nuevas proteínas tratadas con estradiol y progesterona, con respecto al control, este mismo fenómeno se observa también con los tratamientos de dihidrotestosterona y testosterona.

A la altura de los 43 kDa (donde se encontraría aproximadamente la actina), podemos observar la presencia de nuevas proteínas tratadas con progesterona y testosterona, respecto a sus correspondientes controles.

De acuerdo a los resultados anteriores, se procedió a realizar un densitograma para cada tratamiento con su respectivo control. Para así poder evidenciar de manera más grafica los cambios efectuados. Ver de la figura No. 13 a la No. 16. Cada pico observado en los densitogramas, corresponde a una banda o proteína separada por electroforesis en una dimensión.

En los densitogramas realizados, se puede observar el cambio en la intensidad de las diferentes proteínas tratadas y que corresponden al corrimiento electroforético, lo cual nos indica que las hormonas podrían afectar la estructura de las mismas, o bien podrían promover la aparición o desaparición de las mismas, dependiendo de las necesidades que requiera en ese momento la célula, por las condiciones en las se encuentra.

Cada cambio en la intensidad de las proteínas tratadas, mostrado en los densitogramas, fue marcado con un número, estos resultados pueden observarse de la tabla No. 9 a la tabla No. 12

Por ejemplo, en las proteínas tratadas con estradiol, se puede observar que el cambio marcado con el número uno presenta un gran aumento (más del doble), por su parte en las proteínas tratadas con progesterona, se observa que el cambio marcado con el número diez, presenta también un gran aumento (más del doble) en la intensidad con respecto al control.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

En cuanto a las proteínas tratadas con dihidrotestosterona, se observa que el cambio marcado con el número ocho, presenta gran disminución (más del doble), mientras que en las proteínas tratadas con testosterona, se observa que el cambio marcado con el número nueve, presenta una gran disminución (más del doble) en la intensidad con respecto al control de etanol.

Si nos basamos en las proteínas que conforman el citoesqueleto, tenemos que en las proteínas tratadas con estradiol, se observan cambios a la altura de los 75-50 kDa, en donde posiblemente encontraríamos a la tubulina. En cuanto a las proteínas tratadas con progesterona, observamos cambios a la altura de los 100 kDa, donde encontraríamos a la paramiosina. Por otra parte, a la altura de los 75-50 kDa, donde encontraríamos a la tubulina y a la altura de los 50-37 kDa donde encontraríamos a la actina.

En cuanto a las proteínas tratadas con dihidrotestosterona, observamos cambios a la altura de los 250-150 kDa, donde se encontraría la miosina, además se observaron cambios a la altura de los 100 kDa, donde encontraríamos a la paramiosina, en los 75-50 kDa, donde encontraríamos a la tubulina y a la altura de los 50-37 kDa, donde encontraríamos a la actina.

En cuanto a las proteínas tratadas con testosterona, observamos cambios a la altura de los 250-150 kDa, donde se encontraría a la miosina, a la altura de los 100 kDa, donde encontraríamos a la paramiosina, a los 75-50 kDa, donde encontraríamos a la tubulina y a los 50-37, donde encontraríamos a la actina. Además, también se observaron cambios en otros intervalos de peso molecular diferentes a los correspondientes a proteínas del citoesqueleto.

Debido a que estos resultados solamente eran cualitativos, se procedió a la cuantificación de la intensidad de cada uno de ellos, a través del programa Quantity One, como se muestra de la tabla No. 13 a la tabla No. 16.

Debido a que se hizo solamente un corrimiento electroforético en una dimensión, no se procedió a la realización de un análisis estadístico con los datos obtenidos de las intensidades en cada uno de los cambios. El análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos en los corrimientos electroforéticos en doble dimensión, ya que la investigación descrita en esta tesis, está enfocada al análisis proteómico en doble dimensión, de las proteínas presentes en cisticercos de *T. crassiceps*, tratados con las hormonas sexuales descritas anteriormente.

El fin de realizar un corrimiento electroforético en una dimensión, fue para comprobar y verificar la integridad de dichas proteínas, sin embargo, logramos observar a simple vista, algunos cambios, los cuales se describieron anteriormente.

Para poder llevar a cabo el análisis proteómico de las proteínas de cisticercos de *T. crassiceps*, tratados con hormonas sexuales, fue necesario el uso de la técnica de electroforesis en doble dimensión, esto con el fin de lograr comprender el proteoma de estos parásitos al estar expuestos con las hormonas sexuales anteriormente descritas.

Se entiende como proteoma, al conjunto de proteínas que se expresan en una célula, tejido, organismo o fluido biológico en un momento determinado, bajo condiciones específicas.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Las proteínas no solo pueden sufrir diferentes modificaciones postraduccionales, sino que a su vez, el nivel de expresión puede variar en función de varios parámetros, como cambios en el entorno o el estado fisiológico celular, entre otros. Por lo tanto, se entiende que la proteómica es la ciencia que se encarga del estudio del proteoma.

La electroforesis en dos dimensiones, es una herramienta útil para la proteómica, un campo de estudio abocado a la catalogación de todas las proteínas expresadas por una célula con importancia en su cuantificación, localización, modificaciones, interacciones y actividades (Voet y col. 2009).

Combina dos métodos electroforéticos; el isoelectroenfoque (IEF), como primera dimensión y la electroforesis desnaturante (SDS-PAGE), como la segunda. El método fue descrito originalmente por O'Farrell en 1975, habiéndose incorporado numerosas innovaciones, mejoras y optimizaciones, siendo la más relevante la del desarrollo de las tiras con gradiente de pH inmovilizado (IPG strips) (Pallás y col. 2008).

En primer paso se fraccionan las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico por medio de isoelectroenfoque y se crea un gradiente de pH. En el segundo paso las proteínas se separan de acuerdo con su tamaño por medio de electroforesis en gel con SDS (Watson y col. 2008).

Para llevar a cabo la electroforesis en doble dimensión, se utilizaron geles prehechos de la marca invitrogen (Invitrogen, NUPAGE 4-12% BT 1.0). Al igual que en la electroforesis en una dimensión, las proteínas fueron expuestas a reactivos reductores, en este caso se utilizó urea 7M, tiourea 2M, chaps al 4%, DTT 60 mM y anfolitos al 2%. Ver apartado 8.10.1.

La urea y tiourea son agentes caotrópicos neutrales que desnaturalizan a las proteínas, el CHAPS es un detergente que favorece la solubilización de la muestra y previene la agregación de las proteínas y el DTT es un agente reductor que mantiene a la proteína en estado reducido.

Esta mezcla de compuestos es necesaria para mantener a las proteínas completamente desnaturalizadas, de manera que se encuentren solubilizadas y disgregadas, para así favorecer la migración de las mismas.

Después de poner en contacto a las proteínas con reactivos reductores, se realizó la separación electroforética en una dimensión, es decir, el isoelectroenfoque. Ver apartado 8.10.2 y 8.10.3. El isoelectroenfoque es una técnica, que nos permite separar electroforéticamente proteínas en base a sus contenidos relativos de aminoácidos ácidos o básicos, es decir, en base a su punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH en el que su carga neta es cero (Berg, 2008). En este punto el número de cargas positivas se equilibra exactamente con el número de cargas negativas (Capmbell, 2007).

Posterior al isoelectroenfoque, se realizó la separación electroforética en doble dimensión, es decir, una electroforesis SDS-PAGE. Ver apartado 8.10.4 y 8.10.5. Debido a que el SDS imparte una carga negativa muy alta a las proteínas, en la electroforesis SDS-PAGE, éstas se separan exclusivamente por su masa molecular (Voet y col. 2009).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Una vez separadas las proteínas, por electroforesis en doble dimensión, éstas se hicieron visibles a través de colorantes específicos para teñir proteínas, en este caso se realizó primero una tinción con Sypro Ruby, para comprobar la integridad de las proteínas (ver Figura No. 17) y posteriormente se realizó una tinción con azul de Coomassie. Ver apartado 8.10.6.

Posteriormente se realizó la captura de las imágenes de cada uno de los geles, utilizando el equipo Chemidoc XRS de Bio-Rad, con un filtro 3004 62 mm ámbar, además del programa Quantity One Version 4.6. Para el análisis proteómico, de las proteínas separadas en doble dimensión, se utilizó el programa PD Quest Version 7.4.0 de Bio-Rad.

Los procesos de escaneado de la imagen, el pre-procesado (normalización y filtrado) y la propia comparación (alineamiento de imágenes y spots), también conllevan una serie de errores que, en gran medida dependen del tipo de densitómetro empleado y del programa de análisis en doble dimensión y que afectaran los resultados estadísticos (Meleth y col. 2005).

Los distintos programas disponibles para doble dimensión han sido comparados por varios autores y así por ejemplo, Garrels (Garrels, 1989) estimó la reproducibilidad del sistema QUEST en un 97,6%, y Rosengren (Rosengren y col. 2003) determinaron que el PD-Quest derivado de este sistema, es más fiable que otros programas en el alineamiento de spots, con una menor tasa de falsos positivos.

Cuando las manchas proteicas son detectadas, la imagen original del gel es filtrada y el volumen de los spots se ajusta a un modelo gaussiano, sobre el que se puede realizar la comparación y análisis estadístico. Esta imagen suele llamarse gel “master”, que es una representación de los tres geles, en donde se normalizan los valores de los spots en todos los geles analizados. Se entiende como spot, a las proteínas o manchas proteicas visibles en el gel.

Las figuras No. 18 a No. 23, muestran los corrimientos electroforéticos en doble dimensión de las proteínas de estudio en esta investigación. Y en base a estos resultados, se seleccionaron treinta proteínas que mostraron un cambio a simple vista en su expresión, mismas que se encuentran marcadas con letras (figura No. 24). Posteriormente se cuantificó, la intensidad de cada una de ellas, para comprobar si efectivamente sufrieron un cambio significativo.

Para ello se utilizó el programa SigmaPlot 11.0, el cual calculo las medias de las intensidades entre cada tratamiento y su respectivo control, además de la significancia estadística que suele representarse mediante la letra p, en este caso $p < 0.05$.

Los cambios en intensidad que fueron estadísticamente significativos, se marcaron con un asterisco (*). Ver tablas No. 13 a No. 16.

En las tablas No. 9 y No. 10, se puede observar que existió un mayor número de cambios en las proteínas tratadas con progesterona a diferencia de las tratadas con estradiol. Ya que en las proteínas tratadas con estradiol, se observa que algunas proteínas disminuyeron y otras aumentaron en la intensidad con respecto al control, pero ninguno de ellos, logró ser un cambio significativo (tabla No. 9).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Por su parte en las proteínas tratadas con progesterona, observamos que varias de éstas presentaron una disminución en su expresión y la mayoría resultó ser un cambio significativo respecto al control, sin embargo se observan proteínas que de igual forma disminuyeron su expresión pero no lograron ser un cambio significativo (tabla No. 10).

Por otro lado en las tablas No. 11 y No. 12, puede observarse que existió un mayor número de cambios en las proteínas tratadas con dihidrotestosterona, a diferencia de las tratadas con testosterona. Además puede observarse, que la mayoría de cambios ocurridos con las proteínas tratadas con dihidrotestosterona, disminuyeron su intensidad, sin embargo tres de estos cambios aumentaron su intensidad, con respecto al control (tabla No. 11).

En cuanto a las proteínas tratadas con testosterona (tabla No. 12), se puede observar, que también la mayoría de los cambios en la intensidad disminuyeron con respecto al control. Sin embargo existieron cuatro cambios que presentaron un aumento en la intensidad de estas proteínas.

También se realizó una comparación entre las proteínas control y las proteínas tratadas con el control de etanol (tabla No. 17), para lograr observar si existe una diferencia significativa entre cada una de las proteínas separadas. Y se observó que existieron dos cambios significativos en la expresión de las mismas. Sin embargo, todas las demás proteínas no presentaron un cambio, lo cual nos dice que el etanol no es un agente que modifique la expresión o integridad de las mismas.

Por último en la tabla No. 18, podemos observar los pesos moleculares y puntos isoeléctricos, de las treinta proteínas que a simple vista mostraron un cambio. Estos datos fueron calculados mediante el programa PDQuest.

La mayoría de los cambios en intensidad que ya se mencionaron anteriormente, presentaron un rango de peso molecular que va de los 15.8 kDa hasta los 117.7 kDa, mientras que los valores de punto isoeléctrico (pI) son principalmente de naturaleza acida (>7), aunque pueden observarse también algunas proteínas de naturaleza básica.

Hasta la fecha no existen otras investigaciones, que demuestren el efecto directo de las hormonas sexuales, sobre proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps*. Sin embargo, estudios similares, han demostrado que la exposición *in vitro* de cisticercos de *T. crassiceps* con 17β -estradiol (E_2) y progesterona (P_4), estimulan la reproducción e infectividad del parásito, mientras que el tratamiento con testosterona (T_4) y dihidrotestosterona (DHT) tienen efectos contrarios, al inhibir la reproducción y reducir su motilidad e infectividad (Escobedo y col. 2004).

Estos efectos se han observado desde las primeras 24 horas de cultivo y presentan sus efectos máximos a los cinco días, sin afectar su viabilidad. Además, se ha observado que E_2 y P_4 aumentan, mientras que T_4 y DHT disminuyen la expresión de *c-fos* y *c-jun* (involucrados en el control de la diferenciación celular, reproducción y apoptosis), así como la síntesis de DNA, por parte del parásito (Escobedo y col. 2004).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Además en otras investigaciones recientes sobre *T. crassiceps*, demuestran que este parásito, presenta un marcado dimorfismo sexual, pues la proliferación parasitaria es más rápida en ratones hembra que en ratones machos, además es favorecida por el estradiol, y obstaculizada por los andrógenos (Huerta y col. 1992; Bojalil y col. 1993; Terrazas y col. 1994).

Se ha observado también, que las hembras aumentan más la carga parasitaria que los machos durante la infección aguda (Sciutto y col. 1995) y después de cuatro semanas de infección (infección crónica), la carga parasitaria de los machos aumenta progresivamente hasta llegar a ser similares a la de las hembras (Larralde y col. 1995).

Debido a esto, existe la evidencia acerca de un proceso de feminización en los ratones crónicamente infectados ya que se aumentan las concentraciones de estradiol (E_2) al grado de llegar a ser parecidas a las de las hembras y al mismo tiempo ocurre una desandrogenización ya que los niveles de testosterona disminuyen 90% su valor normal (Larralde y col. 1995; Morales y col. 1996; Morales y col. 2001).

Además de realizar un análisis proteómico de las proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con hormonas sexuales, también se realizó un análisis por citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica basada en la fluorescencia, se utiliza para evaluar la expresión de proteínas extra e intracelulares en diferentes tipos de células, incluyendo parásitos protozoarios. También permite el aislamiento y recuperación de un solo tipo de población celular (Nava-Castro y col. 2011).

En la actualidad, existen varios métodos para evaluar la expresión de moléculas específicas presentes en helmintos, como lo son la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), western blot, geles de dos dimensiones y varios ensayos microscópicos (Nava-Castro y col. 2011).

Sin embargo, todos estos métodos requieren la homogeneización de las células enteras de parásitos helmintos, impidiendo de este modo la evaluación de células individuales o tipos de células específicos de un área o tejido del parásito, por lo que no se puede diferenciar entre las células del parásito y la contaminación por células del hospedero (Nava-Castro y col. 2011).

Debido a ello, en este proyecto de tesis, se utilizó la técnica de citometría de flujo, para observar el efecto de hormonas sexuales sobre la expresión de un tipo específico de proteínas, las proteínas del citoesqueleto: actina, tubulina y miosina, presentes en los cisticercos de *T. crassiceps*.

No existen investigaciones acerca de este tema, sin embargo, existe un nuevo método para disgregar y analizar de forma individual y aislada, las células de helmintos por citometría de flujo y en el cual nos basamos para llevar a cabo esta investigación (Nava-Castro y col. 2011).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Para llevar a cabo el análisis por citometría de flujo, primeramente se realizó la extracción de cisticercos de *T. crassiceps* de la cavidad peritoneal de ratones hembra BALB/CAnN, con 18 semanas de infección, como se describe en el apartado 8.11.1. Posteriormente los cisticercos fueron colocados en cultivo con la dosis de hormonas sexuales que se muestra en la tabla No.2. Ver apartado 8.11.2.

Al finalizar los días de cultivo con las dosis de hormona, se realizó la extracción de las células del parásito. Para ello, los cisticercos fueron macerados con una malla de nylon tipo "sándwich" (150 mm. Small Parts) y un émbolo de una jeringa. El procedimiento completo puede observarse en el apartado 8.11.3.

Terminada la tinción de las células, con los anticuerpos primario y secundario, se llevo a cabo el análisis por citometría de flujo utilizando el equipo FACS Calibur (BD, Biosciences) y los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo. Ver apartado 8.11.6.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron, que algunas de las células extraídas de cisticercos tratados con progesterona, presentaron un aumento en la expresión de actina con respecto al control, además se observó un mayor aumento en la expresión de tubulina y miosina, tratados con la misma hormona. (Ver figuras No. 25, No. 27 y No. 29).

Las células extraídas de cisticercos tratados con estradiol, no mostraron un cambio en la expresión de estas proteínas. (Ver figuras No. 25, No. 27 y No. 29).

Por otro lado, se observó una ligera disminución en la expresión de tubulina por parte de algunas células tratadas con dihidrotestosterona y testosterona, con respecto al control de etanol. En cuanto a la expresión de actina y miosina no se observaron cambios por parte del tratamiento con estas hormonas. (Ver figuras No. 26, No. 28 y No. 30).

El análisis por citometría de flujo, presento una dificultad al momento de analizar los resultados, pues se obtuvo un pegado inespecífico por parte del anticuerpo secundario.

Además de realizar un análisis proteómico y un análisis por citometría de flujo, en este proyecto de tesis también se realizó un análisis microscópico, a través de microscopía confocal, para observar la expresión e integridad de proteínas presentes en células flama de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con hormonas sexuales.

Las células flama (FC) son células ciliadas que se sitúan en la matriz basal del tejido neodermal de cestodos. Son consideradas como células flama terminales y como la unidad básica del sistema protonefidrial (PS), que forma parte de los sistemas excretores de invertebrados (Valverde y col. 2011).

Los sistemas excretores como lo es el sistema protonefidrial, en los cestodos como en todos los platelmintos, juegan un papel muy importante en los parásitos que les permite conservar agua, eliminar sales y sobrevivir en las cavidades del intestino o en el cuerpo del hospedero, es por ello que actúan como osmorreguladores (Smyth y col. 1989, Barnes 1987).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

Las células flama presentan una morfología típica: por microscopía de luz se observan como cometas, el extremo anterior corresponde al cuerpo de la célula, mientras que el extremo distal contiene un penacho de cilios (Rohde y col. 1992).

Las células flama, parecen ser importantes para la supervivencia, en algunas infecciones causadas por parásitos del género *Taenia*, como la producida por el metazoo *T. solium*, ya que pueden realizar funciones específicas tales como la desintoxicación o transformación de sustancias nocivas para los parásitos (Smyth y col. 1989, Barnes 1987).

No existen evidencias del estudio en la expresión e integridad de células flama en cisticercos de *T. crassiceps* tratados con hormonas sexuales, sin embargo, existen algunas investigaciones acerca de *T. solium*, que han tratado de definir la localización de las proteínas del citoesqueleto de estas células, pero aun no está claro como estas proteínas están implicadas en la función celular (Valverde y col. 2011).

La metodología para llevar a cabo, el análisis de integridad y expresión de células flama, presentes en cisticercos de *T. crassiceps* por microscopía confocal, se puede observar del apartado 8.12 al 8.12.5

En cuanto a los resultados obtenidos por microscopía confocal, se logró detectar la presencia de actina y tubulina, las cuales son de suma importancia al formar parte del citoesqueleto de las células flama y por tanto, del sistema protonefridial del parásito pues como ya se mencionó, este sistema tiene una gran participación en la excreción de sustancias tóxicas para el mismo.

En las figuras No. 31 y No. 32, se observa la expresión de actina en color rojo y la expresión de tubulina en color verde de células flama presentes en cisticercos de *T. crassiceps* tratados con estradiol y progesterona, a 200 μm y 10 μm , respectivamente.

En la figura No. 32 se observa que existe un aumento en la expresión de actina por parte de los cisticercos tratados con estradiol. Además puede observarse, que los cisticercos tratados tanto con estradiol como con progesterona presentan una mayor cantidad de núcleos, con respecto al control, esto sugiere que estas hormonas juegan un papel importante en la reproducción del parásito.

Por otro lado, en las figuras No. 33 y No. 34, se observa la expresión de actina en color rojo y la expresión de tubulina en color verde, de células flama presentes en cisticercos de *T. crassiceps* tratados con testosterona y dihidrotestosterona, a 200 μm y 10 μm , respectivamente.

En la figura No. 34 se observa que existe una disminución en la expresión de tubulina, de los cisticercos tratados tanto con testosterona como con dihidrotestosterona. Los cisticercos tratados con dihidrotestosterona disminuyen también la expresión de actina con respecto al control.

En la figura No. 35 se observa la integridad de las células flama de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con hormonas sexuales.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

En el tratamiento con estrógenos se puede observar que las células flama de cisticercos control, están constituidas completamente con su morfología típica de cometas. En azul se observan los núcleos, en verde se observa el penacho de tubulina y en rojo el anillo de actina.

En esta figura también puede observarse que las células flama presentes en cisticercos tratados con estradiol y progesterona, están en su mayoría desintegradas, pues no presentan la morfología clásica de las mismas.

Además, en el tratamiento con estradiol se observa una mayor cantidad de núcleos y una mayor expresión de actina con respecto al tratamiento con progesterona, sin embargo con este último tratamiento, se observa mayor expresión de tubulina con respecto al tratamiento con estradiol.

Por otra parte, en el tratamiento con andrógenos, se observa también que la integridad de las células flama, no es la adecuada, sobre todo al observar las células flama tratadas con dihidrotestosterona.

La detección de α -tubulina en tejidos de cisticercos de *T. Solium*, indica que esta proteína del citoesqueleto está altamente expresada en el tegumento sincitial y en varias células flama, la mayoría de estas células ciliadas (aproximadamente 80-90%) se encuentran en el tejido del canal espiral del escólex invaginado (Valverde y col. 2011).

Por otro lado, la presencia de tubulina es importante para la supervivencia y adaptación dentro del hospedero, ya que los sistemas de absorción, excreción y secreción permiten una adecuada absorción de nutrientes, así como una eficaz eliminación de residuos (Smyth y col. 1989).



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

11. CONCLUSIONES.

El tratamiento *in vitro* mediante hormonas esteroideas afecta directamente a los cisticercos del parásito *Taenia crassiceps* a través de la modificación en la expresión, organización e integridad de las proteínas en general, además de las que conforman al citoesqueleto de dicho parásito.

El corrimiento de geles en una dimensión, evidenció que los diferentes tratamientos con hormonas esteroideas modifican la expresión y cantidad de proteínas de los cisticercos del parásito.

El corrimiento de geles en doble dimensión, mostró diversos cambios en la expresión de proteínas extraídas de cisticercos de *T. crassiceps* lo cual sugiere, que los esteroides sexuales modifican el perfil proteómico de dicho parásito, sobre todo a nivel de las proteínas del citoesqueleto.

El análisis de la expresión de proteínas de los corrimientos electroforéticos en doble dimensión, mostró que el tratamiento con dihidrotestosterona presento un mayor número de cambios, posteriormente la testosterona, la progesterona y por último el estradiol.

Las proteínas extraídas de cisticercos tratados con dihidrotestosterona y testosterona presentan una mayor disminución en su expresión, que las proteínas extraídas de cisticercos tratados con progesterona y estradiol.

Por microscopía confocal se observa que los esteroides sexuales afectan de manera diferencial la formación de células flama: los estrógenos y progesterona las aumentan mientras que los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona las disminuyen.

Por citometría de flujo pudimos observar, un mayor cambio en la expresión de tubulina y actina por parte de las hormonas progesterona, testosterona y dihidrotestosterona.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

12. PERSPECTIVAS.

Debido a los resultados que arrojó el presente proyecto de tesis y al marcado cambio en las diferentes proteínas extraídas de los cisticercos de *T. crassiceps* tratados previamente con hormonas esteroideas, es de suma importancia la posterior identificación de las mismas por espectrometría de masas, para poder conocer más a fondo sobre la fisiología del parásito.

Además con la identificación de las proteínas (que presentaron cambios) se podrá demostrar algunos sitios de ataque para ciertos análogos de hormonas.

Por otra parte, sería muy importante colocar los resultados de la identificación de las proteínas en una base de datos, para así poder conocer más a fondo el genoma de los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Además, se pueden realizar nuevos mapas proteómicos de las mismas proteínas, tratadas con las mismas hormonas, utilizando tiras para isoelectroenfoque con un intervalo de pH de 4-7, con el fin de observar nuevas proteínas y una mejor separación de las mismas que pudieran estar afectadas por los tratamientos hormonales y que no son observadas con las tiras con intervalo de pH de 3-10.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

13. REFERENCIAS.

A

1. **Acuña A. F. (2006).** “Química orgánica”, 1ª edición, editorial de la Universidad Estatal a Distancia, San José Costa Rica; 295-298.
2. **Akmaev I. G. (1996).** “Current concepts of the interactions of regulating systems: nervous, endocrine and immune”. Usp. Fiziol Nauk; 27: 3-20.
3. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002).** “The Cytoskeleton: Molecular Motors. Molecular Biology of the Cell”, 4ª edición, Garland Science, New York, USA; 949-953.
4. **Alberts B., Bray D. (2006).** “Introducción a la biología celular”, 2ª edición, editorial Médica panamericana, Buenos Aires; 160-163.
5. **Ambrosio J. R., Landa A., Merchant M., Lactette J. P. (1994).** “Protein uptake by cisticerci of *Taenia crassiceps*”. Archives of Medical Research; 25: 325-330.
6. **Armengol-Butrón de Mújica J. A., Miñano-Sánchez F. J. (1995).** “Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso”, tomo I, ediciones de la Universidad de Sevilla; 78-79.

B

7. **Barnes D. R. (1987).** “Platelmintos. Zoología de los Invertebrados”. Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México; 179-223.
8. **Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2008).** “Bioquímica”. Editorial Reverté, Barcelona; 66-73.
9. **Bojalil R., Terrazas L. I., Govezensky T., Sciutto E., Larralde C. (1993).** “Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)”. J. Parasitol; 79: 384-389.
10. **Brown T. A. (2008).** “Genomas”, 3ª edición, editorial Médica panamericana, Buenos Aires; 179-182.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

C

11. **Campbell N. A., Reece J. (2007).** “Biología”, 7ª edición, editorial Médica panamericana, Madrid; 112-118.
12. **Canda-Sánchez A. (2007).** “Rafts lipídicos e IL-12R: nuevos avances en el control de la actividad proliferativa de IL-12”, editorial de la Universidad de Santiago de Compostela, España; 123-124.
13. **Carrero J. C., Cervantes C., Moreno-Mendoza N., Saavedra E., Morales-Montor J. and Laclette J. P. (2006).** “Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases *in vitro* growth and viability of *Entamoeba histolytica*”. *Microbes Infect*; 8: 323–331.
14. **Ceccotti E. L., Sforza R. (2007).** “El diagnóstico en clínica estomatológica”, 1ª edición, editorial Médica panamericana, Buenos Aires; 67-69, 79-81.
15. **Charder F. y col. (1992).** “Effects of testosterone on *Heterakis spumosa* infections in mice”. *J. Parasitol*; 105: 335-342.
16. **Charlab R. y col. (1990).** “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor for promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis*”. *J. Protozool*; 37: 352-357.
17. **Cristobo L. I. (2008).** “Proteómica de expresión de placas de aterosclerosis”, editorial de la Universidad de Santiago de Compostela, España; 100-106.

D

18. **Delgado C. A., (2003).** “Introducción a la química terapéutica”, 2ª edición, ediciones Díaz de Santos; 357-360.
19. **Dissanayake S. (2000).** “Upregulation of a raf kinase and a DP-1 family transcription factor in epidermal growth factor (EGF) stimulated filarial parasites”. *Int. J. Parasitol*; 30: 1089-1097.
20. **Dorais F. J., Esch G. W. (1969).** “Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains”. *Experimental Parasitology*; 25: 395-398.

E

21. **Escobedo G. y Morales-Montor J. (2004).** “Trans-regularización por hormonas del hospedero de la fisiología parasitaria. Una nueva visión de la relación hospedero-parásito”. *REB* 23 (1): 12-17.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

22. **Escobedo G. y Larralde C. (2004).** "Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*". The Journal of Parasitology, 90(6): 1235–1244.
23. **Escobedo G. y col. (2005).** "Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?". Trends Parasitol; 21: 588-593.
24. **Escobedo G., Camacho-Arroyo I., Hernandez-Hernandez O. T., Ostoa-Saloma P., Garcia-Varela M., Morales-Montor J. (2010).** "Progesterone induces scolex evagination of the human parasite *Taenia solium*: evolutionary implications to the host-parasite relationship". J Biomed Biotechnol; 2010: 591079.

F

25. **Flisser A. (1994).** "Teniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*". Prog Clin Parasitol; 4: 77–115.
26. **Freeman R. S. (1962).** "Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), Rudolphi 1810 (Cestoda)". Canadian Journal of Zoology; 40: 969–990.
27. **Freilich D. S., Ferris y col. (2000).** "16 β -bromoepiandrosterona, a dehydroepiandrosterona (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth". American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 63: 280-283.
28. **Fuentes A. X., Castiñeiras L. M. J., Queraltó C. J. M. (1998).** "Bioquímica clínica y patología molecular", volumen I, 2ª edición, editorial Reverté, Barcelona; 169-180.

G

29. **Gállego J., (2007).** "Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario", 1ª edición, ediciones de la Universidad de Barcelona, Barcelona; 217-226.
30. **García B. M. J., Colom V. M. F. Pérez-Sala-Roda M. Belso S. E., Del Castillo T. L., Gómez M. D. (2006).** "Técnico especialista en anatomía patológica", 1ª edición, editorial Mad, España; 91-92.
31. **Garrels J. I. (1989).** "The QUEST system for quantitative analysis of two dimensional gels". Journal of Biological Chemistry; 264: 5269-5282.
32. **Ghansah T. J. E., Ager C. y col. (2002).** "Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation". J. Eukaryot Microbiol; 49 (5): 383-90.
33. **Gil H. A., Sánchez-de Medina F. (2010).** "Tratado de nutrición", 2ª edición, editorial Médica panamericana, Madrid; 47-51.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

H

34. **Huerta, L., Terrazas, I., Sciutto, E., and Larralde, C. (1992).** Immunological mediation of gonadal effects in experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Parasitology* **78**: 471–476.

J

35. **Jiménez P., Valdeéz R. A. and Romano M. C. (2006).** “Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci”. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; **99**: 203–208.

K

36. **Koolman J., (2004).** “Bioquímica: Texto y atlas”, 3ª edición, editorial Médica panamericana, Madrid España; 78-79, 374-375.

L

37. **Larralde C., Sciutto E., Huerta I., Terrazas I., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Lomelí C., Tapia G. and Montoya R. M. (1989).** “Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility.” *Acta Leidensia*; **57**: 131–134.

38. **Larralde C., Sotelo J., Montoya R.M., Palencia G., Padilla A., Govezensky T., Díaz M. L., Sciutto E. (1990).** “Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*”. *Arch Pathol Lab Med*; **114**: 926-928.

39. **Larralde C., Morales-Montor J., Terrazas L. I., Govezensky T. and Romano M., C. (1995).** “Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis”. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; **52**: 575–580.

40. **Leon W. B. and Kurt P. B. (1986).** “*Nippostrongylus brasiliensis*: effect of host hormones on helminth ingestion in vivo”. *Int. J. Parasitol*; **16**: 77-80.

41. **Lingnau A., Margos G., Maier W.A. and Seitz H. M. (1993).** “The effects of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro”. *Applied Parasitology*; **34**: 153–160.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

42. **Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J. (2006)**, “Biología celular y molecular”, 5ª edición, editorial Médica panamericana.
43. **Lockshin M. D. (2001)**. “Genome and hormones: Gender differences in physiology: Sex ratio a rheumatic disease”. *J. Appl Physiol*; 91: 2366-2373.
44. **Lumsden R. D., Voge M. and Sogandares-Bernal F. (1982)**. “The metacestode tegument: fine structure, development, topochemistry and interactions with the host. In cysticercosis, present state of knowledge and perspectives (Eds. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltran, F.), Academic Press, New York; pp. 307–361.
45. **Lumsden R. D. and Hildreth M. B. (1983)**. “The fine structure of adult tapeworms”. In: *biology of the eucestoda*, vol 1 (Eds. Arme, C. and Pappas, P.W.), Academic Press, London; pp. 177–233.

M

46. **Maraculla J. M., Goñi F. M. (1994)**. “Bioquímica humana. Curso básico.” 2ª edición, editorial Reverté, S.A., Barcelona; 435-453.
47. **Meleth S., Deshane J., Kim H. (2005)**. “The case for wellconducted experiments to validate statistical protocols for 2D gels: different pre-processing = different lists of significant proteins”. *BMC Biotechnol*; 5: 7-21.
48. **Mendonca R. L. y col. (2000)**. “Hormones and nuclear receptors in *Schistosoma* development”. *Parásitol. Today*; 16: 233-240.
49. **Mendoza P. N. (2008)**. “Farmacología médica”, editorial Médica panamericana, UNAM, Facultad de Medicina, México; 401- 433.
50. **Miján-de la Torre A. (2002)**. “Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana”, 2ª edición, editorial Glosa, Barcelona; 190-192.
51. **Morales J., Larralde C., Arteaga M., Govezensky T., Romano M. C. and Moral G. (1996)**. “Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci”. *Journal of Parasitology*; 82: 689–693.
52. **Morales J., Gamboa-Domínguez A., Rodríguez-Dorantes M., Cerbón M. A. (1999)**. “Tissue damage in the male murine reproductive system during experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis”. *J. Parasitol*; 85: 887–90.
53. **Morales J., Baig S., Mitchell R., Deway K., Hallal-Calleros C. and Damian R. T. (2001)**. “Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6”. *J Immunol*; 167: 4527 – 4533.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

54. **Morales J., Chavarria A., De Leon M. A., Del Castillo L. I., Escobedo E. G., Sanchez E. N., Vargas J. A., Hernandez-Flores M., Romo-Gonzalez T., Larralde C., (2004a).** “Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm”. *J Parasitol*; 90: 531-546.

55. **Morales J., Escobedo G., Rodriguez-Dorantes M., Tellez-Ascencio N., Cerbon M. A., Larralde C. (2004b).** “Differential expression of AP-1 transcription factor genes c-fos and c-jun in the helminth parasites *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*”. *Parasitology*; 129: 233-243.

56. **Mount P. M. (1968).** “Rostellar morphogenesis in two strains of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: *Taeniidae*)”. M.S. Thesis. Wake Forest University, Winston-Salem, North Carolina; 35 p.

57. **Müller-Esterl W. (2008).** “Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida”, editorial Reverté, España; 108-111.

N

58. **Nava-Castro K., Hernández-Bello R., Muñiz-Hernández S., Escobedo G., and Morales-Montor J. (2011).** “New method to disaggregate and analyze single isolated helminthes cells using flow cytometry: Proof of concept”. *J. Biomed. Biotechnol*; 2011: 257060.

O

59. **Ojeda S. J. L. (1997).** “Métodos de microscopia electrónica de barrido en biología”, editorial de la Universidad de Cantabria; 126-130.

P

60. **Pallás V., Escobar C., Rodríguez P. P., Marcos J. F. (2008).** “Herramientas biotecnológicas en fitopatología”, ediciones mundi-prensa, España; 80-83.

61. **Palomares F., Palencia G., Ambrosio J. R., Ortiz A., Jung-Cook H. (2006).** “Evaluation of the efficacy of the albendazole sulphoxide and praziquantel combination on *Taenia crassiceps*: *in vitro* studies”. *J. Antimicrob Chemother*; 57: 482-488.

62. **Peña A., (1988).** “Bioquímica”, editorial Limusa, Mexico; 118-123.

63. **Remoue F. y col. (2002).** “Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-Kilodalton glutathione S-transferase”. *Infect Immun*; 70: 601-605.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

64. **Roberts C. W., (2001).** “Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites”. *Clin. Microbiol. Rev*; 14: 476–488.
65. **Roca P., Oliver J., Rodríguez A. M. (2003).** “Bioquímica técnicas y métodos”, editorial Hélice, Madrid; 157.
66. **Rodger W. G. (1981).** “Química orgánica moderna”, editorial Reverté; 494-501.
67. **Rohde K., Watson N. A., Roubal F. R. (1992).** “Ultrastructure of protonephridial system of *Anoplo discus cirrusspiralis* (*Monogenea Monopisthocotylea*)”. *Int. J. Parasitol*; 22: 443–457.
68. **Romero C. R. (2007).** “Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias”, 3ª edición, editorial Médica panamericana, México; 1469-1489.
69. **Rosengren A. T., Salmi J. M., Aittokallio T., Westerholm J. y col. (2003).** “Comparison of PDQuest and progenesis software packages in the analysis of two dimensional electrophoresis gels”. *Proteomics*; 3: 1936-1946.
70. **Ross M. H., Wojciech P. (2008).** “Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular”, 5ª edición, editorial Médica panamericana, Buenos Aires; 61-74.
71. **Ruppert E. E. and Barnes R. D. (1994).** “Invertebrate Zoology”. Saunders College Publishing and Harcourt Brace Jovanovich. Orlando, Florida; 1056p.

S

72. **Segal K. C. A., Ortega L. G. J. (2005).** “Manual de prácticas de biología molecular de la célula I”, 1ª edición, editorial Las prensas de ciencias, México; 51-52.
73. **Sciutto E., Fragoso G., Díaz M. L., Valdez F., Montoya R. M., Govezensky T., Lomeli C. and Larralde C. (1991).** “Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility”. *Parasitology Research*; 77: 243–246.
74. **Sciutto E., Fragoso G., Baca M., De La Cruz V., Lemus L. and Lamoyi E. (1995).** “Depressed T-cell proliferation associated with the susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection”. *Infect. Immun*; 63: 2277-2281.
75. **Sciutto E., Aluja A., Fragoso G., Rodarte L.F., Hernández M., Villalobos M. N. y col. (1995).** “Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: Factors related to effective protection”. *Vet Parasitol*; 60: 53-67.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

76. **Smith J. K., Esch G. W. and Kuhn R. E. (1972).** "Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous (ORF) strain". *International Journal for Parasitology*; 2: 261–263.
77. **Smyth J. D., McManus D. P. (1989).** "The adult cestode: special structural features relevant to its physiology". Cambridge University Press, New York; 5–34.
78. **Soriano M. C., Guillazo B. G. (2007).** "Fundamentos de Neurociencia", 1ª edición, editorial UOC.

T

79. **Teijón R. J. M., Blanco G. M. D., Agrasal A. C., Olmo L. R. (2001).** "Bioquímica estructural: Conceptos y tests". 1ª edición, editorial Tébar, Madrid; 84-85.
80. **Terrazas L. I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. (1994).** "A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)". *J Parasitol*; 80: 563-568.
81. **Toledo A., Fragoso G., Rosas G., y col. (2001).** "Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent Th1 response". *Infect Immun*; 69: 1766–1773.
82. **Torres M. L. M., Aguilar A. G., Alsina M. E., Canet C. J., Criado J. A., Gallart G. L., Gilsanz R. (2001).** "Tratado de anestesia y reanimación", Arán ediciones, España; 634-636.
83. **Townson S., Tagboto S. K. (1996).** "In vitro cultivation and development of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca lienalis* microfilariae". *Am J. Trop. Med Hyg*; 54: 32-37.

V

84. **Valverde L. y col. (2011).** "Visualization and 3D reconstruction of flame cells of *Taenia solium* (Cestoda)", 6, Issue 3, e14754.
85. **Voet D., Voet J. G. (2006).** "Bioquímica", 3ª edición, editorial Médica panamericana, Buenos Aires; 139-140, 153-158.
86. **Voet D., Voet J. D., Pratt Ch. (2009).** "Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular", 2ª edición, editorial Médica panamericana, Buenos Aires; 97, 105-107, 1076-1077.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

W

87. **Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., Losick R., Giovanello O., Negrete J., Tzal K. (2008).** “Biología molecular del gen”, 5ª edición, editorial Médica panamericana, Madrid; 723-725.
88. **White A. C. Jr., Robinson P., Kuhn R. (1997).** “*Taenia solium* cysticercosis: host–parasite interactions and the immune response. In: Freedman, DO (ed) Immunopathogenic aspects of disease induced by helminth parasites”. Chem Immunol; 66: 209-230.
89. **Wilkins M. R., Sanchez J. C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F. and Williams K. L. (1995).** “Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it”. Biotechnol. Genet. Eng. Rev; 13: 19-50.
90. **Willms K., Caro J. A. y Robert L. (2003).** “Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in experimental *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters”. Parásitology Research; 90 (6): 479-488.
91. **Willms K., Robert L., Jiménez J.A., Everhart M. and Kuhn R. E. (2004).** “Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps* strobilae WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters”. Parásitology Research; 93:262–267.
92. **Willms K., Presas A. M., Jiménez J. A., Landa A., Zurabian R., Ugarte M. E. and Robert L. (2005).** “*Taeniid* tapeworm responses to *in vitro* glucose”. Parásitology Research; 96: 296–301.

Z

93. **Zavala C. J. E. (2005).** “Manual de técnicas básicas de biología molecular”, ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán; 51-55.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

ANEXO 1

ABREVIATURAS

C: Control.

CEtOH: Control de vehículo etanol.

E₂: Estradiol

P₄: Progesterona

DHT: Dehidrotestosterona

T₄: Testosterona

1D: Una dimensión

2D: Dos dimensiones.

BSA: Albumina sérica bovina.

IAA: Iodoacetamida.

IEE: Isoelectroenfoque.

IPG: Tiras de gradiente inmovilizado de pH.

kDa: Kilodaltones.

PSA: Persulfato de amonio.

Rf: Frente relativo.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE Electroforésis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.

UV: Ultra violeta.

EtOH: Etanol

Solución A: Buffer de fosfatos (6.7 mM con 0.04 M KCl y 1 mM de MgCl₂, pH=6.7)

BL: Buffer de Laemmli

βME: β-mercaptoetanol

P.M: Peso molecular



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

ANEXO 2

PREPARACION DE SOLUCIONES, MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS UTILIZADOS

- **Medio de cultivo suplementado:**

- ✓ **Medio DMEM:** Advanced D-MEM 1x Gibco 1249-015 (+D-Glucosa, + aminoácidos no esenciales, +110 mg de piruvato de sodio, -L-glutamina).

- ✚ HEPES (5%);
- ✚ Aminoácidos no esenciales (2%);
- ✚ L- Glutamina (2%);
- ✚ Antibiótico (2%);

Nota: El medio DMEM utilizado ya contenía aminoácidos no esenciales, por lo que ya no fue necesario agregar nuevamente los mismos.

- **Hormonas esteroideas (Stocks):**

- ✓ **Estradiol** (10 µg/µl): Sigma-Aldrich
- ✓ **Progesterona** (10 µg/µl): Sigma-Aldrich
- ✓ **Dihidrotestosterona** (1 µg/µl): Sigma-Aldrich
- ✓ **Testosterona** (1 µg/µl): Sigma-Aldrich
- ✓ **Medio DMEM** (sin suplementar)
- ✓ **Etanol al 96%**

Nota: Se pesó la cantidad necesaria de hormona para preparar soluciones Stocks (de concentración conocida). El estradiol y progesterona se diluyeron en medio DMEM sin suplementar, posteriormente se filtraron, mientras que la dihidrotestosterona y testosterona se diluyeron en etanol absoluto.

- **Extracción de parásitos:**

- ✓ **PBS 10 X**
 - ✚ NaCl; Baker, 1 Kg, No. de Catálogo 3624-19
 - ✚ KCl; Baker, 500 g, No. de Catálogo 3040-01
 - ✚ Na₂HPO₄
 - ✚ KH₂PO₄
 - ✚ Agua MilliQ

Nota: A partir del PBS 10 X, se preparó una solución de PBS 1X, la cual se utilizó para extraer los parásitos y la cual estaba previamente esterilizada, así como todo el material de disección y de recolección de los parásitos.

- **Solución A con inhibidores de proteasas:**

- ✓ **Fosfato de Sodio Monobásico** (0.2 M); Baker, 500 g, No. de Catálogo 3818-01
- ✓ **Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro** (0.2 M); Baker, 2.5 g, No. de Catálogo 3828-05
- ✓ **Cloruro de Potasio**; Baker, 500 g, No. de Catálogo 3040-01
- ✓ **Cloruro de Magnesio**; Sigma, 100 g, No. de Catálogo M8266-100G
- ✓ **Agua MilliQ**
- ✓ **Inhibidores de proteasas**; Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, No. de Catálogo 04693 116 001

- **Precipitación de proteínas:**

- ✓ **Solución de TCA**, Ácido Tricloroacético (10%) con DTT (20 mM) en acetona a -20 °C; Fluka BioChemika 100 g, No. de Catálogo 91228.
- ✓ **Solución de DTT** (20 mM) en acetona a -20 °C, Plus One 1 g, Amersham Biosciences, No. de Catálogo 17-1381-01.



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

- **Cuantificación de proteínas (DC Protein Assay, BIO-RAD):**
 - ✓ Solución de albúmina (BSA) al 10 mg/ml; Sigma, Fracción V, 96.99%.
 - ✓ Solución A con inhibidores de proteasas
 - ✓ Reactivo A; solución alcalina de tartrato de cobre, Bio-Rad, DC Protein Assay, Reagent A, 250 ml, No. de Catálogo 500-0113
 - ✓ Reactivo B; Folín diluido, Bio-Rad, DC Protein Assay, Reagent A, 250 ml
 - **Geles de Poliacrilamida al 10% (Electroforésis 1D):**
 - ✓ Acrilamida al 30%; Electrophoresis Purity Reagent, Bio-Rad, 500 g, No. de Catálogo 161-0101
 - ✓ Buffer Tris pH= 8.8; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, J.T. Baker, 1Kg, No. de Catálogo 161-0719
 - ✓ Buffer Tris pH= 6.8; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, J.T. Baker, 1Kg, No. de Catálogo 161-0719
 - ✓ SDS al 10%; Sodium dodecyl sulfate, Electrophoresis Purity Reagent, 100 g Bio-Rad, No. de Catálogo 161-0301
 - ✓ TEMED; N, N, N', N'- Tetra-methyl-ethylendiamine, 5 ml, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0800.
 - ✓ PSA al 10%; Ammonium Persulfate 10 g, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0700
 - ✓ Agua MilliQ
 - **Buffer de almacenamiento (para guardar geles de poliacrilamida a -4°C):**
 - ✓ Buffer Tris pH=8.8
 - ✓ SDS al 10%
 - ✓ Agua destilada
 - **Buffer de corrida 5 X para Electroforésis 1D (BIO-RAD) pH= 8.3:**
 - ✓ Tris base; Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 1 Kg, Electrophoresis Purity Reagent, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0719.
 - ✓ Glicina; Electrophoresis Purity Reagent, BIO-RAD, 1 Kg, No. de Catálogo 161-0718.
 - ✓ SDS; Sodium dodecyl sulfate, 100 g, Electrophoresis Purity Reagent, BIO-RAD, 100 g, No. de Catálogo 161-0301.
 - ✓ Agua destilada
- Nota:** A partir del buffer de corrida 5X se preparó un buffer de corrida 1X, con el cual se llevó a cabo la electroforésis a 4 °C.
- **Reducción de proteínas (1D):**
 - ✓ 2-Mercaptoethanol (B-Mercaptoethanol), 25 ml, Molecular Sigma Biology, M-3148.
 - ✓ Laemmli Sample Buffer, 30 ml BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0737.
 - ✓ P.M. (para teñir con Azul de Coomassie); Precision Plus Protein, All Blue Standards 500 µl, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0373.
 - ✓ Control de actina; Actina de Worthington, músculo de conejo 1 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation.
- Nota:** Además de agregar estas soluciones reductoras de proteínas a las muestras de nuestro interés, se colocaron las mismas en un baño María a ebullición durante 5 minutos, para posteriormente cargar el gel de poliacrilamida.
- **Tinción de geles (Electroforésis 1D):**
 - ✓ Azul de Coomassie; Phast Gel Blue, Pharmacia.
 - **Desteñido de geles 1D (solución de desteñido):**
 - ✓ Metanol al 50%; J.T. Baker, 20 L, No. de Catálogo 9070-07
 - ✓ Ácido acético al 10%



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

- ✓ Agua destilada

- **Reducción de proteínas (2D):**
 - ✓ Urea 7M; Carbamide, Amersham Biosciences, Plus One.
 - ✓ Thiourea 2M; extra pure, Riedel-de-Haën 1 Kg, No. de Catálogo 16217.
 - ✓ Chaps 4%; Sigma, Ultra minimum 98% TLC, 5 Kg, No. de Catálogo C5070-5G.
 - ✓ DTT 60 mM, Ditioneitol, Plus One, 1 g No. de Catálogo 17-1318-01.
 - ✓ Anfólitos 2%, IPG Buffer, pH= 3-10 Lineal, GE Healthcare, for rewelling of immobiline Dry Strip, simple preparation and loading, 1 ml concentrate, No. de Catálogo 17-6000-87.

- **Solución de rehidratación (para aforar cada muestra a 125 µl, volumen necesario para hidratar una tira):**
 - ✓ Urea 7M
 - ✓ Thiourea 2M
 - ✓ Chaps 4%
 - ✓ Azul de Bromofenol 0.2%

- **Hidratación de tiras para Isoelectroenfoque:**
 - ✓ Tiras Isoelectroenfoque, Immobiline Dry Strip pH= 3-10 Lineal 7 cm, GE Healthcare, No. de Catálogo 17-6001-11.
 - ✓ Aceite mineral; Mineral Oil, BIO-RAD, 500 ml, No. de Catálogo 163-2129

- **Corrida de Isoelectroenfoque:**
 - ✓ Puentes; Protean IEF System, BIO-RAD, Electrode Wicks, 500 piezas, No. de Catálogo 1654071.

- **Rehidratación de tiras (para llevar a cabo la separación por P.M.):**
 - ✓ Buffer de equilibrio
 - ⚡ Tris Base pH= 8.8
 - ⚡ Urea 6M
 - ⚡ Glicerol al 30%; Plus One, 1L, No. de Catálogo 17-1325-01
 - ⚡ SDS al 2%
 - ⚡ Azul de Bromofenol 0.4%
 - ✓ Buffer de equilibrio con DTT al 1%
 - ✓ Buffer de equilibrio con Iodoacetamida al 2.5%; GE Healthcare, Amersham, 25 g, No. de Catálogo RPN6302V

- **Corrida de Electroforésis 2D (INVITROGEN):**
 - ✓ Buffer de corrida 1 X a partir de un buffer 20 X; Invitrogen, NUPAGE, MES SDS Running Buffer 20 X, No. de Catálogo NP0002
 - ✓ Antioxidante; Invitrogen, NUPAGE, No. de Catálogo NP0005
 - ✓ Geles prehechos; Invitrogen, NUPAGE 4-12% BT 1.0, No. de Catálogo NP03306
 - ✓ P.M. (para teñir con Sypro Ruby); Precision Plus Protein Standards, Unstained, 500 µl, BIO-RAD, No. de Catálogo 161-0363

- **Tinción de Geles 2D:**
 - ✓ Sypro Ruby
 - ⚡ Solución para fijar (Metanol 50% + ácido acético 7%)
 - ⚡ Solución de lavado (Metanol 10% + ácido acético 7%)
 - ⚡ Agua MilliQ
 - ✓ Azul de Coomassie



Efecto del estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps*: Análisis proteómico y microscópico.

- **Disgregación de cisticercos (para citometría de flujo):**
 - ✓ PBS 1X
 - ✓ Buffer de FACS (PBS 1X pH=7.3, Suero Fetal Bovino 2%, Azida de Sodio 0.02%)
- **Tinción para citometría de flujo:**
 - ✓ Fijador paraformaldehído al 4%
 - ✓ Metanol a -20°C
 - ✓ α -FC (blocking) 1:100;
 - ✓ α -actina de conejo,
 - ✓ Anti tubulina y miosina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Santa Cruz, Biotech
 - ✓ α -Mouse 1:200; conjugado a FITC
 - ✓ α -Rabbit 1:200; conjugado a FITC
 - ✓ FACS Calibur (BD, Biosciences)
 - ✓ Software FlowJo
- **Inmunofluorescencia-Microscopía Confocal:**
 - ✓ PBS 1X
 - ✓ PBS 1X + Tw₂₀ 0.3% (100 ml)
 - 99.7 ml PBS 1X + 0.3 ml Tw₂₀
 - ✓ Sol. de Bloqueo; PBS 1X + Tw₂₀ 0.3% + BSA (albúmina) 2% (5 ml)
 - 5 ml PBS 1X + Tw₂₀ 0.3% + 0.1 g de BSA
 - ✓ Tissue-tek; Sakura, USA
 - ✓ Criostato; CM Leica 1100
 - ✓ Alexa-Fluor®594 faloidina; Invitrogen™
 - ✓ Anticuerpo policlonal generado contra la miosina II de *T. solium* (Kumar y col. 2003)
 - ✓ Anticuerpo biotilado anti IgG de conejo (H + L); Vector Lab. Burlingame
 - ✓ Solución de avidina-rodamina (1:50)
 - ✓ DM-1A, diluido 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc.
 - ✓ Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a FITC diluido 1:30
 - ✓ DAPI; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma®
 - ✓ Solución de montaje comercial para preservar la fluorescencia; Dako, CA, EE.UU.
 - ✓ Microscopio confocal; Olympus FluoView™ FV 1000 a 10X (UPLSAPO), 40X (UPLFLN) y 100X (UPLSAPO).